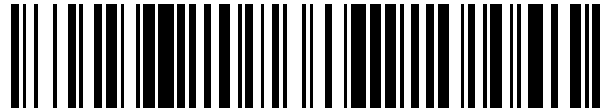


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 571 338**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.12.2007 E 12174452 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.02.2016 EP 2559765**

54 Título: **Plantas madereras con características de desarrollo mejoradas y método para su obtención**

30 Prioridad:

08.12.2006 WO PCT/EP2006/011855

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

24.05.2016

73 Titular/es:

**SWETREE TECHNOLOGIES AB (100.0%)
P.O. Box 4095
904 03 Umeå, SE**

72 Inventor/es:

**HERTZBERG, MAGNUS;
SANDBERG, GÖRAN;
SCHRADER, JARMO y
JONSÉN, CARL DAVID**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 571 338 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

Plantas madereras con características de desarrollo mejoradas y método para su obtención

5 **Campo Técnico de la Invención**

La presente invención se refiere en general al campo de la biología molecular y también se refiere a un método para mejorar las características del desarrollo de una planta. Más específicamente, la invención se refiere a un método para modificar fenotípicamente plantas y plantas transgénicas que tengan la expresión alterada de un gen específicamente expresado durante las diferentes fases de la formación de la madera, que resulta en un fenotipo de desarrollo modificado. La invención también proporciona construcciones útiles para el método de la invención.

Antecedentes de la invención

En la actualidad, los objetivos principales de la ingeniería de los bosques de árboles y del mejoramiento molecular son la mejora de la calidad y el rendimiento de la madera. La demanda global de productos de madera está creciendo aproximadamente un 1,7 % anualmente, y este aumento en el consumo de madera está ocurriendo a pesar del hecho de que ya se ha alcanzado o superado el nivel máximo de recogida en los bosques de todo el mundo. En consecuencia, hay necesidad de aumentar la producción de las plantaciones de madera en el mundo. Las plantaciones de bosques también pueden tener la ventaja del secuestro de carbono en el cultivo como respuesta al incremento de CO₂ atmosférico. Asimismo, es deseable incrementar la producción de biomasa a partir de plantas no madereras, por ejemplo, para hacer posible cubrir la demanda materia prima para la producción de energía. La modificación de procesos específicos durante el desarrollo celular en especies superiores es además de gran interés comercial, no solo buscando mejorar las propiedades los árboles, sino también de otras plantas.

El crecimiento de la planta a través de los meristemos apicales da como resultado un desarrollo de determinados tejidos primarios y en el alargamiento del tallo y las raíces. Además de este desarrollo primario, las especies de árboles experimentan un crecimiento secundario y producen el tejido secundario, la madera, a partir del cambium. El desarrollo secundario aumenta el perímetro de los tallos y raíces.

Sterky et al. 1998 (Proc. Natl. Acad. Sci USA, 1998 (95), 13330-13335) han publicado los resultados del programa de descubrimiento de genes a gran escala en dos especies de álamos, que comprendió 5.629 marcadores de secuencias expresadas (EST) a partir de tejidos formadores de la madera de *Populus tremula L. x tremuloides* Michx. y *Populus trichocarpa* 'Trichobel'. Estas EST representaron un total de 3.719 transcripciones particulares a partir de dos bibliotecas de ADNc y las funciones putativas podrían ser asignadas a 2.245 de estos transcritos. Los autores afirman que los datos de EST presentados serán valiosos para la identificación de los genes involucrados en la formación del floema y del xilema secundario en las plantas, pero no logran dar instrucciones claras de cómo podría efectuarse la identificación. El artículo de Sterky et al. 1998 también reveló la existencia de una gran cantidad de EST con funciones desconocidas o inciertas.

En la técnica anterior (esto es, Sterky et al. 1998) las bibliotecas se construyeron a partir de tejido de tallo aislado de árboles en crecimiento activo. Se preparó una biblioteca de región cambial a partir de una mezcla de tejidos, que incluye el xilema en desarrollo, la zona meristémica cambial y floema maduro y en desarrollo de *Populus tremula L. x tremuloides* Michx. Estos tejidos cambiales fueron obtenidos por descascaramiento de corteza y raspado de ambas superficies expuestas, con un escalpelo. La biblioteca de xilema en desarrollo fue preparada a partir de *Populus trichocarpa* 'Trichobel'. Estos tejidos fueron obtenidos mediante descascaramiento de corteza y raspado del lado del xilema expuesto. Usando dichos métodos sólo fue posible construir tres bibliotecas diferentes representando la región cambial completa, el xilema en desarrollo y la región del floema (hechas a partir de raspado de la corteza expuesta). La técnica anterior comparó la expresión de los genes en la región cambial con los genes expresados en el tejido del xilema en desarrollo. El experimento sólo permitió una comparación tosca debido a los límites impuestos por el protocolo de preparación del tejido. El tejido usado para la biblioteca del xilema en desarrollo contiene tejidos producidos a partir de células del xilema que se expanden a través del xilema durante el desarrollo tardío.

Un problema pendiente es cómo identificar los genes potencialmente más importantes y relacionar estos estados de desarrollo específico con las propiedades finales de la célula. Otro problema es cómo identificar los genes desconocidos hasta ahora, en relación al tipo de célula específica y/o las funciones en la planta. Finalmente, un problema particular es cómo encontrar los genes específicos involucrados en la división celular, en la expansión celular, en la síntesis de la pared celular, la apoptosis y la muerte celular programada y otros importantes procesos involucrados en el desarrollo de determinados árboles y las propiedades de la madera.

Hertzberg et al., 2001 (Proc. Natl. Acad. Sci USA, 2001 (98), 14372-14737) y Schrader et al., 2005 (Plant Cell, (16), 2278 – 2292) han usado elaboración de perfiles de transcritos para revelar una jerarquía transcripcional para miles de genes durante el desarrollo del xilema así como para proporcionar datos de expresión que además pueden facilitar la elucidación de muchos genes con funciones desconocidas (White et al., 1999 (Science 1999 286) 2187 – 2184); Aharoni et al., 2000 (Plant Cell 2000 (12) 647 – 662). Esto es técnicamente complicado en plantas madereras tales como árboles. Hertzberg et al. y Schrader et al. han estudiado el desarrollo secundario del xilema del álamo,

que está altamente organizado con límites distintivos y fácilmente reconocibles entre los diferentes estados de desarrollo. La formación de la madera se inicia en el cambium vascular. Los derivados cambiales se desarrollan en las células del xilema durante el proceso de división, expansión, formación de paredes secundarias, lignificación y finalmente, muerte celular programada. El gran tamaño físico del meristemo vascular en los árboles ofrece una posibilidad única para obtener muestras a partir de estados de desarrollo definidos, mediante seccionamiento criostático tangencial (Ugglia et al., 1996 Proc. Natl. Acad. Sci USA, 1996 (93), 9289 – 9286). Para determinar los niveles de estado estable de ARNm en estados específicos durante la ontogénesis de la formación de la madera en *Populus tremula x tremuloides* (álamo temblón híbrido) fueron muestreadas secciones de 30 µm de espesor de la región en desarrollo de la madera, y luego fueron analizados usando varias micromatrices manchadas de ADNc (Schena et al., 1995 Science 1995 (270) 467 – 470) que contienen hasta 20.000 EST únicos de álamo híbrido.

La secuencia en la presente invención, SEQ ID NO: 15, se ha identificado en una biblioteca de ADNc de cambio de *Populus tremula*, con el nombre de clon de ADNc UB12CPE03, en el número de referencia de la base de datos del EMBL CK096393, publicado en línea el 2 de diciembre de 2003 y por Sterky et al., P.N.A.S, vol. 101, n.º 38, p. 13951-13956, 2004. Este informe presenta más de 100.000 EST y representa una parte sustancial del genoma de *Populus tremula*. Sterky et al no presenta un método para aumentar el crecimiento en comparación con su tipo silvestre suprimiendo este gen.

Aunque sea obvio que resulta de los programas EST, los estudios de expresión y secuenciación de genomas usando tecnologías de matrices de ADN pueden verificar dónde y cuándo se expresa un gen, es raramente posible clarificar la función biológica y/o técnica del gen sólo a partir de estos tipos de herramientas analíticas. Para analizar y verificar la función del gen, la caracterización funcional debe ser ejecutada, por ejemplo, mediante inactivación del gen y/o sobreexpresión génica. Sin embargo, para hacer posible la identificación de los genes de interés y con rasgos comerciales casi siempre inesperados, hay necesidad de nuevas plataformas analíticas evalúen genes candidatos basándose en múltiples criterios.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a una plataforma analítica nueva y exhaustiva para seleccionar genes con un fenotipo comercial posible a partir de un gran grupo de genes candidatos identificados usando herramientas bioinformáticas, datos de secuenciación EST y matrices de ADN. La plataforma analítica se concentra en análisis del comportamiento de crecimiento basándose en una combinación de múltiples criterios. La invención proporciona un método para producir una planta transgénica cambiando la expresión de uno o más genes seleccionados entre un grupo de genes que cumplen dichos criterios.

Por lo tanto, un aspecto de la presente invención proporciona un método de producción de una planta transgénica que presenta un crecimiento aumentado en comparación con el de su tipo silvestre, que comprende alterar en la planta el nivel de un producto génico de al menos un gen expresado específicamente durante diferentes fases de la formación de la madera.

La presente invención se refiere a y abarca los siguientes artículos.

1. Un método para producir una planta maderera que tiene un crecimiento aumentado en comparación con su tipo silvestre, que comprende suprimir en la planta el nivel de un producto génico expresado específicamente durante las fases de formación de la madera que está codificado por

- a) la secuencia de nucleótido de SEQ ID NO: 15 o;
- b) una secuencia de nucleótido que es al menos un 70 % idéntica a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 15;

en el que la expresión se suprime mediante interferencia de ARN.

2. Un método de acuerdo con el artículo precedente, en el que dicha expresión se suprime proporcionando una construcción de ADN recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre el grupo que consiste en

- d) una secuencia de nucleótido complementaria a la secuencia de nucleótido de SEQ ID NO: 15; y
- e) una secuencia de ácido nucleico que es al menos un 70 % idéntica a una cualquiera de las secuencias en d);

y expresar la construcción de ADN recombinante en la planta transgénica para producir un transcrito de ARN.

3. El método de acuerdo con el artículo 2, en el que la secuencia de nucleótido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 36 o una secuencia de nucleótido complementaria de la misma.

4. El método de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 1 a 3, en el que la secuencia de nucleótido codifica un polipéptido que comprende una variante sustituida de manera conservativa de un polipéptido de (a).

5. El método de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 1 a 4, en el que la secuencia de nucleótido comprende una sustitución silente en una secuencia de nucleótido.

6. El método de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 1 a 5, en el que la construcción de ADN recombinante comprende además un promotor constitutivo, inducible o específico de tejido unido operativamente a dicha secuencia de nucleótido, tal como un promotor constitutivo fuerte en frente de un casete transcrito que comprende una secuencia de nucleótido tal como se define en el artículo 2 seguido de un intrón funcional en plantas seguido de la secuencia de nucleótido tal como se define en el artículo 2 en orientación inversa.

7. El método de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 1 a 6, en el que el método comprende la etapa adicional de transformar células regenerables de una planta leñosa con dicha construcción de ADN recombinante y regenerar una planta leñosa transgénica a partir de dicha célula transformada.

8. El método de acuerdo con uno cualquiera de los artículos precedentes, en el que la planta leñosa transgénica se selecciona entre el grupo de *Populus* o una conífera que puede seleccionarse entre el grupo que consiste en ciprés, abeto de Douglas, abeto, secoya, cicuta, cedro, enebro, alerce, secoya, abeto y tejo o un frutal que puede seleccionarse entre el grupo que consiste en manzano, ciruelo, peral, bananero, naranjo, kiwi, limonero, cerezo, parra e higera, o en el que la planta leñosa se selecciona entre el grupo que consiste en algodón, bambú y plantas del caucho, una planta de madera dura que puede seleccionarse entre el grupo que consiste en acacia, eucalipto, carpe, haya, caoba, nogal, roble, fresno, sauce, nogal, abedul, castaño, álamo, aliso, arce, sicómoro, ginkgo, una palmera y la goma dulce, tales como de las salicáceas, incluyendo variantes de los mismos.

9. Una planta leñosa transgénica que tiene una altura de crecimiento aumentada en comparación con su tipo silvestre con expresión suprimida del producto génico expresado específicamente durante las fases de formación de la madera, que comprende una construcción de ADN recombinante que comprende una secuencia de nucleótido seleccionada entre el grupo que consiste en:

- a) una secuencia de nucleótido complementaria a la secuencia de nucleótido de SEQ ID NO: 15;
- b) una secuencia de ácido nucleico que es al menos un 70 % idéntica a una cualquiera de las secuencias en a); y
- c) una secuencia de nucleótido que hibrida en condiciones rigurosas con una secuencia de nucleótido de a), b) o c).

10. Una construcción de ADN que comprende al menos una secuencia descrita en uno cualquiera de los artículos 1 a 6.

11. Una célula vegetal leñosa o una progenie de planta leñosa que comprende la construcción de ADN de acuerdo con el artículo 10.

Descripción de las Figuras

La Fig. 1 muestra las diferentes fases de la formación de la madera, donde (A) es un corte transversal de un tronco de un álamo híbrido teñido con azul de Toluidina. Las barras negras indican el lugar de los tejidos muestreados. La muestra de floema se incluyó para dar una descripción de baja resolución de la expresión génica en otro tejido derivado de cambium. (B) es una representación esquemática de tipos de células diferentes y de estados durante el desarrollo vascular. Las barras ilustran el tiempo y la extensión de los diferentes estados de desarrollo y la apariencia de los componentes importantes de la pared celular. (C) muestra el análisis de agrupamiento jerárquico de 1791 genes seleccionados con los patrones de expresión diferencial diferentes, con la relación de la expresión en escala log2. Las muestras están indicadas al final de la figura.

La Fig. 2 muestra los patrones de expresión para los genes seleccionados a partir de los datos de diferenciación del xilema. Nueve ejemplos de genes seleccionados a partir del conjunto de datos de Hertzberg et al. (2001) para análisis funcional en el álamo híbrido. Las mismas muestras y figura como los de la Figura 1D. El gráfico muestra el patrón de expresión de aquellos genes sobre la zona de diferenciación de xilema. Los niveles de expresión están indicados en escala logarítmica.

La Fig. 3 muestra los patrones de expresión para los genes seleccionados a partir de los datos del experimento del meristemo. Seis ejemplos principales de genes seleccionado del conjunto de datos de Schrader et al. (2004), para análisis funcional en álamo híbrido. Las mismas muestras y figura como los de la Figura 1D. Los gráficos muestran el patrón de expresión de aquellos genes sobre la zona cambial. Los datos de expresión es de las series B de Schrader et al. (2004). Los valores de expresión están en escala logarítmica, para la explicación de normalización y preparación de datos. (véase Schrader et al., 2004).

La Fig. 4 muestra un ejemplo de curva de altura de crecimiento, mostrando las rectas de regresión lineal tomando puntos de cuatro datos consecutivos diferentes, la recta de regresión lineal de color negro muestra la altura máxima de velocidad de crecimiento.

5 Descripción detallada de la invención

Definiciones

Antes de discutir la presente invención en más detalle, se definirán en primer lugar los siguientes términos y convenciones:

El término "planta transgénica" se refiere a una planta que contiene material genético no encontrado en la especie silvestre de la planta de la misma especie, variedad o cultivar. El material genético puede incluir un transgen, un evento de mutagénesis insercional (tal como mutagénesis por transposón o insercional de ADN-T), una secuencia marcadora de activación, una secuencia mutada, un evento de recombinación homólogo o una secuencia modificada por quimeroplastia. Normalmente, el material genético exógeno se ha introducido en plantas mediante manipulación humana. El término también se refiere a plantas en las que el material genético se han insertado para funcionar como un marcador de selección. Los ejemplos de dichos marcadores incluyen kanamicina, higromicina, fosfoinotricina, clorsulfrón, metotrexato, gentamicina, espectinomicina, imidazolinonas, d-aminoácidos y glifosato.

En el presente contexto el término "crecimiento" incluye el crecimiento primario, que incluye el alargamiento del tallo y las raíces, así como el desarrollo secundario de la planta, que incluye la producción de tejido secundario, la "madera", a partir del cambium y el incremento el diámetro del tallo y de las raíces. Por lo tanto, la expresión "aumento del crecimiento" se refiere en el presente contexto al aumento del crecimiento de la planta transgénica en relación con la planta de tipo silvestre a partir de la cual procede la planta transgénica, cuando crece en las mismas condiciones. Como se describe a continuación, una planta transgénica se caracteriza por tener un incremento del desarrollo si la planta reúne al menos una de los "criterios de selección de desarrollo diferente" tal como se define en los ejemplos más adelante.

El término "fenotipo" se refiere en el presente contexto a la apariencia física total de una planta particular, tal como por ejemplo, el crecimiento. Los ejemplos de fenotipos de desarrollo diferente se usan en el presente contexto se listan en la Tabla 1.2 más adelante y comprenden, por ejemplo, un fenotipo llamado AFP que se refiere a la altura final promedio de una población de tipo silvestre y de cada construcción de grupo de población o por ejemplo el fenotipo llamado DFP diámetro final promedio de la población de tipo silvestre y de cada construcción de grupo de población.

En el contexto de la presente invención la expresión "fases de formación de madera" se refiere a los estados de formación de madera, tales como la división celular y la expansión celular, tal como se define en: Wilson, B.F., Wodzicki, T.J. y Zhaner, R. (1966), Differentiation of cambial derivatives: Proposed terminology. Forest Science 12, pp 438-440.

Cuando se plantea que un gen está específicamente expresado durante fases diferentes de la formación de la madera, el término "específicamente expresado" se usa como una designación de genes, cuya expresión aumenta durante las fases de formación de la madera. Se entenderá que la expresión de dichos genes durante las fases de formación de la madera puede haberse incrementado en un 10 % o más, tal como en un 15 % o más, en un 20 % o más, en un 25 % o más, en un 30 % o más, en un 40 % o más, en un 50 % o más, en un 75 % o más, en un 100 % o más, en un 200 % o más, en un 300 % o más, en un 400 % o más, en un 500 % o más, en un 700 % o más o en un 1000 % o más.

El término "gen" en sentido amplio se refiere a cualquier segmento de ADN asociado con una función biológica. Los genes incluyen secuencias codificantes y/o secuencias reguladoras requeridas para su expresión. Los genes incluyen también segmentos de ácidos nucleicos ADN no expresados que, por ejemplo, formen secuencias de reconocimiento para otras proteínas (por ejemplo, promotores, potenciadores, u otras regiones reguladoras). Los genes pueden obtenerse a partir de diversas fuentes, incluyendo clonación de una fuente de interés o síntesis a partir de información de secuencias predichas o conocidas, y pueden incluir secuencias diseñadas para obtener parámetros deseados.

El término "ARN de interferencia" o "ARNi" se refiere en general al proceso en el cual una molécula de ARN bicatenario o un ARN de horquilla corta cambia la expresión de una secuencia de ácido nucleico con la cual ella comparte homología total o sustancial.

El término "regulación negativa de ARNi" se refiere a la reducción en la expresión de la secuencia del ácido nucleico mediada por una o más especies de ARNi. El término "especies de ARNi" se refiere a distintas secuencias de ARN que produce como respuesta ARNi.

El término "fotoperíodo" se refiere al ciclo diario de luz y oscuridad.

Las expresiones “construcción de ácido nucleico”, “construcción de ADN” y “vector” se refieren a una secuencia genética usada para transformar plantas u otros organismos. La construcción de ácido nucleico o construcción de ADN puede ser capaz de dirigir, en una planta transformada, la expresión de una proteína o de una secuencia de ácido nucleico, tal como por ejemplo, un ARN antisentido. Normalmente, dicha construcción de ácido nucleico o construcción de ADN comprende al menos una región codificante para un producto génico deseado o un producto de ácido nucleico deseado funcionalmente enlazado a los elementos reguladores transcripcionales 5' y 3'. En algunas realizaciones, dichas construcciones de ácido nucleico o construcciones de ADN son quiméricas, es decir, consistentes en una mezcla de secuencias a partir de diferentes fuentes. Sin embargo, las construcciones de ácido nucleico o construcciones de ADN no quimérico también pueden usarse en la presente invención.

El término “recombinante” cuando se usa con referencia, por ejemplo, a una célula, nucleótido, vector, proteína o polipéptido, normalmente indica que la célula, el nucleótido o el vector han sido modificados mediante la introducción de ácido nucleico heterólogo (o exógeno) o la alteración del ácido nucleico nativo, o que la proteína o el polipéptido han sido modificados mediante introducción de un aminoácido heterólogo, o que la célula procede de una célula modificada de este modo. Las células recombinantes expresan secuencias de ácido nucleico (por ejemplo, genes) que no se han encontrado en la forma nativa (no recombinante) de la célula o expresan secuencias de ácido nucleico nativo (por ejemplo, genes) que pudieron estar anormalmente expresados, infra-expresados o no expresados. El término “recombinante” cuando está usado en referencia a una célula indica que la célula replica un ácido nucleico heterólogo, o expresa un péptido o proteína codificada mediante el ácido nucleico heterólogo. Las células recombinantes pueden contener genes que no se encontraron en la forma nativa (no recombinante) de la célula. Las células recombinantes también pueden contener ciertos genes encontrados en la forma nativa de la célula en donde los genes están modificados y reintroducidos en la célula por medios artificiales. El término también abarca células que contienen un ácido nucleico endógeno a la célula que ha sido modificado sin remover el ácido nucleico de la célula; tales modificaciones incluyen aquellas obtenidas mediante reemplazo de gen, mutación in situ específico, y técnicas relacionadas.

El término “secuencia de ácido nucleico” se refiere a un polímero de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos en forma tanto mono como bicatenaria. A menos que se limite específicamente, el término abarca las secuencias de ácido nucleico que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de enlace similares al ácido nucleico de referencia y son metabolizados de manera similar a los nucleótidos de ocurrencia natural. A menos que se indique de otro modo, una secuencia de ácido nucleico particular implícitamente también abarca variantes modificadas de manera conservativa de los mismos (esto es, sustituciones de codones degenerados) y secuencias complementarias así como la secuencia indicada explícitamente.

Un “polinucleótido” es una secuencia de ácido nucleico que comprende una pluralidad de restos de nucleótidos polimerizados, por ejemplo, al menos aproximadamente 15 restos de nucleótidos polimerizados consecutivos, opcionalmente al menos 30 nucleótidos consecutivos, al menos 50 nucleótidos consecutivos. En muchos casos, el polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos que codifica al polipéptido (o proteína) o un dominio o un fragmente del mismo. Adicionalmente, el polinucleótido puede comprender un promotor, un intrón, una región mejorada, un lugar de poliadenilación, un lugar de inicio de la traducción, regiones 5' o 3' no traducidas, un gen indicador, un marcador seleccionable, o similar. El polinucleótido ser ARN o ADN mono o bicatenario. El polinucleótido comprende opcionalmente bases modificadas o un armazón modificado. El polinucleótido puede ser, por ejemplo, un ARN o ADN genómico, un transcrito (tal como el ARNm), un ADNc, un producto PCR, un ADN clonado, un ARN o ADN sintético o similar. El polinucleótido puede comprender una secuencia tanto en orientación sentido como antisentido.

El término “polipéptido” se usa de forma amplia para definir cadenas lineales de restos de aminoácidos, incluyendo restos aparecen en análogos naturales y análogos sintéticos de los mismos.

En el contexto de la presente invención, “complementario” se refiere a la capacidad de emparejamiento preciso de dos secuencias de nucleótidos entre sí. Por ejemplo, si un nucleótido en una posición determinada de un oligonucleótido es capaz de formar enlaces de hidrógeno con un nucleótido en la posición correspondiente de una molécula de ADN o ARN, entonces se considera que el oligonucleótido y el AND o ARN son complementarios entre sí en esa posición. Las cadenas de ADN o ARN se consideran complementarias entre sí cuando un número suficiente de nucleótidos en el oligonucleótido es capaz de formar enlaces de hidrógeno con los nucleótidos correspondientes en el ADN o ARN diana para permitir la formación de un complejo estable.

En el presente contexto, las expresiones “secuencia complementaria” o “complemento” también se refiere, por lo tanto, a las secuencias de nucleótidos que hibridan con una molécula de ácido nucleico de la invención en condiciones rigurosas.

El término “condiciones rigurosas” se refiere en general a las condiciones de alta, débil o baja rigurosidad.

El término “rigurosidad” es bien conocido en la técnica y se usa con referencia a las condiciones (temperatura, fuerza iónica y la presencia de otros compuestos tales como disolventes orgánicos) en las cuales se producen hibridaciones del ácidos nucleicos. En condiciones de “alta rigurosidad”, ocurrirá apareamiento de bases de ácido

nucleico sólo entre fragmentos de ácido nucleico que tengan una alta frecuencia de secuencias bases complementarias, comparado con las condiciones de “débil” o “baja” rigurosidad. Las condiciones apropiadas para examinar la hibridación involucran un pre-remojo en 5xSSC y una pre-hibridación durante 1 hora a aproximadamente 40°C en una solución de formamida al 20 %, solución de Denhardt 5x, fosfato de sodio 50 mM, pH 6,8, y 50 mg de ADN de timo de ternero desnaturalizado sonicado, seguido de hibridación en la misma solución suplementada con ATP 100 mM durante 18 horas a aproximadamente 40°C, seguido de tres lavados del filtro en 2xSSC, SDS al 0,2 % a aproximadamente 40°C durante 30 minutos (baja rigurosidad), preferentemente a 50°C (rigurosidad media), más preferentemente a 65°C (alta rigurosidad), aún más preferentemente a aproximadamente 75°C (muy alta rigurosidad). Mas detalles acerca del método de hibridación pueden encontrarse en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor, 1989.

Los términos “hibridación” e “hibridar” se usan de manera amplia para designar la asociación entre secuencias del ácido nucleico complementarias o parcialmente complementarias, tal como en una inversión del proceso de desnaturalización mediante el cual se separaron. La hibridación ocurre mediante un enlace de hidrógeno, que puede ser Watson-Crick, Hoogsteen, enlace de hidrógeno Hoogsteen invertido, etc... entre bases de nucleótidos o de nucleósidos complementarias. Las cuatro bases de nucleótidos comúnmente encontradas en el ADN son G, A, T y C de las cuales G se empareja con C y A se empareja con T. En el ARN, T es reemplazado por U (Uracilo), el cual se empareja con A. Los grupos químicos en las bases de nucleótidos que participan en la formación duplex estándar constituyen el frente Watson-Crick. Hoogsteen mostró que la nucleobase purina (G y A) adicionalmente a su frente Watson-Crick tiene un frente Hoogsteen que puede ser reconocido a partir de la parte exterior de un duplex, y se usó para enlazar oligonucleótidos de pirimidina vía enlace de hidrógeno, por lo que se forma la estructura de hélice triple.

Una “subsecuencia” o un “fragmento” es cualquier porción de una secuencia completa. Por lo tanto, fragmento o subsecuencia se refiere a la secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos que comprende una parte de la secuencia mayor de aminoácidos (p. ej. un polipéptido) o de ácidos nucleicos (p. ej. un polinucleótido), respectivamente.

En el presente contexto, la homología entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos se describe mediante el parámetro “identidad de secuencia”.

El término “identidad de secuencia” indica una medida cuantitativa del grado de homología entre dos secuencias de aminoácidos o entre secuencias del ácido nucleico de igual longitud. Si las dos secuencias a ser comparadas no son de igual longitud, ellas deben ser alineadas para obtener el mejor ajuste posible, permitiendo la inserción de “gaps” o alternativamente, de truncamientos en los terminales de las secuencias polipéptidos o de las secuencias de nucleótidos. La secuencia de identidad puede calcularse, donde N_{dif} es el número total de restos no idénticos en las dos secuencias cuando están alineadas y donde N_{ref} es el número de restos en una de las secuencias. Por lo tanto, la secuencia ADN AGTCAGTC tendrá una identidad de secuencia del 75 % con la secuencia AATCAATC (donde $N_{dif} = 2$ y $N_{ref} = 8$). El “gap” es contado como no identidad de los restos específicos, esto es, la secuencia ADN AGTGTC tendrá una identidad de secuencia del 75 % con la secuencia ADN AGTCAGTC (donde $N_{dif} = 2$ y $N_{ref} = 8$).

Con respecto a todas las realizaciones de la invención relativas a las secuencias de nucleótidos, el porcentaje de secuencia idéntica entre una o más secuencias puede también estar basado en los alineamientos usando el software clustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalW/index.html>) con ajustes predefinidos. Para alineamientos de secuencias de nucleótidos estos ajustes son: Alineamiento = 3D completo, Gap Open 10,00, Gap Ext. 0,20, Distancia de Separación de Gap 4, Ponderación de la Matriz de ADN: identidad (IUB). Como alternativa, las secuencias pueden ser analizadas usando el programa DNASIS Max y la comparación de las secuencias puede ser hecha en <http://www.paralign.org/>. Este servicio está basado en dos algoritmos de comparación llamados Smith-Waterman (SW) y ParAlign. El primer algoritmo fue publicado por Smith y Waterman (1981) y es un método bastante establecido que encuentra el alineamiento local óptimo de las dos secuencias. El otro algoritmo, ParAlign, es un método heurístico para alineamiento de secuencias; los detalles de el método están publicados en Rognes (2001). Se usaron ajustes predeterminados para puntaje de la matriz, penalidades de Gap y valores E.

La frase “sustancialmente idénticos” o “identidad sustancial” en el contexto de dos ácidos nucleicos o polipéptidos, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que tienen al menos aproximadamente el 60 %, 70 %, 75 %, preferentemente el 80 % u 85 %, más preferentemente el 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, o mayor de porcentaje de identidad de restos de aminoácidos o nucleótidos, respectivamente, cuando son comparados y alineados para su máxima correspondencia, y medidos usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencia o mediante inspección visual. En ciertos aspectos, la identidad sustancial existe sobre una región de secuencias de aminoácidos de al menos aproximadamente 50 restos de longitud, así como, en al menos 100, 110, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, o 165 restos de aminoácidos. En ciertos aspectos, la identidad sustancial existe sobre una región de secuencias de aminoácidos de al menos aproximadamente 150 restos de longitud, así como, en al menos 200, 250, 300, 330, 360, 375, 400, 425, 450, 460, 480, 500, 600, 700, 800, así como en al menos 900 nucleótidos o así como en al menos 1 kb, 1,1 kb, 1,2 kb, 1,3 kb, 1,4 kb, 1,5 kb, 1,6 kb, 1,7 kb, 1,8 kb, 1,9 kb, 2 kb, 2,1 kb, 2,2 kb, 2,3 kb, 2,4 kb, 2,5 kb, 2,6 kb, 2,7 kb, 2,8 kb, 2,9 kb, o así como en al menos 3 kb. En algunos aspectos, las secuencias de ácido nucleico o de aminoácidos son sustancialmente idénticas en la cadena entera de las secuencia polipéptido o en la región bajo codificación correspondiente.

El término “sustituciones conservativas” son: del grupo de aminoácidos básicos (argenina, lisina e histidina), de aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), de aminoácidos polares (glutamina y asparagina), de aminoácidos hidrofóbicos (leucina, isoleucina, valina y metionina), de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptofano y tirosina), y aminoácidos pequeños (glicina, alanina, serina y treonina). Las sustituciones de aminoácidos que no alteran generalmente la actividad específica son conocidas en la técnica y están descritas, por ejemplo, por H. Neurath y R.L. Hill, 1979, en *The Proteins*, Academic Press, New York. Las conmutaciones que más comúnmente ocurren son Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, and Asp/Gly así como estos invertidos.

El término “variante sustituida de manera conservativa” tal como se usa en el presente documento se refiere a una variante de la secuencia de nucleótidos que comprende una o más sustituciones conservativas.

En general y en el presente contexto, el término “sustitución silenciosa” se refiere a una sustitución de una base que no afecta el sentido del codón y por lo tanto no afecta la estructura del polipéptido. Tal como lo conocen los expertos en la técnica las sustituciones silenciosas son posibles debido a la degeneración del código genético.

El término “dominio conservado” se refiere a una secuencia de aminoácidos en un polipéptido o a una secuencia de nucleótidos en el ARN o en el ADN que es similar entre múltiples especies. Un conjunto conocido de secuencias conservadas se representa mediante una secuencia consenso. Los aminoácidos de interés principal están a menudo compuestos de secuencias conservadas. Además, el término “secuencia conservada” se refiere a una secuencia de base en la secuencia del ácido nucleico o en la secuencia de aminoácido en una proteína que permanece esencialmente sin cambio a través de su evolución. Una “secuencia consenso” se definió en términos de una secuencia idealizada que representa la base más a menudo presente en cada posición en la secuencia del ácido nucleico, o el aminoácido más a menudo presente en cada posición en una proteína. La “secuencia consenso” se identificó mediante alineamiento de todos los ejemplos conocidos de la secuencia de ácido nucleico o de la proteína, para maximizar su identidad de secuencia. Para que una secuencia sea aceptada como una secuencia consenso, cada base particular o aminoácido debe ser razonablemente predominante en su posición y la mayoría de las secuencias deben estar relacionada a el consenso solo mediante una pocas sustituciones, una o dos.

El término “promotor”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la región de secuencias determinantes localizadas en la dirección del extremo 5' de la cadena a partir del sitio de comienzo de la transcripción del gen, y que están involucrados en el reconocimiento y en el enlace de la ARN polimerasa y otras proteínas para iniciar y modular la transcripción. Los promotores útiles en las plantas no se necesita que sean de una planta original. Un “promotor basal” es la mínima secuencia necesaria para ensamblar el complejo de transcripción requerido para la iniciación de la transcripción. Frecuentemente, los promotores basales incluye un bloque TATA usualmente localizado entre nucleótido 15 y 35 en la dirección ascendente desde el sitio de iniciación de la transcripción. Los promotores basales algunas veces también incluyen elemento bloque CCAAT (normalmente la secuencia CCAAT) y/o una secuencia GGGCG, usualmente localizado entre los nucleótidos 40 y 200, preferentemente entre los nucleótidos, en la dirección ascendente desde el lugar de comienzo de la transcripción.

Los promotores citados en el presente documento como “promotores constitutivos” promueven activamente la transcripción en muchas, pero no necesariamente todas, las condiciones ambientales y estados de desarrollo o de diferenciación celular. Los ejemplos de promotores constitutivos incluyen la región de iniciación del transcrito 35S del virus mosaico de la coliflor (CaMV, por sus siglas en inglés), y el promotor 1' o 2' derivado del ADNT de *Agrobacterium tumefaciens*, y otras regiones de iniciación de la transcripción de varios genes de plantas, tales como el promotor ubiquitina-1 del maíz, conocido por los expertos en la técnica. Promotores específicos de órganos pueden ser, por ejemplo, un promotor de tejidos de almacenamiento tales como semillas, patatas y frutos, o de tejidos metabólicos tales como meristemos; o un promotor específico de semilla tales como los promotores de glutelina, prolamina, globulina, o albúmina del arroz; o el promotor de legumina B4 de *Vicia faba* y el gen desconocido de la proteína de la semilla de la *Vicia faba*; o el promotor de la semilla de la proteína del aceite, el promotor de almacenamiento de la proteína napA de *Brassica napus*, o cualquier otro promotor de semilla conocido en la técnica, por ejemplo, los que se describen en el documento WO 91/14772. Además, el promotor puede ser un promotor específico de hoja tal como el promotor *rbcs* del arroz o del tomate, el promotor del gen del virus de la clorella, adenina metiltransferasa, o el promotor del gen *aldP* del arroz, o un promotor de lesiones inducibles tal como el promotor *pin2* del tomate.

Un “promotor inducible” en el contexto de la presente invención se refiere a un promotor que está regulado en ciertas condiciones, tales como luz, concentración química, concentración de proteína, condiciones en un organismo, célula u organelo, etc. Un ejemplo de un promotor inducible es el promotor HSP y el PARSK1, el promotor del gen Arabidopsis codificante de la enzima quinasa serina-treonina, el cual está inducido por deshidratación, ácido abscísico y cloruro de sodio. En esencia, la expresión bajo el control de un promotor inducido es “encendida” o incrementada en respuesta al estímulo aplicado. La naturaleza de los estímulos varía entre diferentes promotores y puede incluir factores ambientales como los descritos anteriormente. Sin importar el nivel de expresión que haya en ausencia de los estímulos, la expresión de cualquier promotor inducible se incrementa en presencia de los estímulos correctos.

Tal como se usa en el presente documento, el término “específico de tejido” se refiere a una característica de un tejido particular que no se encuentra en general en todos los tejidos, o puede ser encontrado exclusivo en un tejido de interés. En la presente solicitud, “específico de tejido” se usa en referencia a un elemento regulador del gen (promotor, o promotor más mejorador y/o silenciador), el gen codificado, o el producto polipeptídico de dicho gen. En el contexto de un elemento regulador del gen o de un “promotor específico de tejido”, el término significa que el promotor (y también otros elementos reguladores tales como elementos mejoradores y/o silenciadores) dirige la transcripción de la secuencia enlazada en la célula de un tipo de cepa particular, tejido o célula, que es sustancialmente inactiva en células o tejidos que no sea de este tipo de cepa, tejido o célula. Un promotor específico de tejido útil de acuerdo con la invención es al menos de 5 fold, 10 fold, 25 fold, 50 fold, 100 fold, 500 fold o hasta incluso 1000 veces más activas en términos de producción de transcritos en un tejido particular, que en las células de otros tejidos o en células transformadas o malignas de la misma cepa. En el contexto de un gen o de un producto polipeptídico de un gen, el término “específico de tejido” significa que el producto polipeptídico del gen es detectable en células de un tejido particular o tipo de célula, pero no sustancialmente detectable en otros ciertos tipos de células. Los promotores de tejidos específicos particularmente relevantes incluye secuencias promotoras específicamente expresadas o activas en el tejido de formación del xilema en la planta. Ejemplos de tales promotores son los promotores Lmp1, Lmx2, Lmx3, Lmx4 y Lmx5, descritos en WO2004097024.

Una “secuencia de terminación” se refiere a una sección de secuencia genética que marca el final de un gen u operón sobre ADN genómico para transcripción. Las secuencias terminales son reconocidas por factores que co-transcripcionalmente fija el ARN naciente en la señal de poliadenilación, deteniendo la elongación del transcrito mediante el ARN polimerasa. Un ácido nucleico está “funcionalmente enlazado” cuando está ubicado en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor o mejorador está funcionalmente enlazado a una secuencia en codificación si aumenta la transcripción de la secuencia en codificación. Funcionalmente enlazado significa que las secuencias de ADN que están siendo enlazadas normalmente son contiguas y donde necesariamente se juntan dos regiones de la proteína en codificación, contiguas y en el marco de lectura. Además, dado que en general los mejoradores funcionan cuando están separados del promotor por varias kilobases y por secuencias entrónicas que pueden ser de varias longitudes, algunos elementos polinucleótidos pueden estar funcionalmente enlazados, pero no contiguos.

En el contexto de la presente invención el término “transformación” y “transformante” son usados indistintamente y como sinónimos de “transfección”, para referir al procesos de introducción de ADN en una célula. Las construcciones de ADN, incluyendo al menos una porción del gen o promotor de interés, pueden ser introducidos en las células hospedadoras, que como se dijo previamente, pueden ser células individuales, células en cultivo, células como parte de un organismo huésped, un orgamotofito oocito fertilizado o una célula embrionica. Por el término “introducción” cuando se usa en referencia a la célula hospedadora significa que se refiere a procedimiento estándares conocidos en la técnica para la introducción de un vector ADN recombinante en la célula hospedadora objetivo. Tales procedimientos incluye, pero no se limita a, transfección, infección, transformación, ingesta natural, electroporación, biolística y *Agrobacterium*.

Por “célula regenerable” se entiende una célula vegetal a partir de la cual puede regenerarse una planta completa. Se entenderá que la célula regenerable es una célula que ha mantenido su potencial genético, también conocido en la técnica como “totipotencia”. Además se entenderá que las células regenerables, cuando crecen en cultivo, pueden necesitar los estímulos adecuados para expresar el potencial genético total de la planta progenitora.

Método de producción de una planta transgénica

Análisis Funcional para selección de genes

Los genes candidatos para su uso en cambios o modificaciones del fenotipo de la planta en cuanto al desarrollo pueden ser identificados usando procedimientos de la técnica anterior, por ejemplo, como el descrito por Hertzberg et al. (2001) y Schrader et al. (2004). Los genes candidatos involucrados en el desarrollo pueden también ser identificados, por ejemplo, entre factores de transcripción con características especiales, identificados usando la técnica anterior conocido. Tal identificación de genes candidatos es conocida en la técnica como importante para maximizar la respuesta positiva de los programas funcionales genómicos dirigidos contra el desarrollo de la relación propiedades/funciones. Por consiguiente, un primer aspecto de la presente invención es proporcionar un método de producción de una planta transgénica que presenta un desarrollo aumentado en comparación con la de su tipo silvestre, que comprende alterar en la planta el nivel de un producto génico de al menos un gen expresado específicamente durante las fases de formación de la madera.

Aunque se basa en el uso como diana de dichos genes candidatos, la presente invención también proporciona un método de producción de una planta transgénica que incluye el gen candidato que además ha sido seleccionado por una estrategia novedosa para análisis funcionales.

De acuerdo con una realización de este aspecto, al menos un gen se seleccione para conformar el criterio de que la baja regulación del ARNi de dicho gen en un grupo de 3-8 plantas transgénicas cause:

- a) una diferencia del 5 % o más en el altura final promedio (AFP) y en la altura final máxima (AFM) y en el índice de desarrollo de altura máxima promedio (IDAMP) y en el máximo índice de desarrollo de altura máxima (MIDAM); y/o
- b) una diferencia del 5 % o más en el diámetro final promedio (DFP), y en el diámetro final máximo (DFM), y en el índice de desarrollo del diámetro promedio (IDDP), y en el coeficiente del diámetro máximo (CDM); y/o
- c) una diferencia del 18 % o más en la altura final promedio (AFP) y/o en el diámetro final promedio (DFP) y/o en el índice de desarrollo de altura máxima promedio (IDAMP) y/o en el índice de desarrollo del diámetro promedio (IDDP); y/o
- d) una diferencia del 18 % o más en la altura final máxima (AFM) y/o en el diámetro final máximo (DFM) y/o en el máximo índice de desarrollo de altura máxima (MIDAM) y/o en el coeficiente del diámetro máximo (CDM);

cuando se compara dicho grupo de plantas transgénicas crecidas durante 8 semanas en un invernadero bajo un fotoperíodo de 18 horas, a una temperatura de 22°C/15°C (día/noche) y una semana de fertilización con 84 g/l de N, 2 g/l de P1, 56 g/l de K, con el grupo de plantas del tipo silvestre creciendo bajo idénticas condiciones; y en el que el nivel de altura máxima de desarrollo se define calculando la pendiente de una función lineal ajustada por cuatro puntos consecutivos de los datos de altura, donde el valor del nivel de altura de desarrollo se calculó para los datos de los puntos 1 a 4, para los datos de los puntos 2 a 5, etc.. paso a paso, y el valor del nivel de altura máxima de desarrollo se seleccionó finalmente a partir de los valores de nivel de desarrollo de cada planta.

Existe disponible actualmente bajo la marca Weibulls Rika NPK7-1-5 un fertilizante que contiene 84 gramos de N por litro, 2 gramos de P1 por litro, y 56 gramos de K por litro. La composición de este fertilizante es la que sigue (todo en g/l): N tot = 84, NO₃ = 55, NH₄ = 29, P = 12, K = 56, Mg = 7,2, S = 7,2, B = 0,18, Cu = 0,02, Fe = 0,84, Mn = 0,42, Mo = 0,03, Zn = 0,13.

En otra realización se aplica un conjunto mas estricto de criterios. De acuerdo con esta realización al menos un gen es seleccionado para conformar el criterio de que la baja regulación del ARNi de dicho gen en un grupo de 3-8 plantas transgénicas cause:

- a) una diferencia del 8 % o más en el altura final promedio (AFP) y en la altura final máxima (AFM) y en el índice de desarrollo de altura máxima promedio (IDAMP) y en el máximo índice de desarrollo de altura máxima (MIDAM); y/o
- b) una diferencia del 8 % o más en el diámetro final promedio (DFP), y en el diámetro final máximo (DFM), y en el índice de desarrollo del diámetro promedio (IDDP), y en el coeficiente del diámetro máximo (CDM); y/o
- c) una diferencia del 22 % o más en la altura final promedio (AFP) y/o en el diámetro final promedio (DFP) y/o en el índice de desarrollo de altura máxima promedio (IDAMP) y/o en el índice de desarrollo del diámetro promedio (IDDP); y/o
- d) una diferencia del 22 % o más en la altura final máxima (AFM) y/o en el diámetro final máximo (DFM) y/o en el máximo índice de desarrollo de altura máxima (MIDAM) y/o en el coeficiente del diámetro máximo (CDM);

cuando se compara dicho grupo de plantas transgénicas crecidas durante 8 semanas en un invernadero bajo un fotoperíodo de 18 horas, a una temperatura de 22°C/15°C (día/noche) y una semana de fertilización con 84 g/l de N, 2 g/l de P1, 56 g/l de K, con el grupo de plantas del tipo silvestre creciendo bajo idénticas condiciones;

y donde el nivel de altura máxima de desarrollo se define calculando la pendiente de una función lineal ajustada por cuatro puntos consecutivos de los datos de altura, donde el valor del nivel de altura de desarrollo se calculó para los datos de los puntos 1 a 4, para los datos de los puntos 2 a 5, etc.. paso a paso, y el valor del nivel de altura máxima de desarrollo se seleccionó finalmente a partir de los valores de nivel de desarrollo de cada planta. Una ventaja de la presente invención es que proporciona una plataforma analítica extremadamente sensible para evaluar genes candidatos involucrados en la determinación de las características de desarrollo. Mientras que los métodos de evaluación de genes se han basado hasta el momento en la evaluación de fenotipos de acuerdo con un único criterio, tal como el diámetro o la altura de la planta, el presente método permite caracterizar un fenotipo basándose en múltiples criterios, incluyendo altura promedio final, altura final máxima, nivel promedio de desarrollo de altura máxima promedio, y el máximo nivel de desarrollo de altura máxima. El uso de esta plataforma analítica permite la identificación y selección de nuevos genes objetivos para ser usado en métodos para la generación de plantas que tengan desarrollo incrementado. Usando una aproximación más simple, estos genes objetivos no habrían sido considerados como involucrados en la determinación de las características de desarrollo o ellos sólo hubieran sido considerados jugando un rol marginal en la generación del desarrollo del fenotipo.

En realizaciones específicas de la invención los fenotipos ventajosos en la planta son generados modificando, en relación con la correspondiente planta de tipo silvestre, la expresión del nivel de genes candidatos que han sido evaluados y seleccionados de acuerdo conl criterio anterior. De acuerdo con estos aspectos se proporciona un método que comprende la alteración en la planta del nivel de el producto génico de al menos un gen que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre el grupo que consiste en:

- a) la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:1-17, 50, 51, 54-58, 60; así como SEQ ID NO: 1, 2, 5, 6, 10, 13, 15, 16, 17, 50, 51, 54, 55, 56, 57, 58, 60;
- b) la secuencia de nucleótidos que sea al menos un 60 % idéntico a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:1-17, 50, 51, 54-58, 60; así como SEQ ID NO: 1, 2, 5, 6, 10, 13, 15, 16, 17, 50, 51, 54, 55, 56, 57, 58, 60;

- c) la subsecuencia o el fragmento de la secuencia de nucleótidos de a) o b).

La secuencia especificada por el número de ID de secuencia 15 representa secuencias parciales de los genes candidatos clonados del álamo híbrido. Como entenderá el experto en la materia, puede lograrse una secuencia adicional a partir de esos genes 5' así como 3' respecto de la secuencia descrita en la SEQ ID NO: 15 usando técnicas de clonación convencionales, tales como aquellas descritas en Sambrook et al.

Construcciones de ácidos nucleicos

De acuerdo con más particulares realizaciones de la invención, el método comprende el paso de proporcionar una construcción de ácido nucleico, tal como una construcción de un ADN recombinante, que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre el grupo que consiste en:

- d) una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia seleccionada de la SEQ ID NO: 15;
- e) una secuencia de nucleótidos complementaria de la secuencia de nucleótidos de d);
- f) una subsecuencia o el fragmento de la secuencia de nucleótidos de d) o e);
- g) una secuencia de ácido nucleico que sea al menos 60 % idéntica a cualquiera de las secuencias en d), e) y f);
- y
- h) una secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones rigurosas a una secuencia de nucleótidos de d), e) o f).

En realizaciones adicionales de la invención la secuencia de ácido nucleico en c) o g) es al menos un 65 % idéntica a cualquiera de las secuencias en a), c), d), e) o f), o al menos un 70 % idéntica, o al menos un 75 % idéntica; o al menos un 80 % idéntica, o al menos un 85 % idéntica, o al menos un 87 % idéntica, o al menos un 90 % idéntica, o al menos un 95 % idéntica, o al menos un 97 % idéntica; o al menos un 98 % idéntica, o al menos un 99 % idéntica, o al menos un 99,5 % idéntica a cualquiera de las secuencias en a), c), d), e) o f).

En realizaciones preferidas de este aspecto de la invención la secuencia de nucleótidos de a) es seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, 5, 6, 9, 11, 12, 15, 17, 56, 57 y 58.

Existe en la técnica diversos métodos para producir las secuencias de ácido nucleico y las construcciones de ácido nucleico/ADN de la invención. Los procedimientos para identificar y aislar clones de ADN son bien conocidos por los expertos en la técnica, y están descritos en, por ejemplo, Sambrook et al., en *Molecular Cloning-A Laboratory Manual* (2ª Ed.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Como alternativa, las secuencias de ácidos nucleicos de la invención pueden producirse mediante diversos métodos de amplificación *in Vitro* adaptados a la presente invención mediante selección apropiada de promotores específicos o degenerados. Ejemplos de protocolos suficientes para orientar a personal del arte a través de métodos de amplificación *in Vitro* incluyen la reacción en cadena de polimerasa (PCR), la reacción encadena de ligasa (LCR), amplificación Qbeta replicasa y otras técnicas intermediadas por ARN polimerasa (por ejemplo, NASBA), por ejemplo para la producción de los ácidos nucleicos homólogos de la invención se encuentran en Sambrook, anteriormente citado.

Como alternativa, las construcciones de ácidos nucleicos de la invención pueden ser ensambladas a partir de fragmentos producidos por métodos de síntesis de fase sólida. Normalmente, fragmentos de hasta aproximadamente 100 bases son sintetizados individualmente y luego enzimáticamente o químicamente ligados para producir la secuencia deseada, por ejemplo, el polinucleótido codificante de todos o parte de un factor de transcripción. Por ejemplo, síntesis química usando el método de la fosforamidita es muy conocido por los expertos. De acuerdo con tales métodos, los oligonucleótidos son sintetizados, purificados, templados a su cadena complementaria, ligados y opcionalmente luego clonados al vector apropiado.

Tal como se mencionó antes, las secuencias arriba descritas son de álamo híbrido. Tal como los expertos lo saben, los homólogos de las secuencias descritas pueden ser aislados de otras especies, ejemplos no limitante de las mismas incluye: acacia, eucaliptos, carpino, haya, caoba, nogal, roble, nogal americano, abedul, castaño, aliso, arce, sicomoro, ginkgo, palma, gomero, ciprés, abeto Douglas, abeto, secuoya, cicuta, cedro, enebro, alerce, pino, pino rojo, picea y tejo, manzano, ciruelo, peral, banano, naranjo, kiwi, limonero, cerezo, vid y parra, higuera, algodón, bambú, cauchero, pasto cario rojo. Los homólogos útiles de las secuencias descritas pueden ser aislados también de plantas de madera dura de la familia de la *Salicaceae*, por ejemplo, del género *salix* o *populus*. Los miembros de estos géneros son conocidos por sus nombres más comunes: sauce, tulípero y álamo.

En particular, la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la invención comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 18-38, o una secuencia de nucleótidos complementaria de la misma.

Está claro que las subsecuencias o el fragmento en c) o f) descritos antes comprende al menos 15 nucleótidos, así como al menos 16 nucleótidos, o al menos 17 nucleótidos, o al menos 18 nucleótidos, o al menos 19 nucleótidos, o al menos 20 nucleótidos, o al menos 21 nucleótidos, o al menos 22 nucleótidos, o al menos 23 nucleótidos, o al menos 23 nucleótidos, o al menos 24 nucleótidos, o al menos 25 nucleótidos, o al menos 30 nucleótidos, o al menos 35 nucleótidos, o al menos 40 nucleótidos, o al menos 45 nucleótidos, o al menos 50 nucleótidos, o al menos 55

nucleótidos, o al menos 60 nucleótidos, o al menos 65 nucleótidos, o al menos 70 nucleótidos, o al menos 75 nucleótidos, o al menos 80 nucleótidos, o al menos 85 nucleótidos, o al menos 90 nucleótidos, o al menos 95 nucleótidos, o al menos 100 nucleótidos. En ciertas realizaciones, las subsecuencias o el fragmento en c) o f) descritos antes comprende al menos 150 restos de aminoácidos, así como, en al menos 200, 250, 300, 330, 360, 375, 400, 425, 450, 460, 480, 500, 600, 700, 800, así como en al menos 900 nucleótidos o así como en al menos 1 kb, 1,1 kb, 1,2 kb, 1,3 kb, 1,4 kb, 1,5 kb, 1,6 kb, 1,7 kb, 1,8 kb, 1,9 kb, 2 kb, 2,1 kb, 2,2 kb, 2,3 kb, 2,4 kb, 2,5 kb, 2,6 kb, 2,7 kb, 2,8 kb, 2,9 kb, o así como en al menos 3 kb.

En particular, el método de acuerdo con la presente invención puede comprender el paso de proporcionar la construcción de un ácido nucleico, así como la construcción de un ADN recombinante, comprendiendo una secuencia de nucleótidos que es relativa a la secuencia particular descrita, que comprende variaciones conservativas que alteran solo uno, o pocos aminoácidos en el polipéptido codificado, que pueden ser proporcionados y usados de acuerdo con la presente invención. En consecuencia, está dentro del alcance de la invención proporcionar y usar una construcción de ADN recombinante que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica al polipéptido que comprende la variante sustituida de manera conservativa del polipéptido de a).

Las alteraciones que no cambian la secuencia de aminoácidos codificados por el polipéptido son llamadas "sustituciones silenciosas". Con la excepción de los codones ATG y TGG, codificantes de la metionina y el triptofano respectivamente, cualquiera de los posibles codones para el mismo aminoácido pueden ser sustituidas mediante varias técnicas, por ejemplo, mutagénesis dirigida a un lugar, disponible en la técnica. En consecuencia, la presente invención también puede proporcionar una construcción de ácido nucleico recombinante, en donde la secuencia de nucleótidos comprende una sustitución silenciosa en la secuencia de nucleótidos.

Además, en ciertas realizaciones de la invención, las subsecuencias o los fragmentos tienen al menos un 65 % idéntica a cualquiera de las secuencias en a), c), d), e) o f), o al menos un 70 % idéntica, o al menos un 75 % idéntica; o al menos un 80 % idéntica, o al menos un 85 % idéntica, o al menos un 87 % idéntica, o al menos un 90 % idéntica, o al menos un 95 % idéntica, o al menos un 97 % idéntica; o al menos un 98 % idéntica, o al menos un 99 % idéntica, o al menos un 99,5 % idéntica a cualquiera de las secuencias en a), o d).

Métodos para obtener alteración en el nivel del producto génico

Esta invención se usa para disminuir o en algunas instancias anular la expresión de ciertos genes, ejemplos no limitantes de cómo esto se puede lograr son presentados en este documento. La construcción de ácido nucleico o la construcción de ADN recombinante como se describió anteriormente puede ser usada para la identificación de plantas que tienen alteradas las características de desarrollo comparadas con la de su especie salvaje. En tales plantas pueden ocurrir variantes naturalmente, o pueden aparecer en aquellas que hayan sido genéticamente modificadas para exhibir dichas propiedades de desarrollo alteradas. Para tales propósitos la construcción de ácido nucleico o la construcción de ADN recombinante de acuerdo con la invención pueden usarse, por ejemplo, como prueba en ensayos de hibridación convencionales o como promotores para la amplificación específica de fragmentos de ácido nucleico.

A pesar que la parte principal de esta invención es cómo la regulación negativa de los productos del gen dan el efecto deseado, también se muestra que cambiando la expresión de los genes presentados aquí se puede usar para modificar las propiedades deseadas. Esto es otro mecanismo para mirar los datos, y el efecto de esta visión es que también incrementando los productos del gen en la planta es un mecanismo para modificar la característica deseada. Hay diferentes mecanismos para aumentar los niveles del producto génico; estos se describen más adelante en paralelo con los mecanismos para regular negativamente el producto génico.

Estos genes también podrían usarse como dianas para marcar la reproducción asistida porque cambian en las secuencias reguladoras del gen para producir cambios en la función del gen, y sabemos que manipulando estos genes se producen cambios en las características deseadas.

Además, las construcción de ácido nucleico o la construcción de ADN recombinante acorde con la invención pueden usarse con el propósito de reemplazar un gen para modificar el respectivo fenotipo de desarrollo de la planta.

La supresión de la expresión génica endógena puede ser alcanzada usando un ribosoma. Los ribosomas son moléculas de ARN que poseen actividad endoribonucleasa altamente específica. La producción y uso de ribosomas son divulgados en la Patente de Estados Unidos n.º 4.987.071 y 5.543.508. A pesar de que las técnicas antisentido se discuten posteriormente en este documento, debería ser mencionado que las secuencias sintéticas de ribosomas que incluyen ARN antisentido pueden usarse para conferir actividad de clivaje sobre el ARN antisentido, de tal forma que las moléculas de ARNm endógenas que se hibridan a ARN antisentido se separan, lo cual a su vez conduce a una mejora de la inhibición antisentido de la expresión génica endógena.

Los vectores en los que está sobreexpresado el ARN codificado por un gen homólogo relevante también pueden usarse para obtener la supresión conjunta de un gen endógeno correspondiente, por ejemplo, del modo descrito en la Patente de Estados Unidos n.º 5.231.020 de Jorgensen. Dicha cosupresión (también denominada supresión de la

cadena codificante) no requiere que se introduzca la secuencia génica completa en las células vegetales, ni tampoco requiere que la secuencia introducida sea exactamente idéntica a la secuencia de interés endógena. Sin embargo, la eficacia supresora estará potenciada ya que aumenta la especificidad de la hibridación, por ejemplo, a medida que se alarga la secuencia introducida y/o a medida que aumenta la similitud de secuencia entre la secuencia introducida y el gen del factor de transcripción endógeno.

Los vectores que expresan una forma no traducible de un gen, por ejemplo, secuencias que comprenden uno o más codones de parada, o una mutación antisentido, también pueden usarse para suprimir la expresión de un factor de transcripción endógeno, reduciendo o eliminando de este modo su actividad y modificando uno o más rasgos. Los métodos para producir dichas construcciones se describen en la Patente de Estados Unidos n.º 5.583.021. En particular, dichas construcciones pueden producirse introduciendo un codón de parada prematuro en el gen.

Una forma para realizar la inserción dirigida de ADN es mediante el uso del mecanismo de integración de retrovirus como se describe en el documento WO2006/078431. Esta tecnología está basada en la posibilidad de alterar el sitio de integración específica de retrovirus y de retrotransposones integrasa mediante acoplamiento funcional de la integrasa a la proteína ADN enlazante (proteína de amarre). La ingeniería de la integrasa se lleva a cabo preferentemente a nivel del ácido nucleico, mediante modificación de la secuencia codificante de tipo silvestre de la integrasa mediante PCR. El complejo de integrasa puede dirigirse de este modo a la porción deseada o dirigirse lejos de la parte no deseada de ADN genómico, por lo que se produce la integración al sitio característico deseado.

Otra tecnología es la "Lesiones Locales Inducidas en Genomas", que es una ruta no transgénica para alterar la función del gen de un modo dirigido. Este método implica la mutación de la planta con, por ejemplo, metanosulfonato de etilo (EMS) y posteriormente localizar los individuos en los que se ha modificado un gen particular. La tecnología está descrita por ejemplo, en Slade y Knauf *Transgenic Res.* Abril de 2005;14(2):109-15 y Henikoff, Till y Comai, *Plant Physiol.* Junio de 2004;135(2):630-6.

Otro método para suprimir la expresión génica es mediante inserción de mutagénesis usando el ADN-T de *Agrobacterium tumefaciens*. Después generarse los mutantes de inserción, pueden explorarse los mutantes para identificar aquellos que contienen la inserción en un gen adecuado. Las plantas que contengan un solo evento de inserción del transgén en el gen deseado pueden cruzarse para generar plantas homocigotas para la mutación.

Tal como será evidente para los expertos en la materia, también puede modificarse un rasgo vegetal usando el sistema crelox. Puede modificarse un genoma vegetal para que incluya un primer y un segundo sitio de los que después se ponen en contacto con una recombinasa Cre. Dado que los sitios los se encuentran en la misma orientación, se extraerá la secuencia de ADN intermedia entre los dos sitios. Si los sitios de lox se encuentran en orientación opuesta, se invierte la secuencia intermedia.

Los polinucleótidos y los polipéptidos de esta invención pueden también estar expresados en la planta en ausencia del casete de expresión mediante manipulación de la actividad o nivel de expresión génica endógena mediante otros mecanismos, por ejemplo, mediante expresión ectópica de un gen mediante marcación de la activación ADN-T (Ichikawa et al. (197) *Nature* 390 698-701; Kakimoto et al. (1996) *Science* 274: 982-985). Este método implica la transformación de la planta con un gen marcado que contiene múltiples potenciadores transcripcionales y una vez que la marca se ha insertado en el genoma, la expresión de la secuencia en codificación del gen de flaqueo queda liberalizada. En otro ejemplo, el mecanismo transcripcional en la planta puede ser modificado de manera que se incrementen los niveles de transcripción de polinucleótido de la invención (véanse, por ejemplo, las Publicaciones PCT WO 96/06166 y WO 98/53057 que describen la modificación de la especificidad de unión a ADN de proteínas de dedos de cinc mediante el cambio de aminoácidos particulares en el motivo de unión a ADN).

Supresión de la Expresión Antisentido

Sin embargo, la construcción de ADN recombinante, que comprende la secuencia de nucleótidos descrita anteriormente es particularmente útil para la supresión de la expresión sentido y antisentido, por ejemplo, para la regulación negativa de la expresión de un gen particular, para obtener el fenotipo de la planta con desarrollo aumentado. Esto es, la secuencia de nucleótidos de la invención, o las subsecuencias o secuencias antisentido de la misma, pueden usarse para bloquear la expresión de ácidos nucleicos homólogos de origen natural. Las variedades de tecnologías tradicionales sentido y antisentido son conocidas en la técnica, por ejemplo, como la expuesta por Lichtenstein y Nellen (1997), *Antisense Technology: A Practical Approach* IRL Press at Oxford University, Oxford, Inglaterra. El objetivo del método antisentido es usar la secuencia complementaria del gen diana para bloquear su expresión y crear la línea celular u organismo mutantes en los cuales el nivel de una sola proteína seleccionada está reducido o anulado de manera selectiva.

Por ejemplo, puede obtenerse una reducción o eliminación de la expresión (es decir, un "knockout") de un producto génico en una planta transgénica para producir un fenotipo de planta caracterizado por crecimiento aumentado mediante la introducción de una construcción antisentido que corresponde al polipéptido de interés en forma de ADNc. Para la supresión antisentido, se dispone un ADNc que codifica el producto génico o una parte del mismo en orientación inversa (con respecto a la secuencia codificante) en relación a la secuencia promotora en el vector de

expresión. No es necesario que la secuencia introducida sea el ADNc o gen de longitud completa, y no necesita ser idéntica al ADNc o gen encontrado en el tipo de planta que se va a transformar. Normalmente, la secuencia antisentido solo necesita ser capaz de hibridar con el gen diana o el ARN de interés. Por lo tanto, en los casos donde la secuencia introducida sea de menor longitud, se necesitará un mayor grado de homología con el factor de transcripción endógeno para una supresión antisentido eficaz. Aunque pueden utilizarse secuencias antisentido de diversas longitudes, la secuencia antisentido introducida en el vector tendrá una longitud, preferentemente, en el intervalo de 15-30 nucleótidos, tal como de 16-28 nucleótidos, de 17-26 nucleótidos o de 18-24 nucleótidos, y se observará una supresión antisentido mejorada a medida que aumente la longitud de la secuencia antisentido. Preferentemente, la longitud de la secuencia antisentido en el vector será mayor de 100 nucleótidos. La transcripción de una construcción antisentido tal como se ha descrito da como resultado la producción de moléculas de ARN que son el complemento inverso de moléculas de ARNm transcritas a partir del gen endógeno en la célula vegetal.

Para descripciones más detalladas de la regulación antisentido de la expresión génica aplicada en células vegetales se hace referencia a la Patente de Estados Unidos n.º 5.107.065.

Interferencia de ARN

El silenciamiento génico que se induce mediante ARN bicatenario se denomina comúnmente interferencia de ARN o ARNi. La interferencia de ARN es un mecanismo molecular en el que fragmentos de ácido ribonucleico bicatenarios (ARNbc) interfieren en la expresión de un gen concreto que comparte una secuencia homóloga con el ARNbc. El proceso que está mediado por la misma maquinaria celular que procesa el microARN, se conoce como el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC).

El proceso se inicia por la proteína rubonucleasa Dicer, que se une a moléculas de ARN bicatenario y las escinde para producir fragmentos bicatenarios de 20-25 pares de base con unas pocas bases colgantes no emparejadas en cada extremo. Los fragmentos cortos bicatenarios producidos por Dicer, denominados ARN pequeños interferentes (ARNpi) se separan e integran en el complejo RISC activo. Si una parte de un transcrito de ARN es la diana de una molécula o construcción de ARNi, se regula negativamente el transcrito completo.

Los componentes catalíticamente activos del complejo RISC son conocidos en animales como proteínas argonauta, endonucleasas que median la escisión inducida por ARNpi de la cadena ARNm diana. Como los fragmentos producidos mediante Dicer son bicatenarios, en teoría pueden producir cada uno un ARNpi funcional; sin embargo, solo una de las dos cadenas, conocida como la *cadena guía*, se une a la proteína argonauta y da lugar al silenciamiento génico. La otra *cadena anti-guía* o *cadena pasajera* se degrada en forma de sustrato RISC durante el proceso de activación de RISC. La cadena seleccionada como guía tiende a ser la cadena cuyo extremo 5' es más estable, pero la selección de la cadena no depende de la dirección en la cual Dicer escinde el ARNbc antes de la incorporación de RISC.

La interferencia de ARN, tal como se usa en el laboratorio, a menudo implica moléculas de ARNbc perfectamente emparejadas por bases que inducen la escisión del ARNm. Después de la integración en el RISC, los ARNpi se emparejan por bases a su ARNm diana e inducen a la proteína argonauta componente del RISC para que escinda al ARNm, de este modo evitando que se usa como molde de traducción. Para que sea estable *in vitro* o *in vivo*, la secuencia de un compuesto de ALNpi o ARNpi no necesita ser 100 % complementaria a su ácido nucleico diana. El hecho de que los compuestos de ARNpi (y los compuestos de ALNpi tal como se describen más adelante) sean complementarios e hibridables específicamente a sus moléculas diana implica solamente que los compuestos de ARNpi (o ALNpi) se unen con suficiente fuerza y especificidad a la molécula diana como para proporcionar la interferencia deseada con la función normal de la diana a la vez que se deja sin afectar la función de los ARNm no diana.

Se sabe que los monómeros de ALN incorporados dentro de los oligos inducirán ARN de estructura igual a la del oligo y a la del híbrido que pueda formar. También es conocido que los restos de ALN dirigirán esta estructura a restos ADN incorporados en la dirección del extremo 3' de la incorporación ALN y hacia la extensión inferior en la dirección del extremo 5'. La consecuencia de esto es que es posible modificar las cadenas de ARN con monómeros de ADN y si uno o más restos de ALN flanquean los monómeros de ARN también lograrán la estructura del ARN. Como consecuencia, el ADN y el ALN pueden reemplazar monómeros de ARN y a pesar de ello el oligo logrará en conjunto una estructura de ARN igual. El ADN es mucho más económico y fácil de sintetizar y más estable a nucleasas que el ARN y dicha modificación mejorará por lo tanto el uso y aplicabilidad general de los ARNpi.

Los organismos varían en la habilidad de sus células para utilizar ARNbc exteriores y usarlos en la ruta del ARNi. En las plantas, sin embargo, el silenciamiento génico causado por el ARNi puede difundirse de una célula a otra de una planta, y los efectos de la interferencia de ARN son así tanto sistémicos como heredables en plantas.

Para descripciones más detalladas de la supresión génica de ARNi en plantas mediante transcripción de un ARNbc se hace referencia a la Patente de Estados Unidos n.º 6.506.559, a la Publicación de Solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2002/0168707 A1 y a las Solicitudes de Patente de Estados Unidos con n.º de Serie 09/423.143 (véase el documento WO 98/53083), con n.º de Serie 09/127.735 (véase el documento WO 99/53050) y con n.º de

Serie 09/084.942 (véase el documento WO 99/61631).

En las realizaciones particulares por las que se ejemplifica la presente invención, las subsecuencias o fragmentos en c) comprenden las secuencias de las SEQ ID NO: 18-38.

5

Construcción de vectores

En general, los expertos en la materia son capaces de construir vectores de la presente invención y de diseñar protocolos para la expresión génica recombinante. Para más detalles sobre los protocolos generales para la preparación de vectores, se hace referencia a: Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 2ª edición, Sambrook et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press. El promotor usado para el gen antisentido puede influenciar el nivel, la temporización, el tejido, la especificidad, o la inducibilidad de la inhibición antisentido. Además, el antisentido puede manipular su especificidad mediante la selección de cualquier región única del gen diana o región donde este comparta homología con otros genes relacionados.

10

15

Generalmente, la supresión del gen mediante interferencia de ARN puede lograrse usando una construcción de ADN recombinante que tenga un promotor funcionalmente enlazado a un elemento ADN que comprenda un elemento sentido y antisentido del fragmento de ADN genómico o de ADNc del gen, por ejemplo, un segmento de al menos 25 nucleótidos, tal como de al menos 30, o al menos 40, o al menos 50, o al menos 75, o al menos 100, o al menos 200, o al menos 300, o al menos 400, o al menos 500, o al menos 750 nucleótidos, o al menos 1kb, tal como de al menos 1,5 kb, al menos 2 kb, al menos 2,5 kb, o tal como de al menos 3 kb, donde los componentes de ADN sentido y antisentido pueden estar directamente enlazados o juntados por un intrón o un segmento de ADN artificial que puede formar un bucle cuando el ARN transcrito se hibrida para formar una estructura de horquilla.

20

25

En realizaciones pertinentes de la invención la construcción del ácido nucleico, o la construcción del ADN recombinante, además comprende un promotor constitutivo, inducible o específico de tejido funcionalmente enlazado a dicha secuencia de nucleótidos.

30

Un ejemplo de construcción de ácido nucleico, o de construcción de ADN recombinante tiene un promotor que dirige la transcripción del fragmento ADN del gen diana seguido de una secuencia corta que están presentes en una repetición invertida, esto en conjunto desencadena la respuesta del ARNi del gen diana. Tales construcciones ha sido descritas por Brummel D.A. et al., Plant Journal 2003, 33, páginas 793-800.

35

En otro ejemplo, se construye un microARN artificial donde un promotor dirige la expresión de una molécula ARN imitando la función del microARN y la secuencia de ajuste específico del gen se introduce recombinantemente (véase Niu et al., 2006. Expression of artificial microRNAs in transgenic Arabidopsis thaliana confers virus resistance. Science 2006, vol 24, No. 11pp1420-1428). El microARN puede ser de origen natural y únicamente sobreexpresado.

40

En una realización particular de la presente invención la construcción de ácido nucleico, o la construcción de ácido nucleico recombinante, comprende además un promotor constitutivo fuerte al frente un casete transcrito que consiste en parte del gen diana seguido por el intrón funcional de la planta seguido por la misma parte del gen diana en orientación inversa y el casete transcrito está seguido por una secuencia de terminación. El vector preferido es de tipo tal que una de las secuencias de nucleótidos de la invención esté insertada en orientación inversa repetida.

45

En una realización de la presente invención preferida, la construcción de ácido nucleico, o la construcción de ADN recombinante, comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 47.

50

La construcción de ácido nucleico actualmente preferida para métodos basados en ARNi es un vector denominado pK7GWIWG2(I). El vector se describe en: Gateway vectors for Agrobacterium –mediated plants transformation, Karimi, M. et al., Trends In plant Sciences, Vol 7 n° 5 pp 193- 195. El mismo tipo básico de vector se describió previamente por Wesley S.V. et al., en Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. Plant Journal 2001, 27, páginas 581-590.

55

Un experto en la materia entiende que cualquier secuencia que forme parte de los genes, o del correspondiente ARNm presentado aquí puede ser usada para la regulación negativa de los niveles de dichos ARNm. En el caso de que la secuencia presentada no represente al ARNm completo, el ARNm completo puede clonarse con varias técnicas conocidas por los expertos en la técnica, tales como las técnicas descritas por Sambrook et al. Un recurso reciente importante para encontrar más secuencias asociadas con los ARN transcritos de genes de *Populus* es el genoma publicado de *Populus trichocarpa* y las fuentes están descritas por Tuskan et al., (2006) (G.A Tuskan et al., 2006. The genome of Black Cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. y Gray). Science vol 313 No. 5793, páginas 1596-1604.

60

Transformación de células vegetales

De acuerdo con la presente invención, el método comprende el paso adicional de la transformación de células vegetales regenerables con dicha construcción de ácido nucleico o construcción de ADN recombinante o vector dentro de la célula de la planta, con ciertas consideraciones que deben ser tomadas en cuenta, que son conocidas por los expertos en la técnica. El ácido nucleico que va a insertarse debería ensamblarse en la construcción que contienen elementos reguladores efectivos que dirigirán la transcripción, tal como se describió anteriormente. Hay disponibles métodos de transporte de construcciones hacia la célula. Una vez que la construcción está dentro de la célula, la integración dentro del material cromosómico endógeno podrá ocurrir o no.

Las técnicas de transformación, conocidas por los expertos en la técnica, pueden usarse para introducir las construcciones de ADN y vectores en la células de las plantas para producir plantas transgénicas, en particular árboles transgénicos, con desarrollo mejorado.

Los expertos en la técnica entiende que la amplia variedad de células hospedadoras pueden emplearse como receptoras de construcciones de ADN y vectores de acuerdo con la invención. Los ejemplos no limitantes de células hospedadoras incluyen células del tejido embrionario, tejidos de células vegetales no diferenciadas de tipo I, II y III, hipocotilos, meristemo, tejido de raíz, tejidos para la expresión en el floema.

Tal como se indicó anteriormente, la transformación con *Agrobacterium* es un método ampliamente usado por los expertos en la transformación de especies de árboles, en particular especies de madera dura tales como el álamo. La producción de plantas transgénicas estables y fértiles ya es rutina en la técnica. Otros métodos, tales como el bombardeo con microproyectiles o partículas, electroporación, microinyección, incorporación directa de ADN, incorporación de ADN mediana por liposoma, o el método de vórtice pueden usarse donde la transformación de por *Agrobacterium* es ineficiente o inefectiva, por ejemplo, en algunas especies de gimnospermas.

Como alternativa, una combinación de diferentes técnicas pueden usarse para mejorar la eficiencia del procesos de transformación, por ejemplo, bombardeo con micropartículas o microproyectiles revestidos de *Agrobacterium* para inducir heridas seguido por cocultivo con *Agrobacterium*.

Se entenderá que la elección particular de la tecnología de transformación estará determinada por su eficiencia para transformar ciertas especies de plantas así como la experiencia y la preferencia del técnico que practique la invención con la metodología particular de la elección. También se entenderá que la elección particular del sistema de transformación para introducir dentro de las células vegetales no es esencial, ni es una limitación para la invención, ni tampoco la elección de la técnica para regeneración de plantas.

Después de la transformación, se seleccionan las plantas transgénicas preferentemente usando un marcador de selección dominante incorporado en el vector de transformación. Normalmente, dichos marcadores conferirán resistencia a herbicida o a antibióticos a las plantas transformadas, y la selección de los transformantes puede estar acompañada por exposición de las plantas a concentraciones apropiadas del herbicida o del antibiótico. Un novedoso marcador de selección usando la forma D de aminoácidos y basado en el hecho de que las plantas pueden tolerar solamente la forma L ofrecen un sistema rápido, eficiente y ecológico. Una característica de interés de este sistema de selección es que permite tanto la selección como la contraselección.

Posteriormente, la planta puede regenerarse, por ejemplo, a partir de células individuales, tejidos callosos o discos foliares, como es normal en la técnica. Puede regenerarse prácticamente cualquier planta a partir de células, tejidos y órganos de vegetales. La técnicas disponibles se revisan en Vasil et al., 1984, Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol I, II y III, Laboratory Procedures.

Después que las plantas transformadas se seleccionen y desarrollen hasta la madurez, se identifican aquellas plantas que muestran un fenotipo de desarrollo mejorado. Adicionalmente, para confirmar que el fenotipo es debido a los cambios en la expresión de los niveles o actividad del polipéptido o polinucleótido divulgado en esta invención, puede llevar a cabo su determinación mediante el análisis de la expresión de ARNm usando manchas Northern, RT-PCR, o expresión de proteína usando inmunomanchas o manchas Western o ensayos de cambio de gel.

Especies de Plantas

De acuerdo con la invención, el presente método produce una planta transgénica que tiene desarrollo mejorado en comparación con su planta de tipo silvestre a partir de la cual se derivó. En una realización del presente método, la planta transgénica es una planta perenne, por ejemplo, una planta que vive por más de dos años. En una realización específica, la planta perenne es una planta maderera que puede estar definida como una planta vascular que tiene un tronco o tallo (o más de un tronco o tallo) que está lignificado en un alto grado.

En una realización preferida, la planta maderera es una planta de madera dura, por ejemplo, árboles de angiosperma, que pueden seleccionarse del grupo consistente de: acacia, eucalipto, carpino, haya, caoba, nogal, roble, fresno, sauce, nogal americano, abedul, castaño, álamo, aliso, arce, sicomoro, gingko, palma, gomero. Las

plantas de madera dura de la familia de la *Salicaceae*, tal como el sauce, tulípero y álamo, incluyendo variantes derivadas, son de particular interés, porque estos dos grupos incluyen árboles de especies de desarrollo y desarrollo rápido o árboles madereros que son desarrollados específicamente para proporcionar madera de construcción y biocombustible para calor. Las pasturas celulósicas usadas para bioenergía similares a la pastura Switch o a la pastura Canaria Roja (Red Canary Grass, por su denominación en inglés), son también interesantes.

En realizaciones adicionales, la planta maderera es de madera blanda o una conífera que puede seleccionarse entre el grupo que consiste en el ciprés, el abeto Douglas, el abeto, la secuoya, la cicuta, el cedrón, el enebro, el alerce, el pino, el pino rojo, el abeto rojo y el tejo.

En realizaciones útiles, la planta maderera es una planta que produce frutas que puede seleccionarse entre el grupo que consiste en el manzano, el ciruelo, el peral, el banano, el naranjo, el kiwi, el limonero, el cerezo, la vid y la higuera.

Otras plantas madereras que pueden ser útiles en el presente método también puede seleccionarse entre el grupo que consiste en algodón, bambú y gomero.

Construcción de ADN

De acuerdo con un segundo aspecto principal de la invención, se proporciona una construcción de ADN, tal como una construcción de ADN recombinante, que comprende al menos una secuencia como la descrita anteriormente. En particular, la construcción de ADN recombinante puede comprender una secuencia de nucleótidos seleccionada entre el grupo que consiste en:

- a) la secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-17, 50, 51, 54-58, 60; así como SEQ ID NO: 1, 2, 5, 6, 10, 13, 15, 16, 17, 50, 51, 54, 55, 56, 57, 58, 60;
- b) la secuencia de nucleótidos complementaria de la secuencia de nucleótidos de a);
- c) la subsecuencia o el fragmento de la secuencia de nucleótidos de a) o b);
- d) la secuencia de ácido nucleico que sea al menos 60 % idéntica a cualquiera de las secuencias en a), b) y c);
- y
- e) la secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones rigurosas a una secuencia de nucleótidos de a), b) o c).

En realizaciones seleccionadas de la invención la secuencia de ácido nucleico en d) es al menos un 65 % idéntica a cualquiera de las secuencias en a), b), o c), o al menos un 70 % idéntica, o al menos un 75 % idéntica; o al menos un 80 % idéntica, o al menos un 85 % idéntica, o al menos un 87 % idéntica, o al menos un 90 % idéntica, o al menos un 95 % idéntica, o al menos un 97 % idéntica; o al menos un 98 % idéntica, o al menos un 99 % idéntica, o al menos un 99,5 % idéntica a cualquiera de las secuencias en a), b) o c).

En realizaciones adicionales relativas a este aspecto de la invención la secuencia de nucleótidos comprende una secuencia seleccionada a partir de aquellas SEQ ID NO: 18-38, 48, 49, 51-60; así como SEQ ID NO: 20, 29, 36, 37, 38, 48, 49, 51-60 o una secuencia de nucleótidos complementaria de la mismas.

También en relación a este aspecto de la invención, queda claro que las subsecuencias o el fragmento en c) descrito antes comprende al menos 15 nucleótidos, así como al menos 16 nucleótidos, o al menos 17 nucleótidos, o al menos 18 nucleótidos, o al menos 19 nucleótidos, o al menos 20 nucleótidos, o al menos 21 nucleótidos, o al menos 22 nucleótidos, o al menos 23 nucleótidos, o al menos 23 nucleótidos, o al menos 24 nucleótidos, o al menos 25 nucleótidos, o al menos 30 nucleótidos, o al menos 35 nucleótidos, o al menos 40 nucleótidos, o al menos 45 nucleótidos, o al menos 50 nucleótidos, o al menos 55 nucleótidos, o al menos 60 nucleótidos, o al menos 65 nucleótidos, o al menos 70 nucleótidos, o al menos 75 nucleótidos, o al menos 80 nucleótidos, o al menos 85 nucleótidos, o al menos 90 nucleótidos, o al menos 95 nucleótidos, o al menos 100 nucleótidos. En ciertas realizaciones, las subsecuencias o el fragmento en c) descrito antes comprende al menos 150 restos de aminoácidos, así como, en al menos 200, 250, 300, 330, 360, 375, 400, 425, 450, 460, 480, 500, 600, 700, 800, así como en al menos 900 nucleótidos o así como en al menos 1 kb, 1,1 kb, 1,2 kb, 1,3 kb, 1,4 kb, 1,5 kb, 1,6 kb, 1,7 kb, 1,8 kb, 1,9 kb, 2 kb, 2,1 kb, 2,2 kb, 2,3 kb, 2,4 kb, 2,5 kb, 2,6 kb, 2,7 kb, 2,8 kb, 2,9 kb, o así como en al menos 3 kb.

También, de acuerdo con lo anterior, la secuencia de nucleótidos que codifica al polipéptido comprende una variante de manera conservativa sustituida del polipéptido de (a). Además, la secuencia de nucleótidos comprende la sustitución silenciante en la propia secuencia de nucleótidos.

En realizaciones adicionales que incumben a este aspecto de la invención, las subsecuencias o los fragmentos tienen al menos un 65 % de identidad de secuencia con el dominio conservado de la secuencia de nucleótidos tal como la descripción en el ítem a), así como o al menos un 70 % idéntica, o al menos un 75 % idéntica; o al menos un 80 % idéntica, o al menos un 85 % idéntica, o al menos un 87 % idéntica, o al menos un 90 % idéntica, o al menos un 95 % idéntica, o al menos un 97 % idéntica; o al menos un 98 % idéntica, o al menos un 99 % idéntica, o al menos un 99,5 % de identidad con el dominio conservado de la secuencia de nucleótidos como se describió en el ítem a).

En realizaciones particulares, las subsecuencias o los fragmentos en c) comprenden las secuencias de SEQ ID NO: 18-38.

5 En realizaciones adicionales y de acuerdo con la descripción anterior, la construcción del ADN recombinante, además comprende un promotor constitutivo, inducible o específico de tejido funcionalmente enlazado a dicha secuencia de nucleótidos. En particular la construcción de ácido nucleico recombinante, además puede comprender un promotor constitutivo fuerte al frente del casete transcrito que consiste de parte del gen diana en orientación inversa como se describió anteriormente. Otro tipo preferido de construcción ADN recombinante tiene un promotor dirigiendo la transcripción del fragmento de ADN del gen diana seguido de una secuencia corta que están presente en la repetición invertida, y que también fue explicada anteriormente.

10 En las realizaciones de la invención ejemplificadas en el presente documento, la construcción de ADN recombinante comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 47.

15 Plantas Transgénicas

Un tercer aspecto de la invención proporciona una planta transgénica que comprende un polinucleótido recombinante (construcción de ADN) que comprende una secuencia de nucleótidos capaz de alterar en la planta el nivel del producto génico de al menos un gen específicamente expresado durante las fases de formación de la madera. Por analogía a la descripción anterior quedará sobreentendido que en una de las realizaciones al menos un gen es seleccionado para conformar el criterio de que la baja regulación del ARNi de dicho gen en un grupo de 3-8 plantas transgénicas cause:

- 25 a) una diferencia de 5 % o más en el altura final promedio (AFP) y en la altura final máxima (AFM) y en el índice de desarrollo de altura máxima promedio (IDAMP) y en el máximo índice de desarrollo de altura máxima (MIDAM); y/o
- b) una diferencia del 5 % o más en el diámetro final promedio (DFP), y en el diámetro final máximo (DFM), y en el índice de desarrollo del diámetro promedio (IDDP), y en el coeficiente del diámetro máximo (CDM); y/o
- 30 c) una diferencia del 18 % o más en la altura final promedio (AFP) y/o en el diámetro final promedio (DFP) y/o en el índice de desarrollo de altura máxima promedio (IDAMP) y/o en el índice de desarrollo del diámetro promedio (IDDP); y/o
- d) una diferencia del 18 % o más en la altura final máxima (AFM) y/o en el diámetro final máximo (DFM) y/o en el máximo índice de desarrollo de altura máxima (MIDAM) y/o en el coeficiente del diámetro máximo (CDM);

35 cuando se compara dicho grupo de plantas transgénicas crecidas durante 8 semanas en un invernadero bajo un fotoperíodo de 18 horas, a una temperatura de 22°C/15°C (día/noche) y una semana de fertilización con 84 g/l de N, 2 g/l de P1, 56 g/l de K, con el grupo de plantas del tipo silvestre creciendo bajo idénticas condiciones; donde el nivel de altura máxima de desarrollo se define calculando la pendiente de una función lineal ajustada por cuatro puntos consecutivos de los datos de altura, donde el valor del nivel de altura de desarrollo se calculó para los datos de los puntos 1 a 4, para los datos de los puntos 2 a 5, etc.. paso a paso, y el valor del nivel de altura máxima de desarrollo se seleccionó finalmente a partir de los valores de nivel de desarrollo de cada planta.

40 De acuerdo con realizaciones adicionales de este aspecto de la invención, el gen expresado durante las fases de formación de madera es seleccionado para conformar el criterio de que la baja regulación del ARNi de dicho gen en un grupo de 3-8 plantas transgénicas cause:

- 45 a) una diferencia de 8 % o más en el altura final promedio (AFP) y en la altura final máxima (AFM) y en el índice de desarrollo de altura máxima promedio (IDAMP) y en el máximo índice de desarrollo de altura máxima (MIDAM); y/o
- 50 b) una diferencia del 8 % o más en el diámetro final promedio (DFP), y en el diámetro final máximo (DFM), y en el índice de desarrollo del diámetro promedio (IDDP), y en el coeficiente del diámetro máximo (CDM); y/o
- c) una diferencia del 22 % o más en la altura final promedio (AFP) y/o en el diámetro final promedio (DFP) y/o en el índice de desarrollo de altura máxima promedio (IDAMP) y/o en el índice de desarrollo del diámetro promedio (IDDP); y/o
- 55 d) una diferencia del 22 % o más en la altura final máxima (AFM) y/o en el diámetro final máximo (DFM) y/o en el máximo índice de desarrollo de altura máxima (MIDAM) y/o en el coeficiente del diámetro máximo (CDM);

60 cuando se compara dicho grupo de plantas transgénicas crecidas durante 8 semanas en un invernadero bajo un fotoperíodo de 18 horas, a una temperatura de 22°C/15°C (día/noche) y una semana de fertilización con 84 g/l de N, 2 g/l de P1, 56 g/l de K, con el grupo de plantas del tipo silvestre creciendo en idénticas condiciones; donde el nivel de altura máxima de desarrollo se define calculando la pendiente de una función lineal ajustada por cuatro puntos consecutivos de los datos de altura, donde el valor del nivel de altura de desarrollo se calculó para los datos de los puntos 1 a 4, para los datos de los puntos 2 a 5, etc.. paso a paso, y el valor del nivel de altura máxima de desarrollo se seleccionó finalmente a partir de los valores de nivel de desarrollo de cada planta.

De acuerdo con realizaciones particulares de la invención el nivel del producto génico de al menos un gen que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre el grupo que consiste en:

- a) la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 15,
- b) la secuencia de nucleótidos que sea al menos un 70 % idéntica a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 15,
- c) la subsecuencia o el fragmento de la secuencia de nucleótidos de a) o b)

ha sido alterada en relación al nivel encontrado en la respectiva correspondiente planta de tipo silvestre.

De acuerdo con todavía otras realizaciones de la invención, la planta transgénica comprende un polinucleótido recombinante (construcción de ADN) que comprende la secuencia de nucleótidos seleccionada entre el grupo que consiste en:

- d) la secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 15,
- e) la secuencia de nucleótidos complementaria de la secuencia de nucleótidos de d);
- f) la subsecuencia o el fragmento de la secuencia de nucleótidos de d) o e);
- g) la secuencia de ácido nucleico que sea al menos 70 % idéntica a cualquiera de las secuencias en d), e) y f); y
- h) la secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones rigurosas a una secuencia de nucleótidos de d), e) o f).

En realizaciones adicionales de la invención la secuencia de ácido nucleico en c) o g) es al menos un 65 % idéntica a cualquiera de las secuencias en a), b), d), e) o f), o al menos un 70 % idéntica, o al menos un 75 % idéntica; o al menos un 80 % idéntica, o al menos un 85 % idéntica, o al menos un 87 % idéntica, o al menos un 90 % idéntica, o al menos un 95 % idéntica, o al menos un 97 % idéntica; o al menos un 98 % idéntica, o al menos un 99 % idéntica, o al menos un 99,5 % idéntica a cualquiera de las secuencias en a), b), d), e) o f).

Tal como se mencionó antes, las secuencias arriba descritas son de álamo híbrido. Tal como los expertos lo saben, los homólogos de las secuencias descritas pueden ser aislados de otras especies, ejemplos no limitante de las mismas incluye: acacia, eucaliptos, carpino, haya, caoba, nogal, roble, nogal americano, abedul, castaño, aliso, arce, sicomoro, ginkgo, palma, gomero, ciprés, abeto Douglas, abeto, secuoya, cicuta, cedro, enebro, alerce, pino, pino rojo, picea y tejo, manzano, ciruelo, peral, banano, naranjo, kiwi, limonero, cerezo, vid y parra, higuera, algodón, bambú, caucho, pasto cario rojo. Los homólogos útiles de las secuencias descritas pueden ser aislados también de plantas de madera dura de la familia de la *Salicaceae*, por ejemplo, del género *salix* o *populus*. Los miembros de estos géneros son conocidos por sus nombres más comunes: sauce, tulípero y álamo.

En particular, la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la invención comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 18-38, o una secuencia de nucleótidos complementaria de la misma.

De nuevo, queda claro que las subsecuencias o el fragmento en c) o f) descritos anteriormente comprenden al menos 15 nucleótidos, así como al menos 16 nucleótidos, o al menos 17 nucleótidos, o al menos 18 nucleótidos, o al menos 19 nucleótidos, o al menos 20 nucleótidos, o al menos 21 nucleótidos, o al menos 22 nucleótidos, o al menos 23 nucleótidos, o al menos 24 nucleótidos, o al menos 25 nucleótidos, o al menos 30 nucleótidos, o al menos 35 nucleótidos, o al menos 40 nucleótidos, o al menos 45 nucleótidos, o al menos 50 nucleótidos, o al menos 55 nucleótidos, o al menos 60 nucleótidos, o al menos 65 nucleótidos, o al menos 70 nucleótidos, o al menos 75 nucleótidos, o al menos 80 nucleótidos, o al menos 85 nucleótidos, o al menos 90 nucleótidos, o al menos 95 nucleótidos, o al menos 100 nucleótidos. En ciertas realizaciones, las subsecuencias o el fragmento en c) o f) descritos antes comprende al menos 150 restos de ácidos nucleicos, tal como al menos 200, 250, 300, 330, 360, 375, 400, 425, 450, 460, 480, 500, 600, 700, 800, tal como al menos 900 nucleótidos o tal como al menos 1 kb, 1,1 kb, 1,2 kb, 1,3 kb, 1,4 kb, 1,5 kb, 1,6 kb, 1,7 kb, 1,8 kb, 1,9 kb, 2 kb, 2,1 kb, 2,2 kb, 2,3 kb, 2,4 kb, 2,5 kb, 2,6 kb, 2,7 kb, 2,8 kb, 2,9 kb, o tal como al menos 3 kb.

En particular, la planta transgénica de acuerdo con la presente invención, que puede comprender una construcción de ADN recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que, en relación a las secuencias concretas descritas, comprende variaciones conservativas que alteran solo uno o unos pocos aminoácidos en el polipéptido codificado, puede proporcionarse y usarse de acuerdo con la presente invención. En consecuencia, está dentro del alcance de la invención proporcionar y usar una construcción de ADN recombinante que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica al polipéptido que comprende la variante sustituida de manera conservativa del polipéptido de a) o d).

En consecuencia, la presente invención también puede proporcionar una construcción de ADN recombinante, donde la secuencia de nucleótidos comprende la sustitución silenciante en la propia secuencia de nucleótidos, esto es, la construcción de ADN recombinante puede comprender una alteración de la secuencia que no cambia la secuencia de aminoácido codificada por el polinucleótido.

En ciertas realizaciones de la invención, además, las subsecuencias o los fragmentos tienen al menos un 65 % de identidad de secuencia con el dominio conservado de la secuencia de nucleótidos como se describió anteriormente bajo el ítem a) o d), o al menos un 70 % idéntica, o al menos un 75 % idéntica; o al menos un 80 % idéntica, o al menos un 85 % idéntica, o al menos un 87 % idéntica, o al menos un 90 % idéntica, o al menos un 95 % idéntica, o al menos un 97 % idéntica; o al menos un 98 % idéntica, o al menos un 99 % idéntica, o al menos un 99,5 % idéntica a cualquiera de las secuencias en a) o d).

En realizaciones particulares para las cuales la presente invención es ilustrativa, las subsecuencias o los fragmentos en c) comprenden la secuencia SEQ ID NO: 18-38.

En realizaciones adicionales la planta transgénica de acuerdo con la invención comprende una construcción de polinucleótido recombinante que además comprende un promotor constitutivo, inducible o específico de tejido funcionalmente enlazado a dicha secuencia de nucleótidos.

En realizaciones adicionales aún, la construcción del polinucleótido recombinante, además comprende un promotor constitutivo fuerte al frente del casete transcrito que consiste de parte del gen diana seguido por un intrón funcional de la planta seguido por la misma parte del gen diana en orientación inversa como se describió anteriormente. Otro tipo preferido de construcción ADN recombinante tiene un promotor dirigiendo la transcripción del fragmento de ADN del gen diana seguido de una secuencia corta que están presente en la repetición invertida, y también se explicó anteriormente.

En realizaciones particulares para las cuales la presente invención es ilustrativa, la planta transgénica comprende la construcción del polinucleótido recombinante en la cual las subsecuencias o los fragmentos en c) comprenden la secuencia SEQ ID NO: 18-38,.

En la realización actualmente preferida de la invención, la planta transgénica de acuerdo con la invención comprende la construcción del ADN recombinante, que comprende la secuencia SEQ ID NO:47.

Especies de Plantas

De acuerdo con la presente invención, la planta transgénica puede ser una planta perenne la cual preferentemente es una planta maderera o una especie maderera. En una realización útil, la planta maderera es una planta de madera dura la que se puede seleccionar del grupo consistente de: acacia, eucaliptos, carpino, haya, caoba, nogal, roble, fresno, sauce, nogal americano, abedul, castaño, álamo, aliso, arce, sicomoro, gingko, palma, gomero. Las plantas de madera dura de la familia de la *Salicaceae*, tal como el sauce, tulípero y álamo, incluyendo variantes derivadas, son de particular interés, porque estos dos grupos incluyen árboles de especies de desarrollo y desarrollo rápido o árboles madereros que son desarrollados específicamente para proporcionar madera de construcción y biocombustible para calefacción.

En realizaciones adicionales, la planta maderera es de madera blanda o una conífera que puede seleccionarse entre el grupo que consiste en el ciprés, el abeto de Douglas, el abeto, la secuoya, la cicuta, el cedrón, el enebro, el alerce, el pino, el pino rojo, el abeto rojo y el tejo.

En realizaciones útiles, la planta maderera es una planta que produce frutas que puede seleccionarse entre el grupo que consiste en el manzano, el ciruelo, el peral, el banano, el naranjo, el kiwi, el limonero, el cerezo, la vid y la higuera.

Otras plantas madereras que pueden ser útiles en el presente método también puede seleccionarse entre el grupo que consiste en algodón, bambú y gomero.

La presente invención se extiende a cualquier célula vegetal de las plantas transgénicas anteriores obtenida por los métodos descritos aquí, y a todas las partes de las plantas, incluyendo las partes cosechables de la planta, las semillas y propágulos de ellas, a explantes de la planta o a tejido de la planta. La presente invención también abarca la planta, partes de ella, la célula de la planta o la progenie de la planta que comprende la construcción de ADN de acuerdo con la invención. La presente invención se extiende además hasta abarcar la progenie de la célula transfectada o transformada primariamente, tejido, órgano o planta entera que fue producida mediante cualquiera de los métodos antes mencionados, con la sola condición de que la progenie exhiba la o las misma o mismas característica o características fenotípicas y/o genotípicas que aquellas producidas en el progenitor mediante los métodos de acuerdo con la invención.

Debería tomarse nota de que las realizaciones y características descritas en el contexto de uno de los aspectos de la presente invención también son aplicables a los otros aspectos de la invención.

La invención será ahora descrita en detalles adicionales en los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1

Identificación de los genes útiles involucrados en la formación de madera y en el desarrollo de la madera

5 1.1 Introducción

Para encontrar y dilucidar la función de los genes involucrados en la formación de la madera y en el desarrollo de la madera, se ejecutó un programa de amplia exploración de genes, resultando en la identificación de los genes útiles en las aplicaciones industriales de la madera.

10 1.2 Materiales y Métodos

1.2.1 Selección del Gen

15 El primer paso en este programa de exploración de genes fue la selección de algunos genes a partir de un gran grupo de genes para limitar los genes que se iban a explorar respecto de su función. El método de selección de genes se basa en patrones de expresión génica tal como se describe en Hertzberg et al. (2001) y Schrader et al. (2004).

20 En Hertzberg et al. (2001) se describe un estudio del desarrollo secundario del xilema del álamo. El xilema secundario del álamo está altamente organizado con límites distintos y fácilmente reconocidos entre los diferentes estados de desarrollo. La formación de madera se inicia en el cambium vascular. Se desarrollan subproductos derivados del cambium en lscélulas del xilema a través de los procesos de división, expansión, formación de paredes secundarias, lignificación y finalmente, muerte celular programada.

25 El gran tamaño físico del meristemo vascular en los árboles fue usado para obtener muestras de estados de desarrollo definidos mediante crioseccionamiento tangencial. Para determinar el estado de estabilidad de los niveles de ARNm en los estados específicos durante la ontogenia de la formación de madera en *Populus tremula x tremuloides* (álamo híbrido) se tomaron 30 muestras de 30 µm de espesor de las regiones de desarrollo de la madera y posteriormente las muestras fueron analizadas usando micro arreglos de ADNc consistentes de 2995 ESTs únicos a partir del álamo híbrido (Hertzberg et al., 2001).

35 Estas muestras fueron posteriormente también rehibridadas a micromatrices manchadas como se describe en Schrader et al. (2004). A partir de estos experimentos, fueron seleccionados los genes con una expresión específica clara durante las diferentes fases de formación de madera (ver Figura 1). La base para esto es la suposición de que los genes usualmente tienen su función donde ellos se están expresando. Por lo tanto, los genes que están específicamente expresados durante las diferentes fases de formación de madera tales como la división celular, la expansión celular y el compromiso celular en la zona cambial, y los genes expresados durante la formación de la pared celular secundaria en la zona de maduración (ver Wilson et al., 1966 para definiciones) tienen más susceptibilidad de ser importantes para los procesos de formación de madera que cualquier gen elegido aleatoriamente. Igual que en otros meristemas de planta, la principal función del cambium vascular (Fig. 1, zona A) es la división celular y la iniciación de la diferenciación. Las secuencias expresadas primariamente en el meristemo y en la zona de expansión temprana celular (Fig. 1, zona B), representa los genes candidatos involucrados en el ciclo celular, en la expansión celular, en el desarrollo de fibras y en la biosíntesis de la pared celular primaria. Las zonas A y B también están espectadas para expresar los genes que regulan el destino celular y la identidad celular. La expansión celular tiene lugar en el meristemo (Zona A) y en las zonas B y C. Los genes con la expresión a través de las zonas A, B y C (Fig. 1) por consiguiente pueden funcionar en la expansión celular. Tan pronto como la expansión celular es completada, la pared celular secundaria es depositada en todas las células del xilema (zona D). La mayoría de los genes involucrados en la biosíntesis de la pared celular secundaria, fueron pronosticados para ser encontrados en las zonas C (donde los vasos inician su pared celular secundaria), D y E (Fig. 1). Los genes fuertemente regulados en la zona E (Fig. 1) incluye algunas enzimas de degradación de paredes requeridas para esculpir la pared celular hacia los estados finales de formación de cavidades y poros, los genes relativos a las fases últimas de maduración de la fibra tal como la lignificación y la muerte celular programada. Los genes expresados en esta zona también contienen los genes específicamente involucrados en el metabolismo y en el transporte en células rayo, las cuales en oposición a las fibras, permanecen vivas y mantienen su actividad metabólica.

50 Se seleccionó una gran cantidad de genes diferentes expresados durante los diferentes estados de desarrollo del xilema, para análisis genómico funcional usando baja regulación de ARNi en las plantas transgénicas de álamo.

60 Además de esta selección, los genes fueron seleccionados basados en el experimento de la expresión génica en el meristemo, descrita en Schrader et al. (2004). En este experimento sólo se muestreó la zona cambial. Sin embargo, las muestras fueron más delgadas resultando esto en una mayor resolución sobre el meristemo cambial, por ejemplo, una sección correspondió aproximadamente a un espesor de tres células de la zona cambial, y así se proporcionó una resolución cercana a la célula para el perfil de expresión obtenido. A partir de este experimento, fueron seleccionados para análisis funcional usando baja regulación de ARNi en las plantas de álamo transgénicas, aquellos genes que presentaron un pico en la zona cambial o que presentaron un paso de cambio en la expresión

sobre el meristemo cambial (Schrader et al., 2004).

Posteriormente a las selecciones basadas en los patrones de expresión, los genes fueron identificados basados en las anotaciones de gen, y aquellos con anotaciones aparentemente poco interesantes, tales como los genes proteínicos ribosomales. Fueron excluidos. El uso de la cuidadosa selección de genes para ser funcionalmente analizados en el programa funcional genómico orientado al desarrollo y a las propiedades de la madera, es muy beneficioso para reducir costos y para buscar rápidamente genes interesantes.

Aunque la selección de genes, para cuyas funciones son analizados, es una importante parte del descubrimiento de genes con funciones interesantes para la biotecnología de la forestación hacia un camino de economía eficiente, el ensayo anteriormente descrito es el paso crucial para encontrar su uso en aplicaciones industriales. La selección del gen tal como es ejecutada aquí es solamente importante para maximizar la salida positiva de los datos del programa funcional genómico orientado hacia cierta relación propiedades/funciones.

El resultado de la selección de gen fue de 184 potenciales genes, 150 de los cuales fueron finalmente analizados funcionalmente, 17 de ellos fueron seleccionados además para su involucramiento y uso en cambios y/o modificaciones del fenotipo de del árbol observado para el desarrollo. Los ejemplos de los patrones de expresión de los 184 genes seleccionados se muestran en la Figura 2 y en la Figura 3.

1.2.2 Clonación de los genes seleccionados

Los genes seleccionados fueron posteriormente clonados en el vector ARNi bajo el control del promotor CaMV 35S (vector ARN de interferencia, pK7GWIWG2(I)) usando tecnología Gateway (Invitrogen USA). Dos conjuntos principales de cebador de clonación se usaron, un conjunto fue el par primer universal enlazante del vector y de la cola poli-A, y el otro conjunto fue un primers de gen específico. El producto PCR primero fue transferido dentro del vector pDONR (Invitrogen USA) y luego transferido hacia el vector de destino pK7GWIWG2(I) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Invitrogen USA). Las secuencias de los genes seleccionados, sus números de acceso al banco de genes y los primers PCR etc. Están listados en la Tabla 1.1.

Tabla 1.1 Número de acceso al Banco de Genes, secuencias y primers PCR etc.

Construcción	Nombre del cebador de clonación FW	Secuencia FW	Nombre del cebador de clonación inverso	Secuencia Rev
KR459	KR459FwAttB2	SEQ ID NO:40	KR459ReAttB1	SEQ ID NO:44

Construcción	Secuencia usada para la construcción de ARNi:	Secuencia completa
KR459	SEQ ID NO:36	SEQ ID NO:15

1.2.3 Transformación de la planta

CaMV 35S: Se transformaron construcciones de ADN repetidas inversas dentro de *Agrobacterium* y posteriormente en el álamo híbrido, *Populum tremula L. x P. tremuloides* Minch, Clon T89, en lo sucesivo llamado "poplar", fue transformado regenerado esencialmente como se describe en Nilsson et al. (1992). Aproximadamente 3 a 8 líneas independientes fueron generadas por cada construcción. Tales grupos de árboles transgénicos producidos usando una construcción en adelante será llamado "grupo de construcción", esto es, son árboles transgénicos diferentes que derivan de una construcción. Cada línea transgénica en cada grupo de construcción, por ejemplo, KR555-2B KR555-3A, KR555-2B y etcétera, son diferentes eventos de transformación y consecuentemente tendrán más probablemente el ADN recombinante insertado en diferentes lugares en el genoma de la planta. Esto hace que las diferentes líneas en una construcción sean parcialmente diferentes. Por ejemplo, se sabe que eventos de transformación diferentes producirán plantas con niveles diferentes del gen de regulación negativa cuando se usen las construcciones de ARNi del tipo usado aquí.

1.2.4 Desarrollo de la Planta

Las líneas de álamo transgénico crecieron junto con sus árboles de tipo silvestre (wt) de control (referenciados aquí como "wt" = wild type, por sus siglas en inglés), en invernaderos durante un fotoperíodo de 18 horas y a la temperatura de 22°C/15°C (día/noche). Las plantas fueron fertilizadas semanalmente con Weibulls Rika S NPK 7-1-5 disuelto 1 a 100 (concentración final: NO₃, 55g/l; NH₄, 29g/l; P, 12g/l; K, 56g/l; Mg 7,2g/l; S, 7,2g/l; B, 0,18g/l; Cu, 0,02g/l; Fe, 0,84g/l; Mn, 0,42g/l; Mo, 0,03g/l; Zn, 0,13g/L). Las plantas se desarrollaron durante 8-9 semanas antes de ser cosechadas. Durante este tiempo sus alturas y diámetros fueron medidos 1 o 2 veces por semana. El número de árboles tipo silvestre (normalmente de 15 a 25 árboles) y el número de árboles transgénicos que comprenden varios grupos de construcción (normalmente de 6 a 20 grupos de construcción) crecieron en paralelo en el invernadero en las mismas condiciones anteriores. Todas las comparaciones entre los árboles de tipo silvestre y los

grupos de construcción fueron hechas para cada grupo de desarrollo.

1.2.5 Muestreo

5 Fueron ejecutados dos principales tipos de cosechas y de muestreo. Uno de tipo general por ejemplo para análisis químico, para análisis morfológico de la madera, para análisis de expresión de los genes, para análisis de densidad de la madera y para análisis de metabolismo. Y otro tipo de análisis para medida de peso seco de corteza, madera, hojas y raíces.

10 1.2.6 Selección de grupos de construcción

En la primera ronda de desarrollo del crecimiento de cada grupo de árboles con el gen específico regulado a la baja usando ARNi, esto es, el grupo de construcción, una cantidad de análisis fueron llevados a cabo para la medida de desarrollo. Para cada Grupo de construcción, estos datos fueron analizados y mostraron una variación del fenotipo, comparando con los árboles de control de tipo silvestre.

15 Basados en los datos de crecimiento, se ejecutaron una cierta cantidad de análisis y se calcularon ciertos factores, en vistas a seleccionar los grupos de construcción, y como consecuencia de ello, los genes que son posibles usar para alterar las características de crecimiento. Los criterios de selección y los métodos ya fueron descritos anteriormente.

Análisis del crecimiento

Crecimiento durante la fase exponencial

25 En las condiciones de crecimiento definidas antes, las plantas mostraron un patrón de crecimiento exponencial (altura de planta) hasta una altura aproximada de 80 cm o hasta el día 40 en el invernadero. Para cada planta, se ajustaron los puntos de datos de la altura de las plantas, en vistas a ajustar una función exponencial de la forma:

30
$$h(t) = h_0 \cdot e^{at}$$

donde h_0 es una constante (altura en $t = 0$) y "a" está definida como el índice de desarrollo exponencial.

Índice de crecimiento de altura máxima

35 Otro índice que mide el desarrollo de altura (llamado aquí "Índice de crecimiento de altura máxima") fue definido como la pendiente de una función lineal ajustada sobre cuatro puntos consecutivos de datos de altura. El valor del índice de desarrollo de altura fue calculado para los puntos de datos 1 - 4, para los puntos de datos 2 - 5, etc y así sucesivamente, ver Fig. 4 para un ejemplo. El índice de desarrollo definido como el valor máximo producido del análisis de regresión lineal de grupos de puntos consecutivos, fue computado para cada una de las plantas. Los datos primarios para los valores de la altura del *índice de desarrollo de Altura Máxima* de las transformaciones individuales en el grupo de construcción fueron controlados de forma tal que nos se basaran en valores incorrectos. De la Figura 4, que muestra la curva de desarrollo de la Altura, se puede ver que el índice de desarrollo de altura aumenta durante la primera fase del crecimiento luego de lo cual las plantas alcanzan su máxima altura de desarrollo, y luego el índice de desarrollo declina cuando las plantas llegan a ser más largas. Como estas fases tienen diferentes tiempos en diferentes plantas y hay algunos "ruidos" agregados a las medidas de las plantas, el Desarrollo Máximo de altura anteriormente descrito usando el método de índices es muy útil para calcular la velocidad máxima de desarrollo en estas condiciones para cada tipo de árbol individual diferente.

50 *Índice de crecimiento del Diámetro*

En las condiciones anteriormente definidas, el ancho del tallo muestra comparativamente un incremento lineal en el tiempo. La regresión lineal sobre los datos del diámetro se usó para estimar el desarrollo del diámetro.

55
$$d(t) = c \cdot t + d_0$$

donde d_0 es el ancho inicial y "c" es el índice de desarrollo del diámetro (la pendiente).

Altura y diámetro final

60 La altura y el diámetro final también fueron usados para seleccionar los grupos de construcción alterados. Estos valores toman en cuenta tanto la capacidad de desarrollo de los árboles como la habilidad para comenzar su desarrollo cuando se transfirieron los cultivos de tejidos al suelo en los lugares de invernadero.

65

Parámetros de selección

Los grupos de construcción que mostraron un incremento significativo y pronunciado comparado con la población de tipo silvestre en los parámetro de crecimiento mencionados, por ejemplo, el índice de desarrollo del diámetro, el índice de desarrollo de altura máxima, el diámetro final y la altura final, fueron calificados como Grupos de Construcción que están alterados en sus propiedades de desarrollo, y como consecuencia, sus genes correspondientes pueden usarse para alterar dichas propiedades. Los criterios de selección están indicados más adelante. Se usaron dos niveles de selección diferentes, un nivel básico y uno para construcciones que dan fenotipos de desarrollo de interés extra.

Criterio de Selección por diferencia de Desarrollo

En la Tabla 1.2 se listan las abreviaciones usadas para los fenotipos usados para los criterio de selección de desarrollo

Tabla 1.2. Abreviaciones de los Fenotipos

AFP	Altura final promedio de la población de la especie salvaje y de cada población del grupo de Construcción
DFP	Diámetro final promedio de la población de la población salvaje y de cada población del grupo de Construcción
IDAMP	<i>Índice de crecimiento de Altura Máxima</i> Promedio de la población de la especie salvaje y de cada población del grupo de Construcción
IDDP	Coefficiente de Diámetro Promedio de la población de la especie salvaje y de cada población del grupo de Construcción
AFM	Altura Final Máxima de la población de la especie salvaje y de cada población del grupo de Construcción
DFM	Diámetro Final Máximo de la población de la especie salvaje y de cada población del grupo de Construcción
MIDAM	<i>Máximo Índice de crecimiento de Altura Máxima</i> Promedio de la población de la especie salvaje y de cada población del grupo de Construcción
CDM	Coefficiente de Diámetro Máximo de la población de la especie salvaje y de cada población del grupo de Construcción

Los criterios de selección de diferencia de desarrollo son como sigue:

1. Si el grupo de construcción AFP, AFM, IDAMP y MIDAM son al menos 5 % (u 8 % en un segundo nivel de más altura) mayor que el correspondiente AFP, AFM, IDAMP y MIDAM que el grupo de la especie salvaje, o
2. Si el grupo de construcción AFD, DFM, IDDP y CDM son al menos 5 % (u 8 % en un segundo nivel de más altura) mayor que el correspondiente AFD, DFM, IDDP y CDM que el grupo de la especie salvaje, o
3. Si el grupo de construcción AFP, DFP, IDAMP y IDDP son al menos 18 % (u 22 % en un segundo nivel de más altura) mayor que el correspondiente AFP, DFP, IDAMP y IDDP que el grupo de la especie salvaje, o
4. Si el grupo de construcción AFM, DFM, MIDAM y CDM son al menos 18 % (u 22 % en un segundo nivel de más altura) mayor que el correspondiente AFM, DFM, MIDAM y CDM que el grupo de la especie salvaje

Cuando se ejecutan programas genómicos funcionales a gran escala se produce una cierta variabilidad e incertidumbre en los datos obtenidos. Estas variaciones está producidas por fuentes tales como que las diferentes líneas en un grupo de construcción tienen diferentes cantidades de regulación a la baja resultando en que uno de este tipo de líneas, examinadas en el grupo de construcción, puede mostrar el fenotipo; o por la variación en el desarrollo, que ocurre durante el procedimiento experimental debido a pequeñas variaciones en el estado de la planta, cuando se transfieren las plantas desde el cultivo del tejido al invernadero; o por las variaciones basadas en diferentes posiciones en el invernadero durante diferentes momentos durante el ciclo de desarrollo. Estas variaciones han sido tenidas en cuenta cuando se analizaron los datos. Basados en los dos diferentes umbrales de incremento del 5 % y del 8 % se seleccionaron los grupos de construcción que presentaron desarrollo aumentado. El Criterio de selección 1 y 2 usan el aumento del 5 %, sin embargo este aumento ha estado presente en todos los fenotipos AFP, AFM, IDAMP y MIDAM correspondiente al desarrollo de altura y en todos los fenotipos AFD, DFM, IDDP y CDM correspondientes al desarrollo del diámetro. En los casos en que los fenotipos sólo pueden ser vistos en alguna o en una de las plantas y sólo una clase de fenotipo, el incremento mayor al 18 % se usó para una selección positiva de los grupos de construcción para no seleccionar grupos de construcción basados en variaciones aleatorias (el criterio 3 y 4 seleccionan sobre los valores promedios y los valores máximos individuales respectivamente). Estos números fueron controlados contra los datos de las especies salvajes. Algunas plantas de las especies no salvajes pasaron el nivel del 18 % del filtro de criterio 3 y 4, por ejemplo, aquellas de tipo no salvaje que en cualquiera de los grupos de desarrollo tenga más de un 18 % del valor que las de tipo silvestre con el segundo valor más alto en cualquiera de los fenotipos de desarrollo usados. El nivel del 5 % usado para el filtro del criterio 1 y 2 produce menos del 4 % de falsos positivos (1 en 25 genes), valor que se obtuvo tomando

aleatoriamente 5 plantas del tipo silvestre de la población de control de tipo silvestre y examinándolas para ver si pasaban el filtro 1 y 2; ejecutando esto para todos los grupos de desarrollo y repitiendo esto 10 veces da que en el 4 % de las veces las plantas de tipo silvestre seleccionadas pasaron el filtro. Este es un método muy resistente para estimar los falsos positivos, porque el grupo de control de plantas salvajes es reducido a 5 plantas. Para los valores mayores al 8 % usados para los genes de interés extra, esto produce menos del 1,5 % de falsos positivos.

Fueron seleccionados, los Grupos de Construcción que reunían uno o más de estos de estos criterios.

Medida de la longitud internodo

Fueron contados todos los nodos de nodo FDL e incluido 60 cm hacia abajo del tronco, y se calculó el promedio de longitud internodos.

1.3 Resultados

Los datos brutos para el grupo de construcción especificado y los del correspondiente grupo del tipo silvestre se muestran en las tablas de 1.3 a 1.20. Las filas de las Tablas contienen las medidas de alturas y diámetros de los individuos del grupo de construcción especificado (llamado "KR" y del correspondiente grupo de tipo silvestre (llamado "T89"). El tiempo de medida, esto es, la cantidad de días en invernadero se muestra en el cabezal de cada tabla.

Grupo de Construcción KR459

Construcción KR459 correspondiente a EST UB12CPE03 número del banco del gen BU820650.

Este gen se seleccionó de los datos de Schrader et al. 2004 y tiene su expresión de más altura en la muestra 6 en las series B. Esta construcción induce desarrollo aumentado. Esta construcción induce desarrollo de altura aumentada, la altura final es 24 % y el índice de desarrollo de altura máxima es del 23 % más largo en comparación con los individuos de desarrollo más rápido del grupo de construcción y del grupo de control del tipo silvestre. Esta construcción reúne el Filtro de Criterio de Desarrollo (4) como se muestra en la Tabla 1.21, más adelante.

Tabla 1.8 Datos de Desarrollo para KR459

Días en Invernadero	Altura (cm)						Diámetro (mm)					
	21	28	34	40	49	61	21	28	34	40	49	61
KR459-3B	27	42	59	79	128	146	3,1	4,3	6,4	7,9	9,9	10,9
KR459-4B	28	42	58	78	127	160	3,3	4,6	6,3	7,0	8,9	10,5
KR459-5B	25	40	57	76	125	158	3,3	4,1	6,4	7,8	9,3	10,5
KR459-6A	31	48	72	104	167	207	3,2	4,6	6,6	8,3	10,5	11,0
KR459-7A	28	42	62	83	136	170	3,1	4,5	6,4	7,9	9,3	10,8
T89-1	26	39	56	74	120	150	3,3	3,7	6,7	7,5	9,7	11,4
T89-2	24	40	62	85	132	159	3,0	4,4	6,9	7,9	10,4	11,5
T89-3	24	37	54	75	127	158	2,8	3,7	6,4	7,1	8,9	10,3
T89-4	24	37	54	79	126	151	2,9	4,0	6,0	7,2	9,4	11,2
T89-5	20	34	52	76	125	155	2,8	3,5	6,0	7,2	9,6	11,0
T89-6	26	40	56	76	121	149	3,2	3,8	6,2	7,9	10,3	11,4
T89-7	25	40	60	86	137	167	3,0	4,8	6,1	7,6	9,7	10,3
T89-8	26	41	59	81	129	150	3,3	4,5	6,9	8,1	10,7	11,9
T89-9	26	39	56	78	129	160	3,2	4,4	6,3	7,9	10,2	10,8
T89-10	26	39	58	84	134	166	2,8	4,1	5,8	7,5	9,2	9,7

En la Tabla 1.21 se muestra las relaciones de las medidas de desarrollo de altura y de diámetro del grupo de construcción especificado en relación al grupo de tipo silvestre correspondiente (por ejemplo, la relación de altura final promedio (AFP): $AFP_{\text{grupo de construcción}}/DFP_{\text{grupo de tipo silvestre}}$). La Tabla 1.22 contiene las relaciones de las medidas de desarrollo computadas AFP, DFP, IDAMP, IDDP, AFM, DFM, MIDAM, y CDM. (Declaración de las medidas de desarrollo descritas anteriormente)

Tabla 1.21: Conjunto de resultados de las construcciones seleccionadas – para el conjunto de fenotipos "desarrollo incrementado".

Construcción	Fenotipos																																														
	Indice DESARROLLO ALTURA MÁXIMA Promedio (KR _{prom} /WT _{prom})				Coeficiente Diámetro Promedio (KR _{prom} /WT _{prom})				Altura Final Máxima (KR _{max} /WT _{max})				Diámetro Final Máximo (KR _{max} /WT _{max})				Indice DESARROLLO ALTURA MÁXIMA Promedio (KR _{prom} /WT _{prom})				Coeficiente Diámetro Promedio (KR _{prom} /WT _{prom})				Altura Final Máxima (KR _{max} /WT _{max})				Diámetro Final Máximo (KR _{max} /WT _{max})				Indice DESARROLLO ALTURA MÁXIMA Promedio (KR _{prom} /WT _{prom})				Coeficiente Diámetro Promedio (KR _{prom} /WT _{prom})				Altura Final Máxima (KR _{max} /WT _{max})				Diámetro Final Máximo (KR _{max} /WT _{max})		
KR459	AFP	1,07	DFF	0,98	IDAMP	1,05	IDDP	0,94	AFM	1,24	DFM	0,92	MIDAM	1,23	CDM	0,92																															

1.4 Discusión

Mediante el uso de la cantidad correcta de datos y de información para la selección de genes para ser analizados funcionalmente en un programa de genómicos funcionales, en el presente caso se dirigieron los estudios hacia las propiedades de desarrollo, y ello nos permitió encontrar una cantidad de genes que pueden ser utilizados para modificar el desarrollo en las plantas, especialmente en árboles.

De todos los genes examinados en este programa menos del 18 % pasaron el primer nivel de selección y menos del 9 % pasaron el segundo nivel de los criterios de desarrollo puestos en este documento para los genes de interés extra. Los grupos de construcción que pasaron el segundo nivel de los criterios de desarrollo para dichos genes de interés extra fueron KR459. Aunque estos son solo una pequeña parte de los genes seleccionados para ser examinados, dicha cantidad es alta comparada con los que se esperarían de una elección aleatoria de genes con dicho objetivo, mostrando la importancia y la utilidad de nuestro tipo de selección de genes.

El ejemplo precedente también ilustra lo siguiente: cuando se comparan fenotipos de acuerdo con criterios simples, tales como altura y diámetro, es posible seleccionar genes que originen fenotipos robustos tales como los seleccionados usando los filtros de criterios de desarrollo 3 y 4. Sin embargo, comparando los fenotipos de acuerdo con criterios múltiples, tales como altura final promedio, altura final máxima, INDICE DE DESARROLLO DE ALTURA MÁXIMA promedio, e INDICE máximo DE DESARROLLO DE ALTURA MÁXIMA revela que la regulación a la baja de la expresión de algunos genes tiene un gran efecto sorpresivo sobre todas las características de desarrollo. Tal como se ilustró, esto ha permitido la identificación de subconjuntos de genes donde la regulación a la baja de su expresión dirige a un efecto considerable sobre el crecimiento y desarrollo de la planta. Habiendo identificado este subconjunto de genes se proporciona un claro avance sobre el estado del arte y ha facilitado significativamente la generación y la selección de eventos de transformación promisorios para la generación de plantas transgénicas con propiedades y características fenotípicas mejoradas.

Cuando se producen líneas comerciales usando cualquiera de los diferentes mecanismo posibles para regular a la baja la expresión génica se podrían producir muchas líneas con diferentes métodos y examinarlas para identificar en las que se hayan producido las propiedades deseadas. Esto podría hacerse porque niveles diferentes de regulación a la baja de la característica del gen producirán resultados diferentes. Esto se puede ver claramente en los datos de los Ejemplos. Se podrían seleccionar entonces los eventos de transformación más promisorios.

Referencias

1. Sterky et al.. 1998 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998 (95), 13330-13335
2. Hertzberg et al.. 2001 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001 (98), 14372 – 14737,
3. Schrader et al.. 2005 (Plant Cell, (16), 2278 – 2292
4. White et al.. 1999 (Science 1999 (286) 2187 – 2184
5. Aharoni et al.. 2000 (Plant Cell 2000 (12) 647 - 662
6. Uggla et al.. 1996 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996 (93), 9282 – 9286
7. Schena et al.. 1995 Science 1995 (270) 467 - 470
8. Wilson, B.F., Wodzicki, T.J. and Zhaner,R. (1966), Forest Science 12, pp 438-440
9. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor,
10. Rognes T, 2001, Nucleic Acids Research, 29, 1647-1652, 1989.
11. Smith TF and Waterman MS, 1981, Journal of Molecular Biology, 147, 195-197.
12. H. Neurath y R.L. Hill, 1979, en, *The Proteins*, Academic Press, New York.
13. WO2004097024
14. Patente US No. 4.987.071
15. Patente US No. 5.543.508.
16. Patente US No. 5.231.020

17. Patente US No. 5.583.021.
18. WO2006/078431
- 5 19. Slade y Knauf, Transgenic Res. 2005 Abril;14(2):109-15
20. Henikoff, Till, y Comai, Plant Physiol. 2004 Jun;135(2):630-6.
21. Ichikawa et al.. (1997) Nature 390 698-701;
- 10 22. Kakimoto et al.. (1996) Science 274: 982-985
23. WO 96/06166
- 15 24. WO 98/53057
25. Lichtenstein y Nellen (1997), Antisense Technology: A Practical Approach IRL Press at Oxford University, Oxford, England.
- 20 26. Patente US No. 5.107.065
27. Patente US No. 6.506.559,
28. Solicitud de Patente US Publicación No. 2002/0168707 A1
- 25 29. Solicitud de Patente US Serie No. 09/423,143 (see WO 98/53083),
30. Solicitud de Patente US Serie No. 09/127,735 (see WO 99/53050)
- 30 31. Solicitud de Patente US Serie No. 09/084,942 (see WO 99/61631),
32. Brummel D.A. *et al...* Plant Journal 2003, 33, páginas 793-800
- 35 33. Karimi, M. et al., Trends In plant Sciences, Vol 7 No. 5 pp 193- 195.
34. Wesley S.V. et al., Plant Journal 2001, 27, páginas 581-590.
35. Vasil et al.. 1984, Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol I, II y III, Laboratory Procedures
- 40 36. Niu et al., Science 2006, vol 24, No. 11 pp 1420-1428.
37. G.A Tuskan et al., , Science vol 313 No. 5793, páginas 1596-1604.
- 45 38. Sterky et al P.N.A.S. vol. 101, no. 38, p. 13951-13956 2004

Listado de secuencias

- <110> SOLICITANTE: SweTree Technologies
- 50 <120> TÍTULO: PLANTAS MADERERAS CON LAS CARACTERÍSTICAS DE DESARROLLO MEJORADAS Y MÉTODO PARA SU OBTENCIÓN
- <160> NÚMERO DE SECUENCIAS: 60
- 55 <210> SEQ ID NO: 1
- <211> LONGITUD: 1440
- <212> TIPO: ADN
- <213> ORGANISMO: *Populus tremula x tremuloides* KR121
- 60 <400> SEQ ID NO: 1

```

atgagcttgc aggtggttct agcgttactt gtggttgcct tcattagctt cagaggtgct 60
gagagcagaa aggcgaggat tttggactcc tttgagtaca gtgccataaa ttgcagggct 120
cacagtgcac cattaactga tttcggagga gttggggatg gaacaacgctc gaacactaaa 180
gcatttaagg atgcaattga tcatttgagt cagttttcat cagatggtgg ctctcagctc 240
tttgttctctg ctggaaaatg gttgactggt agcttcagtc ttaccagcca cttcacactc 300
tacctacaca aggatgctgt gcttcttgcc tctcaggaca tgcaagaatg gccagtgatg 360
aaacctctgc catcatacgg cagagggagg gatgcagcag ctggaaggta cagcagtctc 420
atatttgaa cgaacctcac tgacgttatt attacagggc acaatggcac aattgacggc 480
cagggagctt tctggtggca gaacttccac aagggcaagc taaaatacac caggccttac 540
ttaattgaga tcatgttctc agatactatc caaatttcaa atctgacgct cctgaattcc 600
ccgtcttgga atgttcatcc tgtttacage agagatattc ttgtgcaagg cattaccatc 660
atcgctccaa tctcatcacc aaataccgat ggaattaatc cagattcctg tacaacact 720
aaaattgaag attgttacat agtttctgga gacgattgtg tggcagttaa aagcggttgg 780
gacgagtacg ggattgcgtt tggaaatgcc acaaagcaac tagtcatcag acggctcacg 840
tgcattctctg catacagtgc cagcattgct ctaggcagtg aaatgtcggg tgggatagaa 900
gatgttagag cagaggatat cacagccatc cacacagaat ctggggtcag gatcaaaact 960
gctgtaggga gaggagggtg tgtgaaagac atatacgtga agagaatgac tatgcatacc 1020
atgaaatggg tcttttgat gactggaaat tatgggtcac atgctgataa gaattatgac 1080
ccaaatgcac tgccattgat tcaaggcatt aattacaggg acatggttgc cgataatgtg 1140
acaatggcag ctgatttga gggcattgca ggcgatccat tcaaggaaat ttgcatctcc 1200
aatgttacia tggatttgg accgaaggca aagaagggtc cgtggacctg caccgaaatt 1260
gaggggatga caagcggggt aagtccacgg ccatgtgatt tgctaccgga tcaggggcca 1320
gagaaaatca catcctgtga tttccctccg gagaatatac caatcgactt ggtgcagttc 1380
aagatgtgct ccttcggaat gagttacatg tgaactttgc ttctctacta ccatcaagca 1440

```

<210> SEQ ID NO: 2
 <211> LONGITUD: 1899
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: *Populus tremula x tremuloides* KR125

5

<400> SEQ ID NO: 2

```

taaatgaaac atggtactgg aggttaaaag acccaccatg agcaataaca ggaggggggtt 60
ttatgttaga atgaaactat tacacagaca tgctggactt caacaacaag agaagaagaa 120
gaatctttgt ttcaaatatt acaaattggct tctttggttt tctcttcttc tatatttctc 180
tagctcttgc ttcttcaccc acaaaccat tcccctctcc aaaaccctatg tctcagaatc 240
taaaactgtt gtttcccgtg ccctctttga atcctccaac tccactttca ttcaacagag 300
caagaacatc aatcgaggat tattaagga tttgaaggta tacatatatg agttgccatc 360
aaaatacaac acggactggc tagcaaatga gaggtgcagc aaccatttgt ttgcatcaga 420
agttgccatt cataaagcac tatcaaacag tcttgatata cggacgtttg acccatcga 480
agctgatctc ttctttgttc ctgtttacgt gtcctgcaat ttcagcaccg ttaatgggtt 540
ccctgcaatt ggtcatgcaa ggtecttatt atcctctgcg gtgcagctca tttectctaa 600
ctatccattt tggaaaccgct ctcaaggatc tgatcatgct tttgttgctt ctcacgatta 660
cggcgcttgt ttccatgcca tggaggagag agctatggaa gatgggatcc cagagttttt 720
gaagaggtcg atcatattgc agacttttgg tgtcaaattt aaccatccat gccaaagcgt 780
tgagaatgtc gtgataccac cttacatctc gccggaaaga gtacggacaa cactcgagaa 840
ttatccgctg aacggccggc gggacatttg ggccttcttt agaggcaaaa tgggaagtgca 900
ccccaaaaac attagtggac gatattacag caagaaagtg aggacggtaa tatggagaaa 960
atacagcggg gaccggagggt tttatttgca aaggcacagg tttgcccgtt accagtcaga 1020
aatcgtccgg tcagtgttct gtttatgccc cttgggatgg gccccatgga gcccagggtc 1080

```

10

```

ggtggaatct gttgcattag ggtgctgccc ggtcataaatt gcggatggaa tccggttgcc 1140
cttccccact gctgtccggt ggtcggagat atcccataacc gtggccgaaa aggacgtggc 1200
caatctagga actctactcg atcacgtggc agctaccaat ttgtcagcca ttcagaaaaa 1260
cttgtggggac ccagacgtta ggcggggccct ccttttcaat gatcagagtgc aggaaggcga 1320
tgccacgtgg caggtgcttt atgccttggc acggaagctg gacaggtcgt acagaaccgt 1380
gaggcttcca aaccaatagt ggttcgacac gttgaaggta cttttttggg gacccaagtg 1440
ccagctatgg gggcgcgctt ttgccagcta agaaacatgg agcacagctg gatttttaat 1500
gtttttcttg gattgatcaa aactacggga attttttagag gcaacgaggt ggggtccagc 1560
ctctgcagag ttaagatta tctgcagaaa tttttggtgg tcccgtgact tgctcgggtga 1620
gttggtgac tgtgattgat ggggctgaac ggtacatata attgtaaagc aatactgtag 1680
agtatgat ggggaggttt atgttttgag aaataatgag agaataaatg caaaaatagg 1740
ccctgtaaat actaataagg agtcgaagtc gattgcaatt tactgaaaac ccaaccaggt 1800
atcaaacttt actatttcat ttgttttttt aaatcagatt tatgtatttt ttattcattt 1860
atatttgatc ttagacaatg tctgtagtaa catgataaa 1899
    
```

5
 <210> SEQ ID NO: 3
 <211> LONGITUD: 1440
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: *Populus tremula x tremuloides* KR129 B

<400> SEQ ID NO: 3

```

atgagcttgc aggtggttct agcgttactt gtggttgcct tcattagctt cagaggtgct 60
gagagcagaa aggcgaggat tttggactcc tttgagtaca gtgccataaa ttgcagggct 120
cacagtgcac cattaactga tttcggagga gttggggatg gaacaacgtc gaacactaaa 180
gcatttaagg atgcaattga tcatttgagt cagttttcat cagatggtgg ctctcagctc 240
tttgttctcg ctggaaaatg gttgactggt agcttcagtc ttaccagcca cttcacactc 300
tacctacaca aggatgctgt gcttcttgcc tctcaggaca tgcaagaatg gccagtgatg 360
aaacctctgc catcatacgg cagagggagg gatgcagcag ctggaaggta cagcagctctc 420
atatttgaa cgaacctcac tgacgttatt attacagga acaatggcac aattgacggc 480
cagggagctt tctggtggca gaacttcac aagggcaagc taaaatacac caggccttac 540
ttaattgaga tcatgttctc agatactatc caaatttcaa atctgacgct cctgaattcc 600
ccgtcttggg atgttcatcc tgtttacagc agagatattc ttgtgcaagg cattaccatc 660
atcgctccaa tctcatcacc aaataccgat ggaattaatc cagattcctg taaaaacact 720
aaaattgaag attgttacat agtttctgga gacgattgtg tggcagttaa aagcggttgg 780
gacgagtacg ggattgcggt tggaaatgcc acaaagcaac tagtcatcag acggctcacg 840
tgcatctctc catacagtgc cacgattgct ctagggagtg aaatgtcggg tgggatagaa 900
gatgttagag cagaggatat cacagccatc cacacagaat ctggggtcag gatcaaaact 960
gctgtagggg gaggagggta tgtgaaagac atatacgtga agagaatgac tatgcatacc 1020
atgaaatggg tcttttggat gactggaaat tatgggtcac atgctgataa gaattatgac 1080
ccaatgcac tgccattgat tcaaggcatt aattacaggg acatggttgc cgataatgtg 1140
acaatggcag ctgatttggg gggcattgca ggcgatccat tcaaggaaat ttgcatctcc 1200
aatgttacia tccgattggc accgaaggca aagaaggtgc cgtggacctg caccgaaatt 1260
gaggggatga caagcggggg aagtccacgg ccatgtgatt tgctaccgga tcagggggcca 1320
gagaaaatca catcctgtga tttccctcgg gagaatatac caatcgactt ggtgcagttc 1380
aagatgtgct ccttcggaat gagttacatg tgaactttgc ttctctacta ccatcaagca 1440
    
```

10
 <210> SEQ ID NO: 4
 <211> LONGITUD: 474
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: *Populus tremula x tremuloides* KR140

15
 <400> SEQ ID NO: 4

```

atgcgggac atagtgaaag attttagtct cttccattct ccatcgcttg tgcctctcac 60
tccagtgttg atgtggcctc cagaggacaa gaaggggagg aaagctcttg taaagaaaag 120
acgaagaaca atacatttgg tttcctgctg gctcttccaa agccttgcat atccagtagc 180
attcacaat tgattagggg cattaagact ctctcccaag tatttgtgta caaagaagaa 240
gacgaggagc taatggaaag agagatggaa atcggatata caactgatgt gaagcatgta 300
acacacatag gattgtagtg aactactatg acaaatccta ttaagggctg ggaatgcctg 360
aaatctccag aaataattcc attcccttca tttactttaa ggcagttcga gcttgcaatg 420
gctgcacaag ctcatggacc tcttgttggg gtcgatcatt ccaagcttgt ttga 474

```

<210> SEQ ID NO: 5
 <211> LONGITUD: 2154
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: *Populus tremula x tremuloides* KR152

5

<400> SEQ ID NO: 5

```

atgccttcaa gacccttgtc tccaagtttt gaccatecta gaccagttt cttaaccaaa 60
accaggatct tgtttttgac actcacaatc tcagcctctg tgattttgat tcttaccatt 120
ctttactttg tttaccatct ttgggtgcacc cttgtcaatc gttcaagaac catccctttt 180
gactctagtg ctcccttaaa gcttcaaaga ttttcataca aggagttaaa gattgccact 240
aatgattttg atgatgcgaa tattattggc aagggtgggt ctgctactgt ctttagagge 300
attgcaaggg atggcaagtt atacgctatt aagagactcg atgctctttc tttacaatca 360
gagagagagt ttcagaatga gttgcagatt ctcggtggtt taagatcacc tttcttgggt 420
attccttttg ggtactgtgt tgaaaagaat aagcgcttac ttgtttacga gtatgtgcca 480
aataaaagtt tgcaagaatt gctgtttggg gatggtcatt tgagtctgtg ctgggagaga 540
aggtttaata tcattcttga tgttgcaaaa gcacttgagt ttttgcacct tggatgtgac 600
ctccagtgta ttcattggga tgtaagcca agcaatggtt tgcttgattt tgatagaga 660
gcaaagattt cagattttgg gttatcaagg attaaggtgg agggggagt tggagtggat 720
ttgtttagtc aagatttggg aaagagtcaa gagctatgga agagtcaaga gcttccaggg 780
aatttgactc cagaaacacc agcaattggt acccctgtgg agagttgtca cgaggtagac 840
ttgctcttg ctttacaagc ttcttcttgc tcaaaaaaca gtagaacatg ttataatgtt 900
aaggctttga acttgaattc tgtgaattat aacgccaata ttgctgggtg gagtgatgtc 960
aaggtaggga atgggaagg gaaggaggtt tcaagtgttg atattggcgg ggatgattgg 1020
aattgtagat ttgtgccgta tgatgatgag tttttagta atgatcatag taaggagttg 1080
aattgtaata gcttctctgt tgttgacgat tcagctagta gtaaacaatg gggaaaggat 1140
tggtggtgga gacaggatgg gagtggtgaa ttgttagta aagattatgt tatggagtgg 1200
ataggagacc aaatctgcc ctcaacaatc ccggactggg aagatgaaaa gaaaagtact 1260
cctgaaagaa cagaaatgcg tcgttctgtc gcattagata aattagctga tgcaaatgaa 1320
ctccacgat taaaagattt caagtttgaa aatcttgtta gaggattcga gaagaaagaa 1380
tctagagca gaaaaaccg tcggaagaaa aataggaaga tgcaagagtg gtggaaagaa 1440
gagcacttgg atgagattaa caagaagggt agtaagctga agaacttga aacaaagtgg 1500
agaaaagggt ttaaaatccc acattttgat ctcggctcga ggttctggtt tcacagggca 1560
aagaaattgg gagaacagaa ccaaatgag actgatcaaa atggggagt cagtttcaga 1620
aggggatgga agaaaaagaa cttgcaatct gctggaagtg atatgtggag tggggatctt 1680
ttcagtcgtg agttaagcag cacaacaagc atgagaggca ctctctgtta tggtgcgcca 1740
gaatatggtg ggtgtggata cttgatggag aaggctgata tatacagctt aggggttcta 1800
atcctcgtga ttgtctccgg taggaggcca ttacatgttc ttgettacc aatgaagctt 1860
gaaaaggcaa atttaataag ttgggtgcagg cagttagctc aaactgggaa catcttagaa 1920
ctttagatg agagaatgaa ggatgaacac aataaggagc aggcaagctt gtgtataaac 1980
ttggcgtga catgcttgca gaggatgcct gaattgagge cagatattgg agagatagt 2040
aagattctga aaggggagat ggatctaccg catcttctt tcgaattttc tccctctcca 2100
ccttccaat tgttttagtag gtcaaggaga aaacaaaaat ctaatgcaga gtag 2154

```

10

<210> SEQ ID NO: 6
 <211> LONGITUD: 2520
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: *Populus tremula x tremuloides* KR163

15

<400> SEQ ID NO: 6

```

atgtgcaata gcagtaatgc gttgctggtt ttattgtttt tggtagattc tttggcctgt 60
tctgtcactg cctctgtgtc ttatgactct aaggccatca ccattaatgg ccaaagaagg 120
attcttattt ctggatccat tcaactacca agaagttccc ctgagatgtg gccagatctt 180
attcagaagg caaaagaagg aggactggat gttattcaga catatgtttt ttggaatggg 240
catgaacctt caccaggaaa gtattatttt gaggggaact atgatctggt caagtttgtt 300
aagctggcga aggaagcagg cttttatggt catctcagga ttggacctta tatctgtgct 360
gagtggaaact ttgggggttt cccagtttgg ctcaagtaca ttccaggcat caatttcaga 420
acagacaatg gccctttcaa ggctcaaatg cagaagtca caacaaagg tgttaacatg 480
atgaaagcag aaaggttatt tgagactcaa ggtggtccaa taattctctc ccagattgag 540
aatgaatatg gacccatgga gtatgaaatt ggttcacctg gtaaagctta caccaaatgg 600
gctgcagaaa tggctgtagg tctcogtact ggtgtcccat gggcatgtg caagcaagat 660
gatgcccag atcctattat caacacctgc aatggtttct actgtgatta cttctctcca 720
aacaagctt acaaaccaa gatgtggact gaagcttga ctggctggtt tacccaattt 780
ggtggccag ttctcaccg accggctgaa gatagcctg gatagcctg ttcgggtgc aagttcata 840
cagaaggggg ggtcattcat aaactattat atgtatcatg gagggacaaa ttttggccga 900
actgctggtg gtcctttcat tgcaacaagt tacgattatg atgctcctct tgatgaatat 960
ggactgtaa ggcagcctaa atggggccat ttgaaagatt tgcacgggc aattaagctg 1020
tgtgaaccog ctttagtate tggagatgca actgtgatac cacttggaaa ttaccaagag 1080
gctcatgtat tcaattataa ggccggaggt tgtgcagcat tccttgcaa ttaccatcag 1140

```

```

agatcatttg caaagggtgc atttaggaat atgcattata acctgcctcc atgggtccatc 1200
agcattcttc cagattgcaa gaacactggt tacaacactg caagggttg agctcaaagt 1260
gcaaggatga agatgacccc tgttctctat catggagggt tctcttggca agcatataat 1320
gaagagccgt ctgcaagtgg tgatagcaca ttcactatgg ttgggttgct ggagcaaata 1380
aatacaagct gagatgtttc agactatttg tggtagatga cagacgttca tatcgacccc 1440
agcgaagctt ttctgaggag tggaaaatat cctgttcttg gtgttctatc agctgggcac 1500
gctttacatg ttttcatcaa tggtaacta tcagggaccg cctatggaag tttagatttc 1560
ccaaagtga catttactca aggtgtaaag ttgagagctg gctcaacaa aatttctctt 1620
ctcagcattg ctggttgtct cccgaatggt ggcccacact ttgagacatg gaatgctggt 1680
attcttggac ctgtgacgtt gaatggtctc aatgagggaa gaagggactt gtcctggcag 1740
aagtggctctt acaagattgg tcttcatggg gaagcattgg gtctccattc aatcagtggg 1800
agttcctcgg ttgagtgggc agagggatct ttggtggccc aaagacagcc actgtcatgg 1860
tataaaacta ctttcaacgc tcctgctggg aattcccctt tggcattgga tatgggcagc 1920
atgggaaaag gccagatatg gataaatgga caacatggtg gacgtcactg gcctgcttat 1980
aaagcatctg gaacatgtgg ggactgtagt tatattggaa cttataatga aaagaaatgc 2040
tcaactaatt gtggcgaggc ttcccagaga tggatcatg tcctcagtc atggctaaag 2100
ccaacagga acttgctggt tgtgtttgaa gaatggggtg gagatccaaa tgggatttct 2160
ttggttagaa gagatgtaga cagtgtgtgc gctgatattt atgagtggca gccaaatttg 2220
atgaattatc agatgcaagc atctggtaaa gtcaataagc cactgaggcc taaagctcat 2280
ctgtcatgtg gccctggaca gaaaatcaga tcaatcaagt ttgccagctt tgggacacca 2340
gaaggggttt gtggtagcta tggccagga agctgtcatg ccttccactc ttatgatgct 2400
tttaacaatc tttgtgttgg gcagaattca tgctcgggtg ctgtagcacc tgaaatgttt 2460
gggggagatc cttgcctgaa tgtcatgaag aaactagcag tagaggccat ttgcagctga 2520

```

<210> SEQ ID NO: 7
 <211> LONGITUD: 654
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: *Populus tremula x tremuloides* KR221

<220> CARACTERÍSTICA:
 <221> NOMBRE/CLAVE: misc_feature
 <222> LOCALIZACIÓN: 489, 534, 570
 <223> OTRA INFORMACIÓN: N=A, T, C O G

<400> SEQ ID NO: 7


```

ctcagccaga tgtgtcctga gcttgcttgg atgacaacaa gcaactggaa ttattgctgc 60
attaactata ttataagaag cagttactca gtggggatcc tgggtgggcat ttgctgtcat 120
ggacactacc agatgagagc ttgctgaacg tcatctaate aggggtgaga gggggggaaa 180
ctgatttaag cgtgattgtt tcagctcgtg gcagctatctt attatctatt gaaatcctat 240
gcggtttttg tctgccacca cggcaaagga agtaaaggat tctatgttcg taatacattg 300
agaagggaga acaaggcagc aggctggcct gggattgaaa gaggacagca aaaagaagat 360
gagatcttta tagatgactg ataaatgtcg atttcctggc aagcatgaag actctcgtgc 420
caggcttctt attgagaatg gaaagtggag tcttgcttct tgttgactc tgggttcttg 480
gcgaggacnt tttgatttgc acgtgacaga gtcattaggt tgtttgtcca tgnatcaggt 540
gggattaccc acagtgtgtt ntgagttgtn tagagaaaag tgtccccagg gatggagact 600
gtgacccctt ggccagtta ttggctattg tctcctcgtc ttttttttaa atgt 654

```

<210> SEQ ID NO: 8
 <211> LONGITUD: 880
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: *Populus tremula x tremuloides* KR224

5

<400> SEQ ID NO: 8

```

gccaaataga gattttttcg agctagctgt atagttgaag agaagctgaa gaggaagaga 60
tggcagagca ggaggtgaag aaggtagagg ctgtaacgcc cgtggctcca gctccagtgg 120
aaactaaaag tgatgtggcc gatgggaaag ttacggctcc accacctcca gtggctgcag 180
agaaacagaa ggcagctact gctgctgagg aatcaaaagc tcttgctgtt gttgaaaaga 240
cagaacctgc tccgaagaag gtttcaggcg gatcaattga cagagatgta gctcttgctg 300
accttgaaaa agaaaagaga ctttccttta tcaaggcatg ggaagacagc gagaaaacta 360
aagccgagaa caagtctcag aaaaatttct ctgctgttgc tgcctgggag aacagcaaaa 420
aggcagctct ggaagccaaa ctgagaaaga tggaggaaaa actggagaag caaaaggcag 480
aatatgcaga gaaaatgaaa aacaagattg ctttaattca caaagaagct gaggaaaaga 540
aggcaattgt tgaagccaaa cgcggggaag aggtcttaaa ggcaggggag acgctgcaa 600
aataccgtgc tactgggcaa accccaaaga agctccttgg ttgcttctga agtcgcaact 660

```

```

ttaggagcct agcatggaag cggaaagttg aatcatcatt cttcctctgc atatagtgtt 720
ttttaactcc ttgtttttct tgcttgcttg cttctctctt ttttccaca tggtttcatg 780
tcttctttca ttaaacatcg gaaaatttaa atattcagtg tgtttatgta taggaataca 840
atatttgatc tgtgagaaac aagttaaca tgtttgtgaa 880

```

10

<210> SEQ ID NO: 9
 <211> LONGITUD: 1020
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: *Populus tremula x tremuloides* KR235

15

<400> SEQ ID NO: 9

```

atggaacttg ggcttgtgga gttgttgaga gcagcttggg ttgcagggac actgcctata 60
cttatagctt cactgccatg ttcttggctg ggttcttttc atggacttgt tttggggttt 120
gcaaggagag gaaagatcat gcaatcatca tctcatcgta aattcactgt tccccaaaga 180
ttctttactc atttctatgt ggtggctgtg gcgtggacaa ctctcttgct tcttggaaaca 240
tcgatatatg cttatagaat gacaccaata gtttctgagc cgtttttcta ctctgatctt 300
ggcagctact tggcaggacg atcaaacata ttctcatttc atcgatcacg gttgatgagt 360
ttagagaata gatacagggt ttggcattct gtgtttctgc ttttgctaat ggaagttcaa 420
gtctcgaggc gtcttttoga gacagcatat gtatttaatt atagcgctc tgctcggatg 480
cacatttttg gctatcttac tggcttattc ttctacacag cagcgctctc gacactctgc 540
tgtacctgtg caccggaagt actcaaattt ggcataaatt aagtgtctga gttcattctt 600
aaaggcacia gctcaatgca aaacattgaa tttcactggg gggactttgt taacccttta 660
ttgaagcttg gatggtgcca gtggattggc gcagttatat ttctttgggg ttggattcat 720
cagcatcgtt gccatgcaat tcttggctca ctaagggaac acgtgggaaa ggctgatgaa 780
tatgtaattc cccgtggtga ttggttcgag attgtttcat ctccacacta tttggcagag 840
attgttatat atgctggcat ggtttttgct agtggagggg cagacctcac catttggtta 900
gtttttggat ttgtggtgtc aaatctggtg tttgcagctg cagaaacaca caggtggtat 960
cttcagaat ttgacaatta tccaagcaac cgtgttgcaa ttattccatt tttatggttaa 1020

```

<210> SEQ ID NO: 10
 <211> LONGITUD: 1344
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: *Populus tremula x tremuloides* KR240

5

<400> SEQ ID NO: 10

```

gagactgaga tgatgaagga aaggttttca aaattgctgc tcggagaaga tatgtctggt 60
tgtggaaatg gggtttgtag agcattggcg atctcaaag ccattactaa tctatgogct 120
accttgttcg ggcaactatg gaggttgag cctctaccac ttgagaagaa agctatgtgg 180
cgaagagaga tggaatggct tctttgtgtg agtgatcaca ttgtggagtt gatgcctct 240
tggcagacat ttccagatgg aagcaagctc gaggttatga cctgcggacc tagatcggat 300
ctctacataa atcttcagc tctgocgaaa ttggacaaca tgcttcttga gatattagat 360
agttttgaca atactgagtt ctggtacgct gaccaagggg tcctggcccc tgatactgat 420
gggtcagcct ctttccgaag aacctgcag cgccaagaag agaagtgggt gctacctgtg 480
cctcaggtac ctctggagg cctccatgaa aattcaagaa agaagttgca gcacaaacgt 540
gattctacaa atcaaatatt gaaagctgcc atggctatca acagtattac tttagctgaa 600
atggaaatcc ctgaatctta cttggaggct cttccaaaga atggaaaagc cagcctagga 660
gacctcatct atcgatatat ttcttcagat caattttatc cagaatgtct ccttgattgc 720
ctagatttgt cttctgaaca tcaagctata gaacttgcca accgagtggg ggccctcaatc 780
tatatatggc gcaaaagaac caattataaa cctgccagta gtacaaatcg atccagttca 840
aagtctgtag ggaattgggt caaggaactg atgattgatg cagacaagag ggaattgctt 900
gctgatagag cagaaagcct cctactttgc ctgaagcagc gattccctgg tcttccacag 960
acaactttgg atatgagcaa aatccagtac aacaaggatg ttgggaaatc cattttggag 1020
agctactcga gagtcttaga gagcttgcca tttaatattg tggcccgaat tgacgacctg 1080
ctctacgtgg atgatttgac aaaacattcg gatcatttct cttcaatctc taaagtcaat 1140
gtgattgctc acaaaagtgt aacaattcca tactcggctc ccgtctcaa cactccatc 1200
aaaacagctt tcaacacacc aagcttttca ccaggtcaac aacgaataag ccctgcaaa 1260
ggagaccgat cgcctttcat gaccagtggc aaaattcctc agcgtggtt aggcgtaaaa 1320
aaggtattga cagagtatct cagt 1344
    
```

10 <210> SEQ ID NO: 11
 <211> LONGITUD: 1026
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: *Populus tremula x tremuloides* KR242

15 <220> CARACTERÍSTICA:
 <221> NOMBRE/CLAVE: misc_feature
 <222> LOCALIZACIÓN: 32, 33, 206, 248, 423
 <223> OTRA INFORMACIÓN: N=A,T,C O G

20 <400> SEQ ID NO: 11

```

agtcccatc ttttctctag cccaagttt nntnttgagg ggtgataaaa aatgaaccaa 60
gagatgaatg gtggtgacac tgagattgat cagaaccacc aagagaatgt gcaagagaaa 120
atcgattatg tgtttaaggt ggtggtgatc ggtgactctg cagtgggcaa gacgcaaatt 180
ctttccaggt ttaccaagaa tgaatntctg ctttgattca naagtctacc atcgggtgctg 240
anttccanga ctaggactgt catcattaaa gacaaggctc tcaaggctca gatctgggat 300
actgctggcc aagaaaggta ccgggcagtg acaagcgcac actatagagg ggcactatgg 360
gccatgtag tctacgacat taccaagaga ccaacgttt atcatgtggc taggtgggtg 420
gangagctcc gagcccatgc tgacagctca attgtgatca tgctgatcgg aaacaaggct 480
gatcttgtgt acctcagggc agttccaaca gaagacgagg tggaatttgc agaggatcaa 540
ggcctctttt tttctgagac atcagccctt agtggtgaca atgtggacgg tgcatttttc 600
aggctgctag aagaaattta cgggtgtgatt tgtaagaagt cattggaatg tggcaatgga 660
aaaccccatg ctgctgatgc cataacgctt agaggttcta agattgatgg catatcaggg 720
acggatctgg agattagtga gatgaagaaa ttatctgctt gctcgtgtg atttgatcat 780
ttttcttgtg aattgtgtac tataagactt caccactccc atgttcttaa ttgattctgt 840
ggctttcttt ggaaagtggg gatcggctgt gtggtgaggg tggcaagttt tttcttttct 900
gtgacctgtc aagatttttag cagtattgta cttgtcttac agaaccatg aattgtggtt 960
ttttatag tattgatttg gatggatggg tttccttttc cttcaaaaaa aaaaaaaaaa 1020
aaaaaa 1026
    
```

<210> SEQ ID NO: 12

<211> LONGITUD: 820
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: *Populus tremula x tremuloides* KR292

5 <220> CARACTERÍSTICA:
 <221> NOMBRE/CLAVE: misc_feature
 <222> LOCALIZACIÓN: 148, 237, 254, 432, 435, 437, 452, 467, 492
 <223> OTRA INFORMACIÓN: N=A,T,C O G

10 <400> SEQ ID NO: 12

```

atatgaacgc ttctctatgg gtttgtcatg tggagaggat gattttgaaa agaatggaag 60
tcatgaagtt ccgtaaatag ttgatagcag agggactaga gtcagcggtg gctatatgga 120
ttnacaacat cttcatcatg cagttganta cgaggtcgaa ttctggccag ttgaacaccc 180
aatggaacca caggatgaag atcgtcctgt caaatgtcca atgccaacct cttctgntat 240
caagaatgga aggnccgatg aggagagatt agagaagaga gcggacgact ccaactacct 300
gcggtaatga acaacaagc cattgtttgtg gtggctgcag agccccagt ccgagcagtg 360
cgtaaaaggc accatacact taccgccag gaccaccgtg taatagcacc tgatctaaca 420
aggatggctt cnacntntcc tgctctgcca anctcagaac gtcaccnatt tttcaaatgc 480
ttcaagaact cngacaagtt cgatcagtat taaaaaggta taaagaataa attaggaaac 540
ccacatttcc gtcctateta gctttaatag ctacttttca atccattgcg gagcggtcaa 600
tgaattcttc atgatttcta tttcgggcca atagggaaag aaatatcata gatatgcggt 660
ataagaagca ctcttattgt actagatttt tattttttat atattctgta gaatgtgtct 720
tccagcctaa ttgtaggttt cctttatcat ttctttgttc agatttggat ggataattag 780
catgacactc tgcaatacca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 820
    
```

<210> SEQ ID NO: 13
 <211> LONGITUD: 1149
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: *Populus tremula x tremuloides* KR313

20 <400> SEQ ID NO: 13

```

atgcctcagt tggtttcttt taaggaggaa agtactaaag ttgctgatct tcttgattct 60
gagaagaaag cacttcaaga atttaagcag cttgttcaag aagcacttaa caagcatgaa 120
tttatgacac cagaagaagt atcaatctgg ggaataccac ttcttgctga tgacagaagt 180
gatgtgattc tcttgaaatt tctcagagcc agagatttca aggtgaaaga tgcattcacc 240
atgctcaaga gcacaattcg ctggagaaag gagtttggca ttgatgaatt gcttgaacaa 300
gatttaggct ttgatgattt ggggaaggtg gtatttatgc atggtcttga taaagagga 360
caccagtggt gctataatgt ctatggagaa ttccaaaaca aggaacttta caagaattca 420
ttttctgatg aggagaagag gcagagattc ttaaggtgga ggattcaatt cctggaaaaa 480

agtatcagga cattggattt cagtcccgtt ggaatttcca caattgttca ggtaatgac 540
ttgaaaaatt ctccctggacc agctaagaga gagcttagac aagctactag acaggcactt 600
caattgcttc aagacaacta tccagaattt gtggccaaac agatcttcat caatgttccc 660
tggtggtacc taacagtaaa tagaatgata agtccatttt taaccagag gaccagaagc 720
aagtttctct ttgttggctc ttccaaatct gccgaaaccc ttatcaggtc catagccgct 780
gagcaaatac cagtgaagta cggaggacta agcaaagatg gtgaatttgg ctcagctgat 840
gctgttactg agattaccgt gaagccagca gcaaagcaca ctgtagaatt cccagttact 900
gagacatgcc ttttaacatg ggaagtgaga gttgcgggat gggatgtgag ctatagtcca 960
gaatttgtac caagtgtgta agatagctac acagtgatca tccaaaaggc tagaaagggt 1020
gctgcaactg aagaaccagt ggtttgcaac agtttcaaaa ttggtgaacc tggtaaagtt 1080
gttctcacca ttgacaactc cacatccaag aagaagaaga agctcctcta tcgcttgaaa 1140
accaagccc 1149
    
```

<210> SEQ ID NO: 14
 <211> LONGITUD: 1511
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: *Populus tremula x tremuloides* KR318

25 <400> SEQ ID NO: 14

ES 2 571 338 T3

```

gcataataat tgtttaagag aagaatattt gtctcgcatt ggcgctccca tgtcttctaa 60
atcactactt tcttttgtga tttatggttt tcttcttctt tccccctgta actctttgaa 120
ggacaatgcc gatgaaggaa cgagagcata ttttcatact ctcaaaatca gttctctccc 180
atcaacagaa gtctgcaagg aatcttccaa agctctcaac gagggttcat catccctaaa 240
attagtacac aggttcggtc catgcaatcc acacagaaca tcaactgctc cagcatcatc 300
cttcaacgaa atcctccgtc gagacaaact tcgagtgaggac tcaattattc aggcccggcg 360
ttcaatgaac ttgaccagca gtggtgagca catgaagagt agtgtcccgt tctatggtct 420
atccaaaatc actgcaagtg actatattgt caacgttggg atcgggcacgc ccaagaagga 480
aatgccactt atatttgaca caggcagtgg tctcatttgg actcaatgta agccgtgcaa 540
ggcttgctat ccaaaagtac ctgtgttoga tccaaccaag tcagcttcat tcaaaggcct 600
tccatgttcc tcaaagctat gccaatcaat caggcaagga tgctcctctc cgaagtgcac 660
ctacttaact gcatatgtag acaacagcag ctccacagga actttggcca ccgaacaat 720
atccttttagc catttaaagt acgacttcaa gaacattttg attggatgca gcgatcaagt 780
atctggtgaa tcacttgagg aatctggtat aatgggacta aaccgctcac ctatatcttt 840
agcatcacia actgctaata tatacgacia actcttctct tattgtatac cgtcaactcc 900
tggctcaact ggtcatctta ctttcggcga caaagtgcg aatgatgta gattctccc 960
agtatctaaa acagcaccat cttcggacta cgacatcaaa atgactgaa tagtgttg 1020
aggccgtaaa ctattgatag atgcatcggc ttttaagatt gotagcacca tcgactctgg 1080
tgcagtgtc actcggctgc ctccgaaggc atactcggca ctgaggtcag tgttccgaga 1140
aatgatgaaa ggttatcctt tgttgacca agatgacttt ctagacacat gctatgactt 1200
cagtaattat agcacggtt caataccttc gattagtgtg ttcttcgaag gtggcgtgga 1260
gatggatata gatgtttcgg ggatcatgtg gcaggttcca gggagcaagg tgtactgctt 1320
ggcatttgcg gaattggatg acgaagttc aatctttggg aattttcagc aaaagactta 1380
cacagtagtc tttgatggtg cgaaggaaag gattgggttt gcccccggtg gctgtgacta 1440
aaatggaaaa aaaaatcttg gagcactagc tctaattat aatatatcaa taaaatggtt 1500
tgattttaca t 1511

```

<210> SEQ ID NO: 15
 <211> LONGITUD: 1125
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: *Populus tremula x tremuloides* KR459

5

<400> SEQ ID NO: 15

```

gacacctgca catcgtttag ttgattttgt tgccaggaaa gatatcgtca ccgtcatgac 60
agaagttgtc agcaatattt ctccccctcc tggttctgta gcaaccgtat cagatgcacc 120
tcccatccat tacatggtta aaatagagtc attttcgtca cttgggaaaa atgcagtgga 180
gacatatgaa tcagggggtt ttgaagctgg aggctataga tggaaattag ttctctatcc 240
gaacggaaac aagagcaata atgtaaaaga ttccatctct ctctatttag caatggttga 300
cgcaagttct ctccacgtg gttgggaggt caacgtgatt tttcggttgt ttttgcttga 360
ccaaaacaag gacagctact tggttaattca agcaggaaag gaaagacgct ttcacggatt 420
gaatcttcaa agtggttttg atcaattcat taagctttca acatttaatg atgctcgtta 480
tggattcctt ctggaagaca cttgtgtgct tggagctgaa gtatttgtct gtggagaaag 540
aagcagaggc aaaggagagg tcttatcaat gaaaaaggat cctactgctt ccaagtacac 600
ttggaagatc gtgaactttt ccaagttgga tgaaaaacgc caagaatcac aaatattcag 660
caccggagat catcaatgga agatggtgct ctatcctaag ggaaaaggtc ttggaatggg 720
caccatctt tccctctact tggctctgga tttggaace ctccctgctg gttgcagagt 780

```

```

atatcgggat tacaccttgc gccttgtgga tcaagtctat aacagacaga tcgactggta 840
ttataaagct aaaagctggt ttggtgcctc aagcttagca aatggatggc caagatatgg 900
tcccctgagt ttatatcagt caaacgatta cctttttgcc aaggacattt gcgtaattga 960
agcagaggtc ataatacttg gaattggttc tcccttttag ttatgatttt attttatttt 1020
ttattttcaa tcagaaatat attggatata atgtaaagaa tttcatcgac tttactaatg 1080
ggaaggtact ttatgtaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 1125

```

10

<210> SEQ ID NO: 16
 <211> LONGITUD: 1693
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: *Populus tremula x tremuloides* KR463

15

<400> SEQ ID NO: 16

```

atggcgaag aatccaaatc tttgcagtac acacctacat gggtgattgc tgctgtctgt 60
tttgtcattg ttctcgcctc catttttgca gagcgaggtc ttcataaact gggaaagtgc 120
ttgaggaata cggagcaaga tgcattggtt gaagccttgc aaaaattaaa agaagaattg 180
atgcttttag ggttcatttc ccttctgcta acagttaccc aaaatacaat aagccgcata 240
tgcattcccac ctccagcttg taccatgac ttgccatgca agagagaaac tgagagcagc 300
aaccacgaaa aaatctataa tcaagctata aacaatcgac gtcactact atctgcaact 360
aatagtgcag aacggtgtgc tegtgagggg aaggttccat tgggtgtctgt ggaagcattg 420
caccaactgc atattttcat ctttgtgttg gcaattgtcc atgttatctt ttgtgtatct 480
acaatgattc ttggaggggc aaggatacga caatggaaga cttgggagga ttccataaga 540
catccatcaa aaacattcag agatcaagca aagcatcaac atgaacacca ttattttcac 600
aagttcatta aaaaacacga aaaaggatat tggagaaagt cagctgtttt aagttggctg 660
atagcattct tcaacaatt ttatcactcc attaccaat cagactacat tgctcttcga 720
aaaggattta tcacagcgca ttgtcccat gtgttgaatt ttgattttca caattacatg 780
atgcccagac tgcagattga tttcaaaaga atgttacca taagctggta tctgtggctc 840
tttgttgtga tgtttttgct gatgaatgtg gaaggggtgc attcattttt ttggctgtcc 900
ttttaccaga taattcttct gctactcgtt gcgctaaat tagaacacat taccactagt 960
ttaaggccaca gagttgcaga gatgccagt ctatcgcagc aagcacgagt acagccttca 1020
gatgaacatt tctggcttga gaaacctgcc attgttcttg acttgattca gttcattctg 1080
tttcagaatt catttgagat tgctttcttc ttctggattt ggagcacata cggattccgc 1140
tcatgcatca tggaaagagt gggctacatt gtgccaaaggc ttattatggg tttagtgtgt 1200
caagttctat gcagttacag caccttgccct ttgtatgctc tagtctcaca gatgggcacc 1260
agtttttaga aagggatggt tggtcaggat gtggaagcgg caataggaat ctgggcaggc 1320
ggagcaaagg acaagaggga cccaagcgag aaccacggag cacgtatgca taaactagcc 1380
acagaatcat ctcatagtgc ggcacaagaa atggttattg atggaggcac agagctttct 1440
tctgtgacct aagcgcctgt atcttgaat ttggttcttc ggcaaaaagg caaaagggaa 1500
catccactta catctcctca agccttaaat ttccgcagac tcaacattta gccaaacct 1560
tgctcataac ttaatattct gtgaatgttt ttcactttgc tttatttaat ttgccagtca 1620
ttgctattct tttcatccca cgaaaaatcc ctccaccacc tattgaaccg aatgcccttg 1680
tggtaaaaaa gaa 1693

```

5 <210> SEQ ID NO: 17
 <211> LONGITUD: 3294
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: *Populus tremula x tremuloides* KR465

10 <400> SEQ ID NO: 17

```

ctccttcttc ttctccttct ccttctcctt ctccaccttc aaatctatgc acccaccacc 60
actgcacgca ctgtatcaga atatgaagct ctctctcca taaaatcctc catcaccgac 120
gacctcaat catttctctc cgcatggaac tccacaaccc cactttgctc ctggactggc 180
atcacctgtg accacactgg ccgtcgagtg acctccttag acctctccgg tctcaacctc 240
tcgggcactc tctcctctga cgtagcccac ctctgttaoc ttcaaatct ctccctggct 300
gtcaaccagt tttccggccc aatcctgccc tcaactccg ccgtcacttc cctctgctcc 360
cttaacctct ccaacaacat ctcaactcc acattcctc cacagctctc ttccctcaag 420
aaccttcaag ttcttgacct ttacaacaac aacatgacag gtgggttgcc actaacgta 480
gtggaatgca caaatctccg gcatttacac ctggcgggta actattactc cgggaaaatc 540
ccatcagaat atggaaaatg ggggtttctt gaatatcttg ccactctccg taacgagctt 600
gaaggtagca ttctgttga gttaggtaac ttgactaaat tgcgtgaact ctacatcggg 660
tatttcaata cttacgaagg tggtttaccg cctgagatcg gtaatttatc cagcttgggt 720
cgttttgacg ctgcaactg tgggttatcc ggccaatac cgccggaaat tggcaggtta 780
cagaagctgg acacattggt tcttcaggtt aacgggcttt cgggttcgtt aactccagag 840
cttgggagct tgaagagctt aaaatccatg gatttgcaga ataataatgtt cacgggggag 900
attcctacta gttttgcaga gttaaagaac ttgacccttt tgaatctgtt tagaacaag 960

```

```

ctgtacggag caatcccga gttcatcgc gagtgcgcy agcttcaggt gttgcagctg 1020
tgggagaata atttcacttc aactattcca caggccttgg gtcaaaatgg gaagcttgag 1080
atthtagatc tttcatccaa taagcttact gggactttgc ctctaataat gtgcttgggt 1140
aataatctgc aaactttgat cactcttagc aatttcttgt ttgggccat tcctgaatcg 1200
cttgacaat gtcagtcctt gtagagaatt cgaatgggag agaattttct caatggctca 1260
attcctaaag ggctttttga ttgccaac ttgagtcaag ttgagttgca agataatctt 1320
ctagctgggg agtttctctg gattggtaca ttggtctgga atcttggcca gcttagtctc 1380
tcaaataatc gcctcacagg gtctttgcct cctagctgcy gtaacttttc tgggttcaa 1440
aagtttctcc ttgatgggaa caagtccagt ggttcaatcc cacctgagat tgggaagttg 1500
cagcaactta ccaagatgga ttttagccac aacaagttt cagggtccat tgctccagag 1560
attagtcaat gcaagctggt aacgtttggt gatctcagta gaaacgagct ttcaggtgag 1620
attcctactg agattacagg tatgaggatc ttgaattacc tgaatctctc aagaaatcat 1680
cttgttggta gcattcctgc tcctatagcc actatgcaga gcttaacttc tgttgatttt 1740
tcttacaaca atctttctgg ttggtccct ggtactggtc agtttagtta tttcaattac 1800
acttcgtttt tgggtaatcc tggctttgc ggtccctatt tgggccctg caaagatggg 1860
gatgtaaatg gaactcacca gccacgagtt aaggggcygc tctctcttc tctgaagctc 1920
ttgcttgta ttggcttgc tgtttgctcc attgcyttg cggctcgygc tataattaag 1980
gctaggtcgt tgaaaaaggc cagtgggct cgtgcttggg aattgactgc tttccagcy 2040
ttggacttta ctggtgatga tgttttggat tgcttgaag aagacaatat tattggtaaa 2100
ggtggtgcyg ggattgttta caagggtgca atgccaatg gtgatcatgt tgctgtgaaa 2160
agactaccgg taatgagcgg tggatcttct catgatcatg gattcaatgc tgagattcag 2220
accttgggga ggattaggca ccgacacatt gttagattgt tggggttctg ttcaaccac 2280
gagactaatc tcttggctc taagtacatg cccaatggga gcttaggaga ggttcttcat 2340
ggcaagaaag gaggtcattt gcactgggat accaggata agattgctgt tgaggctgca 2400
aaggcccttt gctaccttca tcatgattgc tccccattga ttgttcaccg tgatgtgaaa 2460
tcgaacaaca tcttcttga caccagttt gaagctcatg ttgcagactt tggccttgc 2520
aagttcttgc aagattctgg cacatcagag tgcattgctg caattgctgg atcttatgga 2580
tacatagctc cagaatatgc ctacacactg aaggttgatg aaaagagtga cgtgtacagc 2640
tttgggtgag ttctcttga actcgttact ggtagaaaac cgggtggaga atctcgtgat 2700
ggtgtgata tagttcaatg ggttcgaaaa atgacagact caatcaagga agggtttt 2760
aaagtcctgg acccaagact cccatcagtt ccgcttcatg aggtgatgca tgtgttctat 2820
gttgcaatgc tttgcgtgga agaacaggct gtcgaacgcc caacaatgcy agaagttgtt 2880
cagattctaa cagagcttcc gaagtcacca agctcaaac aaggagactc agtaatcaca 2940
gagccctcgc cacattcagc cgcaccgca gcgctcgact ctctagttc aacagctaaa 3000
gacgtcccaa aagaccatca gcagccacca cctgccgac ttcttagcat ttgaagcatg 3060
ttgaatgggg ggttgcctgt ttgtacctaa aattccagga attgtgttag tttctgctcg 3120
tctttgtgtt ccttttcatt tttctgggg ggattttctc taatgtttgc aagtattttc 3180
ttttctttt ttgttgta ca gtaggtttt ggggaaggga ggtattttat tttcttaaat 3240
tataagactt gacttcatcc atgtagtaag tacttactgc ctgctgttgc tgac 3294

```

<210> SEQ ID NO: 18
 <211> LONGITUD: 774
 5 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: *Populus tremula x tremuloides* KR121

<220> CARACTERÍSTICA:
 <221> NOMBRE/CLAVE: misc_feature
 10 <222> LOCALIZACIÓN: 21, 347, 459, 367, 374, 380, 403
 <223> OTRA INFORMACIÓN: N=A,T,C O G

<400> SEQ ID NO: 18

ES 2 571 338 T3

```

tggagacgat tgtgtggcag ntaaaagcgg ttgggatgag tacgggattg catttggaat 60
gcccacaaaag caactagtca tcagacggct cacgtgtgtc tctccgtaca gtgccacgat 120
tgctctaggg agtgaaatgt cgggtgggat agaagatgtt agagcagagg atatcacagc 180
catccacaca gaatctgggg tcaggatcaa aactgctgta gggagaggag ggtttgtgaa 240
ggacatatac gtgaagagaa tgactatgca caccatgaaa tgggtctttt ggatgactgg 300
aaattatggg cacatgctga taagaattat gacccaaacg cactgcnatt gattcaagnc 360
ataaatnaca gggncatggt ngcagacaat gtgacaatgg cgncaagatt ggagggcattc 420
gcagggcgtc cattcaagga aatttgcatc tctaastgtca caatcggatt ggcaccgaag 480
gcgaagaagg taccctggac ctgcaccgaa attgagggga tgacaagcgg ggtaagtcca 540
cggccatgtg atttgctacc ggatcaaggg ccagagaaaa tcacatcctg tgatttccct 600
cgggagaata taccaatcga cttggtgacg ctcaagacgt gctccttcgg aatgagttat 660
atgtgaactt tgcttctcta ctaccatcaa gcaatgtata aacactgcta gctccgagca 720
aaaaatatat ataatctact agtttttctc agttttataa aaaaaaaaaa aaaa 774

```

<210> SEQ ID NO: 19
 <211> LONGITUD: 268
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: *Populus tremula x tremuloides* KR125

<220> CARACTERÍSTICA:
 <221> NOMBRE/CLAVE: misc_feature
 <222> LOCALIZACIÓN: 171,232
 <223> OTRA INFORMACIÓN: N=A,T,C O G

<400> SEQ ID NO: 19

```

tgcctctcac gattacggcg cttgtttcca tgccatggag gagagagcta tggaaagatgg 60
gatcccagag tttttgaaga ggtcgatcat attgcagact tttggtgtca aatttaacca 120
tccatgccaa gacgttgaga atgtcgtgat accaccttac atctcggcgg naagcgtacg 180
gacaaccctc gagaaatc cgtgaccggc ccggcgggac atttgggect tntttagagg 240
caaaaggaag tgcccccaa aacattag 268

```

<210> SEQ ID NO: 20
 <211> LONGITUD: 672
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: *Populus tremula x tremuloides* KR129B

<220> CARACTERÍSTICA:
 <221> NOMBRE/CLAVE: misc_feature
 <222> LOCALIZACIÓN: 175
 <223> OTRA INFORMACIÓN: N=A, T, C O G

<400> SEQ ID NO: 20

```

gtcgaccac gtcgtcacgc ccacgcgtcc gcggacgcgt gggttctact tccatgacat 60
tatttacaac ggcaagaact ccaagaacgc caccgcggca attgtggggg cgccagcttg 120
gggcaacaag accatattgg ctaaccagaa ccattttggt gacttggttg tgtntgatg 180
acccattac cttagacaac gacctacact cggccccgat aggtcgagcc caagggattt 240
acgtgtatga caagaaagaa atcttcactg cctggctggg tttctcttc gtttttaact 300
ctactgagca taaaggaagc ataaaactttg ccagagctga tccattgatg aacaagacta 360
gggatgtttc agtgattggt gggactggag acttcttcat ggctcgagga atagccacat 420
tgatgactga tgcattcgag ggtgaagttt atttcaggct tcgtgttgat attcagttgt 480
acgagtgctg gtgacagttc ttgcttcag ttcagcattt gatgttctct ctttttaact 540
ggtttttcag caaaattaag aggaaggttg atttccttg gagttattga atcaagattc 600
ttgtatcacc aagtgtttca taattgaaat caacttttca tgaggttata accaaaaaaa 660
aaaaaaaaaa aa 672

```

<210> SEQ ID NO: 21
 <211> LONGITUD: 509
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: *Populus tremula x tremuloides* KR140

<220> CARACTERÍSTICA:

<221> NOMBRE/CLAVE: misc_feature
 <222> LOCALIZACIÓN: 295, 343, 357, 357, 420, 445, 460, 477
 <223> OTRA INFORMACIÓN: N=A, T, C O G

5 <400> SEQ ID NO: 21

```

agtcgtcacg cttgttcgat ccctgcacta atcctgatta atgcctgcat tcccttttag 60
atthttgtgtt tgatthttgtc ctgtaaggag ctggatatgc gggatcatat ggagagattt 120
gtagttcttc cattctccat cgctgtgct tctcactcca gtgttgatgt ggcctccagt 180
gaatcctcca agaaaccaag acccgaacc aaatcacatg catcaagagg acaagaagg 240
gaggaaagct cttgtaaga aaagacgaag aacagtacac ttggnttcct gctggctctt 300
ccaaagcctt gcatatccag tagcttgac aaattgatta gangcatcaa gactctntcc 360
caagtatttg tgnacaagga agaagacgag gagctaattg aaagagagat ggaaatcgg 420
tatccaactg atgtngaagc atgtaacaca cataggattn ggatgnact acgatgncaa 480
atctataagc ctgggatgct gaactcaga 509
    
```

<210> SEQ ID NO: 22
 <211> LONGITUD: 685
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: *Populus tremula x tremuloides* KR152

<220> CARACTERÍSTICA:
 <221> NOMBRE/CLAVE: misc_feature
 <222> LOCALIZACIÓN: 67, 187, 268
 <223> OTRA INFORMACIÓN: N=A, T, C O G

20 <400> SEQ ID NO: 22

```

acgcttttca gtcgtgagtt aagcagcaca acaagcatga gaggcactct ctggtatggt 60
gctccanaat atggtgggtg tggatacttg atggagaagg ctgatata cagcttaggg 120
gttotaatcc tcgtgattgt ctccgtagg aggccattac atgthtttgc ttcaccgatg 180
aagcttnaaa aggcaaattt aataagctgg tgcaggcagt tagctcaaac tgggaacatc 240
ttagaacttg tagatgagag aatgaagnac gaacacaata aggagcaggc aagcttgtgt 300
ataaacttg ctctgacatg cttgcagagg atgcctgaat tgaggccaga tattggagag 360
atagtgaaga ttctgaaagg ggagatggat ctaccgcatc ttcttttoga atthttctccc 420
tccccactt ccaaattggt tagtagtca aggagaaaac aaaaatctaa tgcagagtag 480
gttcagtaca tattctttgt tttctccat tgatcatggt tttactgagt ggtacatagg 540
atgggagctg taatctgata acacattatg gatgtgaagg tattttctta attcgagtct 600
acaatgctat atgtacatca gaatctcaga tgagtggatt ttgctttcct tgtctctaat 660
tggatatgca aaaaaaaaa aaaaa 685
    
```

<210> SEQ ID NO: 23
 <211> LONGITUD: 389
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: *Populus tremula x tremuloides* KR163

<220> CARACTERÍSTICA:
 <221> NOMBRE/CLAVE: misc_feature
 <222> LOCALIZACIÓN: 88, 238
 <223> OTRA INFORMACIÓN: N=A, T, C O G

30 <400> SEQ ID NO: 23

```

tagaagagat gtacgacagt gtgtgtgctg atatthtatga gtggcagcca actthgatga 60
attatcagat gcaagcatct ggtaaagnca ataagccact gaggcctaaa gctcatctgt 120
catgtggccc tggacagaaa atcagatcaa tcaagthttgc cagctthggg acaccagaag 180
ggthttgtgg tagctatcgc caggaagct gtcatgcctt ccactcttat gatgctnta 240
acaatctthg tgttgggcag aattcatgct cggtagctgt agcacctgaa atgthtggg 300
gagatccttg cctgaatgtc atgaagaaac tagcagtaga ggccattthg agctthgatga 360
gctacaaccg gcttgaagta aatgaaata 389
    
```

35 <210> SEQ ID NO: 24
 <211> LONGITUD: 142

ES 2 571 338 T3

<212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: *Populus tremula x tremuloides* KR163

<400> SEQ ID NO: 24

5

```

ggtttcctgt gatcttatat tttttattca atgtaaactt cctgggaacc ccacttcoctt 60
tgttgctatg ttcttgtaag aaagttttta agttaaagaa atgataccaa actttttcaaa 120
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 142
    
```

<210> SEQ ID NO: 25
 <211> LONGITUD: 654
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: *Populus tremula x tremuloides* KR221

10

<220> CARACTERÍSTICA:
 <221> NOMBRE/CLAVE: misc_feature
 <222> LOCALIZACIÓN: 489, 534, 561,570
 <223> OTRA INFORMACIÓN: N=A, T, C O G

15

<400> SEQ ID NO: 25

```

ctcagccaga tgtgtcctga gcttgcttgg atgacaacaa gcaactggaa ttattgctgc 60
attaactata ttataagaag cagttactca gtggggattc tgggtgggcat ttgctgtcat 120
ggacactacc agatgagagc ttgctgaacg tcatctaatac aggggtgaga gggggggaaa 180
ctgatttaag cgtgattggt tcagctcgtg gcagctattt attatctatt gaaatcctat 240
    
```

```

gcggggttttg tctgccacca cggcaaagga agtaaaggat tctatgttcg taatacattg 300
agaaggggaga acaaggcagc aggctggcct gggattgaaa gaggacagca aaaagaagat 360
gagatcttta tagatgactg ataaatgtcg atttcctggc aagcatgaag actctcgtgc 420
caggcttctt attgagaatg gaaagtggag tcttgcttct tgttgtactc tgggttcttg 480
gcgaggacnt tttgatttgc acgtgacaga gtcattaggt tgtttgtcca tgnatcattg 540
gggattaccc acagtgtggt ntgagttgtn tagagaaaag tgtcccaggg gatggagact 600
gtgacccctt ggccagttta ttggctattg taccctcgtc tatttttttaa atgt 654
    
```

20

<210> SEQ ID NO: 26
 <211> LONGITUD: 171
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: *Populus tremula x tremuloides* KR224

25

<220> CARACTERÍSTICA:
 <221> NOMBRE/CLAVE: misc_feature
 <222> LOCALIZACIÓN: 32, 43, 51, 62, 85, 118, 154
 <223> OTRA INFORMACIÓN: N=A, T, C O G

30

<400> SEQ ID NO: 26

```

gctagctgta tagttgaaga gaagctgaag angaagagat ggnagagcag naggtgaaga 60
angtagaggc tgtaacgccc gtggntccag ctccagtgga aactaaaagt gatgtggncg 120
atgggaaagt tacggctcca ccacctccag tggntgcaga gaaagagaag g 171
    
```

35

<210> SEQ ID NO: 27
 <211> LONGITUD: 580
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: *Populus tremula x tremuloides* KR235

40

<400> SEQ ID NO: 27

```

gtaaagctcc gtatttttag ctgggtttct cttaaaaaat ggaacttggg ctcggtgggt 60
tgtagagagc agcctggatt gcagggagcg tgcctatact tatagcttca ctgccatgtg 120
cttggctggg ttcttttcat ggacttgttt tggggatgac aaagagagga aagatcatgc 180
aatcatcatc tcatcgtaaa tccactgctc cccaaagatt cttttctcat ttctatgtgg 240
tggctgtggc gtggacaact ctcttgcttc ttggaacatc gatatatgct tatagaatga 300
caccaatagt ctctgagccg tttatctact ctgatctagg cagctactag gcaggacgat 360
ctaacatatt ctcatttcat cgatcacggg agatgagtat agagaataga tacagggttt 420
ggctttctgt gtttctgctt tggctaattg aagttcaggt ctcgaggcgt atatacgaga 480
ctgcatatgt atttaaatac agcgcatctg ctcggatgca catttttgct atcttactgg 540
ctatccttct accagcagcg ctctgacctt tgctgtactg 580

```

5
 <210> SEQ ID NO: 28
 <211> LONGITUD: 511
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: *Populus tremula x tremuloides* KR235

<400> SEQ ID NO: 28

```

ggtaaatatt tctttggggg gttggattca tcagcatcgt tgcccatgcc attccttctgct 60
cactaagggg aacacgtggg gaagggctga tggatatgta attccccctg gttgattggg 120
ttcgagattg tttcatctcc aactatattg ggcagagaat tgttatatat gctggcatgg 180
tttttgctag tggaggggca gacctacca tttggttagt tttttggatt tgtggtgtca 240
aatctgggtg ttgcagctgc agaaacacac agttgccatc gcgtgattaa gatgatggct 300
acagcaaagt cttgacaaga ggtaggaaaa aatttattag agaagcaaat tagtttgggtg 360
aatgtttatg ttatgtccag atgccctttc tgaggcgatt gaattctatc tgattgtgta 420
gttcctgtaa gcttcagaca tctcatcaa ttggatgggtg caattactat aatgaattgt 480
gcattcaaat tgttgctcga aaaaaaaaaa a 511

```

10
 <210> SEQ ID NO: 29
 <211> LONGITUD: 1170
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: *Populus tremula x tremuloides* KR240

15
 <220> CARACTERÍSTICA:
 <221> NOMBRE/CLAVE: misc_feature
 <222> LOCALIZACIÓN: 371,411,449, 468, 501, 511,513, 515, 519, 522, 526, 527, 531,677, 796, 827
 <223> OTRA INFORMACIÓN: N=A, T, C O G

20
 <400> SEQ ID NO: 29

```

aaacgtgatt ctacaaatca aatatagaaa gctgccatgg ctatcaacag tattacttta 60
gctgatattg aaatccctga atcttacttg gaggtcttc caaagaatgg aaaagcgagc 120
ctaggagacc ccatgtatcg atatatctct tcagatcaat tttatccaga atgtctcctt 180
gattgcctag atttgtcttc tgaacatcaa gctatagaac ttgcgaaccg agtggaggcc 240
tcaatctata tatggcgcaa aagaaccaat tataaacctg ccagtagtac aaatcgatcc 300
agttcaaagt cgtcatggga attggtcaag gaactgatga ttgatgcaga caagagggaa 360
tngcttgctg natagagcag aaagcctcct actttgcttg aagcagcgat nccctggtct 420
tccacagaca actttggata tgagcaaan ccagtacaac aggatgtngg gaaatccatt 480
tgggagagct actcgagagt nttagagagc ntngncatnt antatnntgg ncccgaattg 540
acgnctgct ctacgtggat gatttgacaa aacattcggg tcatttctct tcaatctcta 600
aagtcaagt gattgctcac aaaagtgtaa caattccata ctcggtcccc gtctcaaaca 660
ctccatacaa aacagcnttc aacacaccaa gcttttcacc aggtcaacca cgagtaagcc 720
ctgcaaaggg agaccggctc cctttcatga ccagtggcaa aattcctcag cgtggtgtag 780
gtgtaaaaaa ggtgtngaca gagtatctca gtatggatac agaaggnacg ggtggcggc 840
aacatgatcg agggagcaga caatgtgatt cgaaacacct cggcttctca aaccggagtt 900
gaatcctttg ggtctataat agaaacaatc agctcacogg agaacagatt ttctgatatc 960
tgctaaatc atctgctgat ggctccttcg tgcattctct tttttccccg tagaattag 1020
aagatgtttg agttgggtaa agcacatcat gttatttaac cttagatgta acgagatata 1080
tgtaatgata atgagttgag tgcttcatga atcattcatg tagttcaatc cttctaatga 1140
atgtgtgtt tgctcgattaa aaaaaaaaaa 1170

```

25
 <210> SEQ ID NO: 30
 <211> LONGITUD: 1026
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: *Populus tremula x tremuloides* KR242

<220> CARACTERÍSTICA:
 <221> NOMBRE/CLAVE: misc_feature
 <222> LOCALIZACIÓN: 31, 32, 34, 206, 221,242, 248
 <223> OTRA INFORMACIÓN: N=A, T, C O G

5

<400> SEQ ID NO: 30

```

agtccattc ttttccctag ccccaagttt nntnttgagg ggtgataaaa aatgaaccaa 60
gagatgaatg gtgttgacac tgagattgat cagaaccacc aagagaatgt gcaagagaaa 120
atcgattatg tgtttaaggt ggtggtgatc ggtgactctg cagtgggcaa gacgcaaatt 180
ctttccaggt ttaccaagaa tgaatntctg ctttgattca naagtctacc atcgggtgctg 240
anttccanga ctaggactgt catcattaaa gacaaggtca tcaaggctca gatctgggat 300
actgctggcc aagaaaggtg ccgggcagtg acaagcgcac actatagagg ggcactatgg 360
gccatgttag tctacgacat taccaagaga ccaacgttg atcatgtggc taggtgggtg 420
gangagctcc gagcccatgc tgacagctca attgtgatca tgctgatcgg aaacaaggct 480
gatcttgtgg acctcagggc agttccaaca gaagacgcgg tggaaatttc agaggatcaa 540
ggcctctttt tttctgagac atcagccctt agtggtgaca atgtggacgg tgcatttttc 600
aggctgctag aagaaattta cgggtgtgatt tgaagaagt cattggaatg tggcaatgga 660
aaaccccatg ctgctgatgc cataacgctt agaggttcta agattgatgg catatcaggg 720
acggatctgg agattagtga gatgaagaaa ttatctgctt gctcgtggtg atttgatcat 780
ttttcttctg aattgtgtac tataagactt caccactccc atgttcttaa ttgattctgt 840
ggctttcttt ggaaagtggg gatcggctcg gtggtgaggg tggcaagttt tttcttttct 900
gtgacctgtc aagatttttag cagtattgta cttgtcttac agaacccatg aattgtgggt 960
tttttatatg tattgatttg gatggatggt tttccttttc cttcaaaaaa aaaaaaaaaa 1020
aaaaaa 1026
    
```

10

<210> SEQ ID NO: 31
 <211> LONGITUD: 820
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: *Populus tremula x tremuloides* KR292

15

<220> CARACTERÍSTICA:
 <221> NOMBRE/CLAVE: misc_feature
 <222> LOCALIZACIÓN: 123, 148, 237, 254,432,435,437,452,467,492
 <223> OTRA INFORMACIÓN: N=A, T, C O G

20

<400> SEQ ID NO: 31

```

atatgaacgc ttctctatgg gtttgtcatg tggagaggat gattttgaaa agaatggaag 60
tcatgaagtt ccgттаатag ttgatagcag agggactaga gtcagcgggtg gctatatgga 120
ttnacaacat cttcatcatg cagttgantа cgaggctcgaа ttctggccag ttgaacaccc 180
aatggaacca caggatgaag atcgtcctgt caaatgtcca atgccaacct cttctgntat 240
caagaatgga aggnccgatg aggagagatt agagaagaga gcggacgact ccaactacct 300
gcggtaatga acaaaacaagg cattgttgtg gtggctgcag agccccaagt ccgagcagtg 360
cgtaaaaggc accatacact taccgcccag gaccaccgtg taatagcacc tgatctaaca 420
aggatggctt cnacntntcc tgctctgcca anctcagaac gtcaccnatt tttcaaatgc 480
ttcaagaact cngacaagtt cgatcagtat taaaaaggta taaagaataa attaggaaac 540
ccacatttcc gctccatcta gctttaatag ctacttttca atccattgcg gagcgggtcaa 600
tgaattcttc atgatttgta tttcgggcca atagggaaag aaatatacata gatatgcggt 660
ataagaagca ctcttattgt actagatttt tattttttat atattctgta gaatgtgtct 720
tccagcctaa ttgtaggttt cttttatcat ttctttgttc agatttggat ggataattag 780
catgacactc tgcaatacca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 820
    
```

25

<210> SEQ ID NO: 32
 <211> LONGITUD: 303
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: *Populus tremula x tremuloides* KR313

30

<220> CARACTERÍSTICA:
 <221> NOMBRE/CLAVE: misc_feature
 <222> LOCALIZACIÓN: 196.298
 <223> OTRA INFORMACIÓN: N=A, T, C O G

<400> SEQ ID NO: 32

```

gaaaaattct cctggaccag ctaagagaga gcttagacaa gctactagac aggcacttca 60
attgcttcaa gacaactatc cagaatttgt ggccaaacag atcttcatca atgttccctg 120
gtggtagcta acagtaaata gaatgataag tccattttta acccagagga ccagaagtaa 180
gtttgtcttt gttggncctt ccaaactctgc cgaaacctt atcaggtaca tagccgctga 240
gcaaatacca gtgaagtacg gaggcctaag caaagatggt gaatttggct cagctgancg 300
tgt 303
    
```

5 <210> SEQ ID NO: 33
 <211> LONGITUD: 616
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: *Populus tremula x tremuloides* KR313

10 <220> CARACTERÍSTICA:
 <221> NOMBRE/CLAVE: misc_feature
 <222> LOCALIZACIÓN: 93
 <223> OTRA INFORMACIÓN: N=A, T, C O G

15 <400> SEQ ID NO: 33

```

gttgcgggga tgggatgtaa gctatggtgc agaatttcta ccaagggctg aagatagcta 60
cacagtgatc atccaaaagg ctagaaagggt tgntgcaact gaacaaccag tggtttgcaa 120
cagtttcaaa attggtgaac ctggtaaagt tgttctcacc attgacaata ccacatccaa 180
gaagaagaag aagctcctct atcgcttgaa aaccaagccc gcttcttctg attaattaag 240
ggactatata tagtgaaaca ataatagaag attttgctta cattcttgct gctgctgctg 300
ctgccaattt tatcaacatg atcatatcac agcttgaagg tgttctgagg gtctcgatca 360
tggagaagat aaagaaatct tgaagatggt tatttatatg tttatttata attgaatttt 420
gttttgggtg ggaatggatt aaggatggtt tgcaattgaa ggctagaagc atgtgtgggg 480
ataggggaaga agctccatta ctagtgcca gagtttctt tgtaaatcog ttatggcttt 540
ctttctcttt ccctgtaagt atcttttggga catattatga tattaatgaa gacagtatct 600
ttcataaaaa aaaaaa 616
    
```

20 <210> SEQ ID NO: 34
 <211> LONGITUD: 340
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: *Populus tremula x tremuloides* KR318

25 <220> CARACTERÍSTICA:
 <221> NOMBRE/CLAVE: misc_feature
 <222> LOCALIZACIÓN: 59.315
 <223> OTRA INFORMACIÓN: N=A, T, C O G

<400> SEQ ID NO: 34

```

acacaggttc agtccatgca atccacacag aacatcaact gctccagcat catccgtcna 60
cgatatcctc cgtcgagaca aacttcgagt ggactcaatt attcaggccc ggcgttcagt 120
gaacttgacc agcagtggtg agcacatgaa gagtgtgct ccgttctatg gtctatccaa 180
aatcactgca agtgactata ttgtaaactg tggaaatcgg acgccaaga aggaaatgcc 240
acttatattc gacacaggca gtggtctcat ttggactcaa tgcaagccat gcaaggcttg 300
ctatccaaaa gtccttgtgt tcgatccaac caagtcagct 340
    
```

35 <210> SEQ ID NO: 35
 <211> LONGITUD: 489
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: *Populus tremula x tremuloides* KR318

<400> SEQ ID NO: 35

```

tgcacagct ttaagattg atagcgccat cgactccggt gcagtgtca ctcggctgcc 60
tccgaaggca tactcgacac tgaggtcggg gttccgagaa atgttgaaag gttatccttt 120
gtcggcccaa gatctagaca catgctatga cttcagtaat tatagcacgg ttgcaatacc 180
ttcgattagt gtgttcttcg aagggtggcg cgagatggat atcgatgttt cggggatcat 240
gttgcaatat ccagaagaga gcaaggtgta ctgcttggca tttgcagaat tggattacga 300
atcttctatc tttgggaatt ttcagcaaaa gacttacact atagtctttg atgggtgcgaa 360
ggaaaggatt gggtttgccc ccggtggctg tgactaaaat ggggaaaata aaataaaatt 420
ggagcactag ctctaaatta taatatatca ataaaagtgg tttgatttta taaaaaaaaa 480
aaaaaaaaa
    
```

5 <210> SEQ ID NO: 36
 <211> LONGITUD: 453
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: *Populus tremula x tremuloides* KR459

<400> SEQ ID NO: 36

```

caaccgtatc agatgcacct cccatccatt acatggttaa aatagagtca ttttcgtcac 60
ttgggaaaaa tgcagtggag acatatgaat caggggtttt tgaagctgga ggctatagat 120
ggaaattagt tctctatccg aacggaaaca agagcaataa tgtaaaagat tccatctctc 180
tctatttagc aatggttgac gcaagttctc ttccacgtgg ttgggaggtc aacgtgattt 240
ttcggttgtt tttgcttgac caaaacaagg acagctactt ggtaattcaa gcaggaaagg 300
aaagacgctt tcacggattg aatcttcaaa gtggttttga tcaattcatt aagctttcaa 360
catttaatga tgctcgttat ggattccttc tgggaagacac ttgtgtgctt ggagctgaag 420
tatttgtctg tggagaaaga agcagaggca aag
    
```

10 <210> SEQ ID NO: 37
 <211> LONGITUD: 586
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: *Populus tremula x tremuloides* KR463

<400> SEQ ID NO: 37

```

cgaagttaga acacattatc actagtttag gccacagagt tgcagagatg ccagttcctg 60
tcgaacaagc acgagtaaaag ccttcagatg atcatttctg gcttgagaaa cctgccattg 120
ttcttgactt gattcagttc attctgtttc agaattcatt tgagattgct ttcttcttct 180
ggatttgagg cacatacggg ttccgctcat gcatcatgga aaaagtgggc tacattgtgc 240
caaggcttat tatgggttta gctgttcaag ttctatgcag ttacagcacc ttgcctttgt 300
acgctctagt ctcacagatg ggcaccaggt tcaggaaagg gatgtttggt gaggatacgg 360
aagcggcact agaaaactgg gcaggcagag taaagggcaa gagggacaca agcgagaacc 420
acggagcaca tatggataga ctagccacag aatcatctca tagtgcgga caagaaatgg 480
ttattattgg aggcacagag ctttcttccg tgaccaagc gcctgtatct tgaatttgg 540
ttcttcggca aaaaggcaaa agggaacatc cacttacatc tcctca
    
```

20 <210> SEQ ID NO: 38
 <211> LONGITUD: 529
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: *Populus tremula x tremuloides* KR465

<400> SEQ ID NO: 38

```

ctacacactg aaggttgatg aaaagagtga cgtgtacagc tttggtgtag ttctcttggg 60
actcgttact ggtagaaaac cggttggaga attcgggtgat ggtgtggata tagttcaatg 120

ggttcgaaaa atgacagact caatcaagga aggagttttg aaagtcttgg acccaagact 180
cccacagttt ccgcttcatg aggtgatgca tgtgttctat gttgcaatgc tttgtgtgga 240
agaacgggct gtcgaacgcc caacaatgag agaagttggt cagattctaa cagagcttcc 300
caagtcacca agctcaaac aaggagactc agtaatcaca gagccctcgc cacattcagc 360
gcccaccgca gcgctcgact ctcccagttc aacagctaaa gacgtcccaa aagaccatca 420
cgagccacca cctgctgatc ttcttagcat ttgaagccat tctgaatgga ggggtgctgt 480
ttgttctcta aaattccagg aattgtgtta gtttctgtcc gtctttgtg 529
    
```

ES 2 571 338 T3

5 <210> SEQ ID NO: 39
 <211> LONGITUD: 42
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia Artificial
 <220> CARACTERÍSTICA:

10 <223> OTRA INFORMACIÓN: Cebador de PCR - attB1-T12VN
 <221> NOMBRE/CLAVE: misc_feature
 <222> LOCALIZACIÓN: 42
 <223> OTRA INFORMACIÓN: N=A, T, C O G

15 <400> SEQ ID NO: 39
 gggacaagtt tgtacaaaaa agcaggcttt tttttttt vn 42

20 <210> SEQ ID NO: 40
 <211> LONGITUD: 33
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia Artificial

25 <220> CARACTERÍSTICA:
 <223> OTRA INFORMACIÓN: Cebador de PCR - KR459FwAttB2

30 <400> SEQ ID NO: 40
 agaaagctgg gtcaaccgta tcagatgcac ctc 33

35 <210> SEQ ID NO: 41
 <211> LONGITUD: 34
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia Artificial

40 <220> CARACTERÍSTICA:
 <223> OTRA INFORMACIÓN: Cebador de PCR - KR463FwAttB2

45 <400> SEQ ID NO: 41
 agaaagctgg gtcgaagtta gaacacatta tcac 34

50 <210> SEQ ID NO: 42
 <211> LONGITUD: 32
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia Artificial

55 <220> CARACTERÍSTICA:
 <223> OTRA INFORMACIÓN: Cebador de PCR - KR465FwAttB2

60 <400> SEQ ID NO: 42
 agaaagctgg gtctacacac tgaaggttga tg 32

65 <210> SEQ ID NO: 43
 <211> LONGITUD: 54
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia Artificial

70 <220> CARACTERÍSTICA:
 <223> OTRA INFORMACIÓN: Cebador de PCR - attB2-T7

75 <400> SEQ ID NO: 43
 ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtg taatagcact cactataggg cgaa 54

80 <210> SEQ ID NO: 44
 <211> LONGITUD: 34
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia Artificial

85 <220> CARACTERÍSTICA:
 <223> OTRA INFORMACIÓN: Cebador de PCR - KR459ReAttB1

<400> SEQ ID NO: 44
 aaaaagcagg ctctttgcct ctgctcttt ctcc 34

5 <210> SEQ ID NO: 45
 <211> LONGITUD: 32
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia Artificial

10 <220> CARACTERÍSTICA:
 <223> OTRA INFORMACIÓN: Cebador de PCR - KR463ReAttB1

<400> SEQ ID NO: 45
 aaaaagcagg ctggaggaga tgtaagtgga tg 32

15 <210> SEQ ID NO: 46
 <211> LONGITUD: 31
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia Artificial

20 <220> CARACTERÍSTICA:
 <223> OTRA INFORMACIÓN: Cebador de PCR - KR465ReAttB1

<400> SEQ ID NO: 46
 aaaaagcagg ctcaaaaga cggacagaaa c 31

25 <210> SEQ ID NO: 47
 <211> LONGITUD: 13599
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia Artificial

30 <220> CARACTERÍSTICA:
 <223> OTRA INFORMACIÓN: Vector pK7GWIWG2(I)

35 <400> SEQ ID NO: 47

```

ctagagggcc cgacgtcgca tgcctgcagg tcaactggatt ttggtttttag gaattagaaa 60
ttttattgat agaagtattt tacaataca aatacatact aagggtttct tatatgctca 120
acacatgagc gaaaccctat aagaacccta attcccttat ctgggaacta ctcacacatt 180
attctggaga aaaatagaga gagatagatt tgtagagaga gactggtgat ttttgcggac 240
tctagcatgg ccgcgggata tcacaagttt gtacaaaaaa gctgaacgag aaacgtaaaa 300
tgatataaat atcaatatat taaattagat tttgcataaa aaacagacta cataaactg 360
taaaacacaa catatccagt cactatggcg gccgcattag gcaccccagg ctttacactt 420
tatgcttccg gctcgtataa tgtgtggatt ttgagttagg atccggcgag attttcagga 480
gctaaggaag ctaaaatgga gaaaaaatc actggatata ccaccgttga tatatcccaa 540
tggcatcgta aagaacattt tgaggcattt cagtcagttg ctcaatgtac ctataaccag 600
accgttcagc tggatattac ggccttttta aagaccgtaa agaaaaataa gcacaagttt 660
tatccggcct ttattcacat tcttgcccgc ctgatgaatg ctcatccgga attccgtatg 720
gcaatgaaag acggtgagct ggtgatatgg gatagtggtc acccttggtt caccgttttc 780
catgagcaaa ctgaaacggt ttcacgcctc tggagtgaat accacgaoga tttccggcag 840
tttctacaca tatattcgca agatgtggcg tgttacggtg aaaacctggc ctatttccct 900
aaagggttta ttgagaatat gtttttcgtc tcagccaatc cctgggtgag tttcaccagt 960
tttgatttaa acgtggccaa tatggacaac ttcttcgccc ccgttttcac catgggcaaa 1020
tattatacgc aaggcgacaa ggtgctgatg ccgctggcga ttcaggttca tcatgccgtc 1080
tgtgatggct tccatgtcgg cagaatgctt aatgaattac aacagtactg cgatgagtgg 1140
cagggcgggg cgtaaacgcg tggatccggc ttactaaaag ccagataaca gtatgcgtat 1200
ttgcgcgctg atttttgcgg tataagaata tatactgata tgtatacccg aagtatgtca 1260
  
```

aaaagaggtg tgctatgaag cagcgtatta cagtgcacgt tgacagcgac agctatcagt 1320
 tgctcaaggg atatatgat tcaatatctc cggctcggta agcacaacca tgcagaatga 1380
 agcccgctcgt ctgocgtgccg aacgctggaa agcggaaaaat caggaaggga tggctgaggt 1440
 cgcccggttt attgaaatga acggctcttt tgctgacgag aacagggact ggtgaaatgc 1500
 agttaaggt ttacacctat aaaagagaga gccgttatcg tctgtttgtg gatgtacaga 1560
 gtgatattat tgacacgccc gggcgacgga tgggtgatccc cctggccaagt gcacgtctgc 1620
 tgtcagataa agtctcccgt gaactttacc cgggtggtgca tatcggggat gaaagctggc 1680
 gcatgatgac caccgatatg gccagtgctc cggctcccgt tatcggggaa gaagtggctg 1740
 atctcagcca ccgcgaaaaat gacatcaaaa acgccattaa cctgatgttc tggggaatat 1800
 aatgtcagg ctcccttata cacagccagt ctgcaggtcg accatagtga ctggatagt 1860
 tgtgttttac agtattatgt agtctgtttt ttatgcaaaa tctaatttaa tatattgata 1920
 tttatatcat tttacgtttc tcggtcagct ttcttgtaca aagtgggtgat atcactagt 1980
 cggccgcctg caggtcgacc atatggtcga cctgcaggcg gccgcactag tgatgctgtt 2040
 atgttcagt tcaagctgac ctgcaaacac gttaaatgct aagaagtag aatatatgag 2100
 acacgttaac tggatatatga ataagctgta aataaccgag tataaactca ttaactaata 2160
 tcacctctag agtataatat aatcaaattc gacaatttga ctttcaagag taggctaata 2220
 taaaaacttt atatatctt acaatgttca aagaaacagt tgcactctaa cccctatggc 2280
 catcaaattc aatgaacgct aagcttaata tgactctcaa taaagtctca taccaacaag 2340
 tggccactta ttcaaccatc aagaaaaaag ccaaaattta tgctactcta aggaaaactt 2400
 cactaaagaa gacgatttag agtgttttac caagaatttc tgtcatctta ctaaacaact 2460
 aaagatcggg gtgatacaaa acctaactctc attaaagttt atgctaaaat aagcataatt 2520
 ttaccacta agcgtgacca gataaacata actcagcaca ccagagcata tatattggtg 2580
 gctcaaatca tagaaactta cagtgaagac acagaaagcc gtaagaagag gcaagagtat 2640
 gaaaccttac ctcatcattt ccatgaggtt gcttctgat cgcgggata tcaccacttt 2700
 gtacaagaaa gctgaacgag aaacgtaaaa tgatataaat atcaatatat taaattagat 2760
 tttgcataaa aacagacta cataactctg taaaacacaa catatccagt cactatggtc 2820
 gacctgoga ctggctgtgt ataagggagc ctgacattta tattcccag aacatcaggt 2880
 taatggcgtt tttgatgtca ttttcgcggt ggctgagatc agccacttct tccccgataa 2940
 cggagaccgg cacactggcc atatcgggtg tcatcatgog ccagcttca tccccgatg 3000
 gcaccaccgg gtaaaagtca cgggagactt tatctgacag cagacgtgca cccccaggg 3060
 ggatcaccat cgtcgcccg ggcgtgtcaa taatcact ctgtacatcc acaaacagac 3120
 gataacggct ctctctttta taggtgtaaa ccttaaactg catttcacca gtcctgttc 3180
 tcgtcagcaa aagagccgtt catttcaata aaccgggcga cctcagccat ccttccctga 3240
 tttccgctt tccagcgttc ggcacgcaga cgcagggctt cattctgcat ggttgtgctt 3300
 accagaccgg agatattgac atcatatatg ccttgagcaa ctgatagctg tcgctgtcaa 3360
 ctgtcactgt aatcagctgc ttcatagcac acctctttt gacatacttc ggttatacat 3420
 atcagtatat attcttatac cgcaaaaatc agcgcgcaaa tacgcatact gttatctggc 3480
 ttttagtaag ccggtccac gcgtttacgc cccgccctgc cactcatcgc agtactgtt 3540
 taattcatta agcattctgc cgacatggaa gccatcacag acggcatgat gaacctgaat 3600
 cgcagcggc atcagcacct tgtcgcctg cgtataatat ttgccatgg tgaaacggg 3660
 ggcgaagaag ttgtccatat tggccacgtt taaatcaaaa ctggtgaaac tcaccacggg 3720
 attggtgag acgaaaaaca tattctcaat aaaccctta gggaaatagg ccaggttttc 3780
 accgtaacac gccacatctt gcgaatatat gtgtagaaac tgccggaat cgtcgtggt 3840
 ttcactccag agcgtgaaa acgttcagt ttgctcatgg aaaacgggtg aacaagggtg 3900
 aacactatcc catatcacca gctcacctgc tttcattgcc atacggaatt ccggatgagc 3960
 attcatcagg cgggaagaa tgtgaataaa ggcgggataa aacttgtgct tattttctt 4020
 tacggtcttt aaaaaggcgg taatatccag ctgaacggtc tggttatagg tacattgagc 4080
 aactgactga aatgctcaa aatgttcttt acgatgccat tgggatatat caacggtggt 4140
 ataccagtg attttttct ccattttagc ttccttagct cctgaaaatc tcgccggatc 4200
 ctaactcaaa atccacacat tatacgagcc ggaagcataa agtgtaaagc ctggggtgcc 4260
 taatgcggcc gccatagtga ctggatatgt tgtgttttac agtattatgt agtctgttt 4320
 ttatgcaaaa tctaatttaa tatattgata tttatatcat tttacgtttc tcggtcagct 4380
 tttttgtaca aacttgtgat atcactagtg cggccgcctg caggtcgact agaatagtaa 4440
 attgtaaatgt tgtttgtgt ttgtttgtt gtggtaatg ttgtaaaaat acggatcgtc 4500
 ctgacgtcct ctccaaatga aatgaacttc cttatataga ggaagggtct tgccaaggat 4560
 agtgggattg tgcgtcatcc cttacgtcag tggagatatc acatcaatcc acttgcctt 4620
 aagacgtggt tgaacgtct tcttttcca cgtggtcct cgtgggtggg ggtccatctt 4680
 tgggaccact tgcggcagag gcaccttgaa cgatagcctt tcctttatcg caatgatggc 4740
 atttgtaggt gccaccttcc tttctactg tctttttgat gaagtgcag atagctgggc 4800
 aatggaatcc gaggaggtt cccgatatta cctttgttg aaaagtctca atagccctt 4860
 ggtcttctga gactgtatct ttgatattct tggagttagc gagagtgtcg tgctccacca 4920
 tgttgacgaa gattttcttc ttgtcattga ctcgtaaaag actctgtatg aactgtctgc 4980
 cagtcttcaac ggcgagttct gttagatcct cgtactgaat ttttgactcc atggcctttg 5040
 attcagtagg aactactttc ttagagactc caatctctat tacttgctt ggtttatgaa 5100
 gcaagccttg aatcgtccat actggaatag tacttctgat cttgagaaat atatctttct 5160

ctgtgttctt	gatgcagtta	gtcctgaatc	ttttgactgc	atctttaacc	ttcttgggaa	5220
ggattttgat	ctcctggaga	ttattactcg	ggtagatcgt	cttgatgaga	cctgcccgct	5280
aggcctctct	aaccatctgt	gggtcagcat	tctttctgaa	attgaagagg	ctaactttct	5340
cattatcggg	ggggaacatg	gtatcgtcac	cttctccgtc	gaactttctt	cctagatcgt	5400
agagatagag	aaagtcgctc	atggtgatct	ccggggcaaa	ggagatcagc	ttggctctag	5460
tgcaccat	gggagagctc	aagcttagct	tgagcttggg	tcagattgtc	gtttcccgcc	5520
ttcagtttaa	actatcagtg	tttgacagga	tatattggcg	ggtaaacct	agagaaaaga	5580
gcgtttatta	gaataacgga	tatttaaaag	ggcgtgaaaa	ggtttatccg	ttcgtccatt	5640
tgtatgtgca	tgccaaccac	agggttcccc	tcgggatcaa	agtactttga	tccaaccct	5700
ccgctgctat	agtgcagtcg	gcttctgacg	ttcagtgacg	ccgtcttctg	aaaacgacat	5760
gtcgcaaacg	tcctaagtta	cgcgacaggc	tgccgcctcg	cccttttct	ggcgttttct	5820
tgtcgcgctg	tttagtcgca	taaagtagaa	tacttgcgac	tagaaccgga	gacattacgc	5880
catgaacaag	agcgcgcg	ctggcctgct	gggctatgcc	cgctcagca	ccgacgacca	5940
ggacttgacc	aaccaacggg	ccgaactgca	cgcgcccgcc	tgaccaagc	tgttttccga	6000
gaagatcacc	ggcaccaggc	cgacccgccc	ggagctggcc	aggatgcttg	accacatcag	6060
ccctggcgac	gttgtgacag	tgaccaggct	agaccgctg	gcccgcagca	cccgcgacct	6120
actggacatt	gcccagcgca	tccaggaggc	cgggcggggc	ctgcttagcc	tggcagagcc	6180
gtgggcccgc	accaccacgc	cgcccgcccg	catggtgttg	accgtgttcg	ccggcattgc	6240
cgagttcgag	cgttccctaa	tcctcgaccg	caccgggagc	gggocgaggg	ccgccaaggc	6300
ccgagggctg	aagtttgccc	cccgccctac	cctcaccocg	gcacagatcg	cgcacgcccg	6360
cgagctgatc	gaccaggaag	gcccaccctg	gaaagaggcg	gctgcaactg	ttggcgtgca	6420
tcgctcgacc	ctgtaccgcg	cacttgagcg	cagcgaggaa	gtgacgcca	ccgagggccag	6480
gcgccgcccg	gccttccctg	aggacgcatt	gaccgaggcc	gacgccctgg	cgcccgccga	6540
gaatgaaccg	caagaggaac	aagcatgaaa	ctcgcaccagg	acggccagga	cgaaccggtt	6600
ttcattaccg	aagagatcga	ggcggagatg	atcgcggccc	ggtagctgtt	cgagccgccc	6660
gcgcacgtct	caaccgtgcg	gctgcatgaa	atcctggccc	gtttgtctga	tgccaagctg	6720
gcccgcctgg	cggccagctt	ggccgctgaa	gaaaccgagc	gcccgcctct	aaaaaggtga	6780
tgtgtatatt	agtaaaacag	cttgcgctcat	gcccgtcgctg	cgtatatgat	gcgatgagta	6840
aataaacaaa	tacgcaaggg	gaacgcatga	aggttatcgc	tgtacttaac	cagaaaggcg	6900
ggtcaggcaa	gacgaccatc	gcaaccctac	tagcccgcgc	cctgcaactc	gcccggggccg	6960
atgttctggt	agtcgattcc	gactcccagg	gcagtgcccg	cgattgggcg	gcccgtgcccg	7020
aagatcaacc	gctaaccggt	gtcggcatcg	accgcccagc	gattgaccgc	gacgtgaagg	7080
ccatcgcccg	gcccgaactc	gtagtgatcg	aeggagccgc	ccaggccggcg	gacttggctg	7140
tgtccgcat	caaggcagcc	gacttctgct	tgattccgggt	gcagccaagc	ccttacgaca	7200
tatgggcccac	cgccgacctg	gtggagctgg	ttaagcagcg	cattgaggtc	acggatggaa	7260
ggctacaagc	ggcctttgtc	gtgtcgccgg	cgatacaagg	cacgcgcatc	ggcgggtgag	7320
ttgcccaggc	gctggccggg	taogagctgc	ccattcttga	gtcccgtatc	acgcagcccg	7380
tgagctacc	aggcactgcc	gcccgcggca	caaccgttct	tgaatcagaa	cccgagggcg	7440
acgctgcccg	cgaggtccag	gcccgtggcg	ctgaaattaa	atcaaaactc	atttgagtta	7500
atgaggtaaa	gagaaaaatg	gcaaaagcac	aaacacgcta	agtgccggcc	gtcccagcgc	7560
acgcagcagc	aaggctgcaa	cgttggccag	ccctggcagc	acgccagcca	tgaagccggg	7620
caactttcag	ttgcccggcg	aggatcacac	caagctgaag	atgtacgccc	tacgccaagg	7680
caagaccatt	accgagctgc	tatctgaata	catcgcgacg	ctaccagagt	aatgagcaa	7740
atgaataaat	gagtagatga	attttagccg	ctaaaggagg	cggcattgaa	aatcaagaac	7800
aaccaggcac	cgacgcctg	gaatgcccc	tgtgtggagg	aacgggcccgt	tggccaggcg	7860
taagcggctg	ggttgtctgc	cgccctgca	atggcactgg	aacccccaa	cccgaggaat	7920
cgccgtgacg	gtcgcaaac	atccggccc	gtacaaatcg	gcccggccgt	gggtgatgac	7980
ctggtggaga	agttgaaggc	cgccgagggc	gcccagccgg	aacgcacgca	ggcagaagca	8040
cgccccgctg	aatcgtggca	agccggccgt	gatcgaatcc	gcaaagaatc	cccggcaaccg	8100
ccggcagccc	gtgcccctg	gattaggaag	ccgcccaagg	gccaagagca	accagatttt	8160
ttcgttccga	tgctctatga	cgtgggcacc	cgcatagtc	gcagcatcat	ggcgtggcc	8220
gttttccctc	tgtcgaagcg	tgaccgacga	ctggcgagg	tgatccgcta	cgagcttoca	8280
gacgggacag	tagaggtttc	cgcagggccc	gcccgcctgg	ccagtgtgtg	ggattacgac	8340
ctggtactga	tggcgggttc	ccatctaacc	gaatccatga	accgataccg	ggaagggag	8400
ggagacaagc	ccggcccgct	gttccgtcca	cacgttgccg	acgtactcaa	gttctgcccg	8460
cgagccgatg	gcccgaagca	gaaagacgac	ctggtagaaa	cctgcattcg	gttaaacacc	8520
acgcacgctg	ccatgcagcg	tacgaagaag	gccaagaacg	gcccctggtg	gcccgtatcc	8580
gaggggtgaag	ccttgattag	ccgctacaag	atcgtaaaga	gcgaaaccgg	gcccggcggag	8640
tacatcgaga	tcgagctagc	tgattggatg	taccgcgaga	tcacagaagg	caagaaccgc	8700
gacgtgctga	cggttcacc	cgattacttt	ttgatcgatc	ccggcatcgg	ccgttttctc	8760
taccgctcg	cacgcgcg	cgcagggcaag	gcagaagcca	gatggttgtt	caagacgatc	8820
taccgacgca	gtggcagcgc	cgagaggttc	aagaagttct	gtttcaccgt	gcccagctcg	8880
atcgggtcaa	atgacctgcc	ggagtacgat	ttgaaggagg	aggggggca	ggggggccc	8940
atcctagtca	tgcgctaccg	caacctgatc	gagggcgaag	catccgcccg	ttcctaattgt	9000
acggagcaga	tgctaggcca	aattgcctta	gcaggggaaa	aaggtcgaaa	aggtctcttt	9060

cctgtggata	gcacgtacat	tgggaacce	aagccgtaca	ttgggaaccg	gaaccogtac	9120
attgggaacc	caaagccgta	cattgggaa	cggtcacaca	tgtaaagtac	tgatataaaa	9180
gagaaaaaag	gcgatttttc	cgctaaaa	tctttaaacc	ttattaaacc	tctttaaacc	9240
cgctggcct	gtgcataact	gtctggccag	cgcacagccg	aagagctgca	aaaagccgct	9300
acccttcggt	cgctgcgctc	cctacgcccc	gccgcttcgc	gtcggcctat	cgcgccgct	9360
ggccgctcaa	aaatggctgg	cctacggcca	ggcaatctac	cagggcgccg	acaagccgcg	9420
ccgtcgccac	tcgaccgccc	gcgcccacat	caaggcacc	tgccctcgcc	gtttcggtga	9480
tgacgggtga	aacctctgac	acatgcagct	cccggagacc	gtcacagctt	gtctgtaagc	9540
ggatgcccgg	agcagacaag	cccgtcaggg	cgctcagccg	gggtgtggcg	gggtgcccgg	9600
cgagccatg	accagtcac	gtagcgatag	cggagtgtat	actggcttaa	ctatgcggca	9660
tcagagcaga	ttgtactgag	agtgcaccat	atgcggtgtg	aaataccgca	cagatgcgta	9720
aggagaaaat	accgcatcag	gcgctcttcc	gcttctctgc	tcactgactc	gctgcgctcg	9780
gtcgttcggc	tgcgccgagc	ggtatcagct	cactcaaagg	cggtaatacg	gttatccaca	9840
gaatcagggg	ataacgcagg	aaagaacatg	tgagcaaaa	gccagcaaaa	ggccaggaac	9900
gtaaaaaag	ccgctgtgct	ggcgtttttc	cataggctcc	gccccctga	cgagcatcac	9960
aaaaatcgac	gctcaagtca	gaggtggcga	aaccggacag	gactataaag	ataccaggcg	10020
tttccccctg	gaagctccct	cgtgcgctct	cctgttccga	ccctgccgct	taccggatac	10080
ctgtccgct	ttctcccttc	gggaagcgtg	gcgctttctc	atagctcacg	ctgtaggtat	10140
ctcagttcgg	tgtaggtcgt	tcgctccaag	ctgggctgtg	tgacgaaacc	ccccgttcag	10200
cccgaccgct	gcgcttatac	cggtaaactat	cgtcttgagt	ccaacccggt	aagaccgca	10260
ttatcgccac	tgccagcagc	cactggtaac	aggattagca	gagcgaggtg	gttagcgggt	10320
gctacagagt	tcttgaagtg	gtggcctaac	tacggctaca	ctagaaggac	agtatttggt	10380
atctgcgctc	tgctgaagcc	agttaccttc	ggaaaaagag	ttggtagctc	ttgatccggc	10440
aaacaaacca	ccgctggtag	cggtggtttt	tttgtttgca	agcagcagat	tacgcgcaga	10500
aaaaaaggt	ctcaagaaga	tcctttgatc	tttctacgg	ggtctgacgc	tcagtggaac	10560
gaaaactcac	gtaagggat	tttggtcatg	catgatatac	ctcccaattt	gtgtagggtc	10620
tattatgcac	gcttaaaaat	aataaaagca	gacttgacct	gatagtttgg	ctgtgagcaa	10680
ttatgtgctt	agtgcactca	atcgcttgag	ttaacgcccg	cgaagcggcg	tcggcttga	10740
cgaaatttcta	gctagacatt	atttgccgac	tacctgggtg	atctcgcttc	tcacgtagtg	10800
gacaaattct	tccaactgat	ctgcgcgcga	ggccaagcga	tcttcttctt	gtccaagata	10860
agcctgtcta	gcttcaagta	tgacgggctg	atactgggcc	ggcagggcgt	ccattgccc	10920
gctggcagcg	acatccttcg	gcgcgatttt	ccgggtact	gcgctgtacc	aaatcgggga	10980
caacgtaagc	actacatttc	gctcatcgcc	agcccagtcg	ggcggcgagt	tccatagcgt	11040
taaggtttca	tttagcgctc	caaatagata	ctgctcagga	accggatcaa	agagttcttc	11100
cgccgctgga	cctaccaagg	caacgctatg	ttctcttget	tttgtcagca	agatagccag	11160
atcaatgtcg	atcgtggctg	gctcgaagat	acctgcaaga	atgtcattgc	gctgccattc	11220
tcocaaatgc	agttcgcgct	tagctggata	acgccacgga	atgatgtcgt	cgtgcacaa	11280
aatggatcg	tctacagcgc	ggagaatctc	gcctctcca	ggggaagccg	aagtttccaa	11340
aaggtcgctg	atcaaagctc	gccgcttgt	ttcatcaagc	cttacggtca	ccgtaaccag	11400
caaatcaata	tcactgtgtg	gcttcaggcc	gccatccact	gcccagccgt	acaaatgtac	11460
ggccagcaac	gtcggttcga	gatggcgctc	gatgacgcca	actacctctg	atagttgagt	11520
cgatacttcg	gcgatcaccg	cttcccccat	gatgtttaac	tttgttttag	ggcgactgcc	11580
ctgtctgctg	acatcgttgc	tgctccataa	catcaaacat	cgaccacg	cgtaaccg	11640
ttgctgcttg	gatgcccag	gcatagactg	taccocaaaa	aaacatgtca	taacaagaag	11700
ccatgaaaac	cgccactgcg	ccgttaccac	cgctcgcttc	ggtcaaggtt	ctggaccagt	11760
tgcggtgacg	cagttacgct	acttgcatta	cagcttacga	accgaacgag	gcttatgtcc	11820
actgggttcg	tgcccgaatt	gatcacaggc	agcaacgctc	tgctcatcgt	acaatcaaca	11880
tgctaccctc	cgcgagatca	tccgtgtttc	aaaccggca	gcttagttgc	cgttcttccg	11940
aatggatcg	gtaacatgag	caaagtctgc	cgcttacia	cggctctccc	gctgacgccc	12000
tcccggactg	atgggctgcc	tgtatcgagt	gggtgattttg	tgccgagctg	ccggtcggg	12060
agctgttggc	tggtgggtgg	caggatatac	tgtggtgtaa	acaaattgac	gcttagacaa	12120
cttaataaca	cattgcggac	gtttttaatg	tactgaatta	acgccgaatt	gaattatcag	12180
cttgcatgcc	ggtcgatcta	gtaacataga	tgacaccg	cgcgataatt	tatcctagtt	12240
tgccgctat	attttgtttt	ctatcgcgta	ttaaatgtat	aattgcggga	ctctaactat	12300
aaaaaccat	ctcataaata	acgtcatgca	ttacatgta	attattacat	gcttaacgta	12360
attcaacaga	aattatatga	taatcatcgc	aagaccggca	acaggattca	atcttaagaa	12420
actttattgc	caaagtgttg	aacgatctgc	ttgactctag	ctagagctccg	aaccccagag	12480
tcccgctcag	aagaactcgt	caagaaggcg	atagaaggcg	atgcccgtcg	aatcgggagc	12540
ggcgataccg	taaagcacga	ggaagcggtc	agcccatcgc	ccgccagct	cttcagcaat	12600
atcacgggta	gccaacgcta	tgtcctgata	cggtccgccc	acaccagcc	ggccacagtc	12660
gatgaatcca	gaaaagcggc	cattttccac	catgatattc	ggcaagcagg	ctcgcctgtg	12720
ggtcacgacg	agatcctcgc	cgtcgggcat	ccgcgcttg	agcctggcga	acagttcggc	12780
tgccgagcag	ccctgatgct	cttcgtccag	atcactctga	tcgacaagac	cggttccat	12840
ccgagtacgt	gctcgtcga	tgcgatgttt	cgcttggtgg	tcgaatgggc	aggtagccgg	12900
atcaagcgta	tgacgccc	gcattgcac	agccatgatg	gatactttct	cggcaggagc	12960

ES 2 571 338 T3

```

aaggtagagat gacaggagat cctgccccgg cacttcgccc aatagcagcc agtcccttcc 13020
cgcttcagtg acaacgtcga gcacagctgc gcaaggaacg cccgtcgtgg ccagccacga 13080
tagccgcgct gcctcgtctt ggagttcatt cagggcaccg gacaggtcgg tcttgacaaa 13140
aagaaccggg cgccccgtcg ctgacagccg gaacacggcg gcatcagagc agccgattgt 13200
ctggttgtgcc cagtcatagc cgaatagcct ctccacccaa gcggccggag aacctgcgtg 13260
caatccatct tgttcaatca tgcctcgatc gagttgagag tgaatatgag actctaattg 13320
gataccgagg ggaatttatg gaacgtcagt ggagcatttt tgacaagaaa tatttgctag 13380
ctgatagtga ccttaggcga cttttgaacg cgcaataatg gtttctgacg tatgtgctta 13440
gtcattaata ctccagaaac ccgcggtgta gtggctcctt caacgttgcg gttctgtcag 13500
ttccaaacgt aaaacggctt gtcccgcgtc atcggcgggg gtcataacgt gactccctta 13560
attctcatgt atgataattc gagggtagcc ggggatcct 13599

```

5 <210> SEQ ID NO: 48
 <211> 799
 <212> ADN
 <213> *Populus tremula* * Tremuloides KR121

<400> SEQ ID NO: 48

```

ctaaaattga agattgttac ataatttctg gagacgattg tgtggcagtt aaaagcggtt 60
gggatgagta cgggattgca tttggaatgc ccacaaagca actagtcatc agacggctca 120
cgtgtgtctc tccgtacagt gccacgattg ctctagggag tgaatgtcg ggtgggatag 180
aagatgtag agcagaggat atcacagcca tccacacaga atctggggtc aggatcaaaa 240
ctgctgtagg gagaggaggg tttgtgaagg acatatacgt gaagagaatg actatgcaca 300
ccatgaaatg ggtcttttgg atgactggaa attatgggtc acatgctgat aagaattatg 360
acccaaacgc actgccattg attcaaggca taaattacag ggacatggtt gcagacaatg 420
tgacaatggc ggcaagattg gagggcatcg caggcgatcc attcaaggaa atttgcattc 480
ctaattgtcac aatcggattg gcaccgaagg cgaagaaggt accctggacc tgcaccgaaa 540
ttgaggggat gacaagcggg gtaagtccac ggccatgtga tttgctaccg gatcaagggc 600
cagagaaaat cacatcctgt gatttcctc cggagaatat accaatcgac ttggtgcagc 660
tcaagacgtg ctcttcgga atgagttata tgtgaacttt gcttctctac taccatcaag 720
caatgtataa aactgctag ctccgagcaa aaaatatata taatctacta gtttttctca 780
gttttggaia aaaaaaaaaa 799

```

10 <210> SEQ ID NO: 49
 <211> 1182
 <212> ADN
 <213> *Populus tremula* * tremuloides KR125

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (478)..(478)
 <223> n es a, c, g, o t

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (623)..(623)
 <223> n es a, c, g, o t

25 <220>
 <221> misc_feature

ES 2 571 338 T3

<222> (625)..(625)
 <223> n e s a, c, g, o t

<400> SEQ ID NO: 49

5

```

accgttctca aggatctgat catgtctttg ttgcctctca cgattacggc gcttgtttcc      60
atgccatgga ggagagagct atggaagatg ggatcccaga gtttttgaag aggtcgatca      120
tattgcagac ttttggtgtc aaatttaacc atccatgcca agacgttgag aatgtcgtga      180
taccaccata catctcgccg ggaagcgtac ggacaaccct cgagaaatat ccgctgaccg      240
gccggcgggg cgtttgggcc ttctttagag gcaaaatgga agtgcacccc aaaacatta      300
gtggacgata ttacagcaag aaagtgagga cggatgatatg gagaaaatac agcggtgacc      360
ggaggtttta tttgcaaagg cacaggtttg ccggttacca gtcagaaatt gtccggtcag      420
tgttctgttt atgccccttg ggatgggccc atggagccca aggctggtgg aatctgtngc      480
cttagggtgc gtgccggtga taattgcgga tggcatccgg ttgcccttcc ccaccgctgt      540
ccggtggtcg gagatatccc taaccgtggc cgaaaaggac gtggccaatc taggaacttt      600
actcgaccag gtggcagcta ccnanttgtc agccattcag aaaaacctgt ggaccccaga      660
tgttaggcgg gccctccttt tcaatgatcc agtgcagggg ggagatgcca cgtggcaggt      720
gctttatgca ttggcacaga agctggacag gtcgtacaga accgtgaggc tttcaaacca      780
ctagtgaagg tacttttttg gggacccgag tgccagctaa ggaggccgc ttttgccagc      840
taagagacat ggagcacagc tggattttta atgtttttct tggattgatc aaaccatggg      900
aattttaaga ggcaaagagg tggggtccag cctatgcaga gattaagatt atctgcaatt      960
ttttgtgtgg tcccgtgact tgctcgggtga gttggctgac tgtgattgat ggggctgaac     1020
ggtacatata attgtaaagc aatgctgtag atgagggaga ggtttctggt ttgagaaatt     1080
atgagagaat aatgcaaaa atagccctg taaatactct aataatgagt cgaagtcat      1140
tgcaatttac tgaaaacca acccatttct aaaaaaaaaa aa                          1182
    
```

<210> SEQ ID NO: 50
 <211> 791
 <212> ADN
 <213> *Populus tremula* * *tremuloides* KR129B

10

<400> SEQ ID NO: 50

ES 2 571 338 T3

```

ccatctcctt caggcactca tattctccgt acttttttagc aaatggaagc taaaagacta      60
atthtagctc tottctctct cttcttgctc tctaaatcct ctgctttccc tagcagaaaa      120
tctcgagttc ataaaccatg caaaagatta gtcttctatt tccatgacat tattttacaat      180
ggcaagaact ccaagaacgc aaccgcggca attgtggggg caccagcttg gggcaacaag      240
accatattgg ctaaccaaaa ccattttggt gacttggttg tttttgatga cccattacc      300
ttagacaaca acctacactc ggccccagta ggtcgtgccc aagggattta tgtgtatgac      360

aagaaagaaa tcttctactgc ctggctaggt ttctctttcg tttttaactc tactgagcat      420
aaaggaagca taaactttgc cggggctgat ccattgatga acaagactag ggatgtttca      480
gtgattggtg gtactggaga cttcatcatg gctcagaggaa tagccacatt gatgactgat      540
gcattcgagg gtgaagttha tttcaggctt cgtggtgata ttcagttgta cgagtgcctgg      600
tgacagtttt tgcttcgagt tcagcatttg atggttctct ctttttaatc ggttttccag      660
caaaattaag aagaaggttg atttcctttg cagttattga atcgagatc ttgtatcacc      720
aagtgtttca taattgaaat aacttttcat gaggttataa ttaactttta ttcttaattt      780
gttatcagtt t                                                    791

```

<210> SEQ ID NO: 51

<211> 792

<212> ADN

<213> *Populus tremula * tremuloides* KR140

5

<400> SEQ ID NO: 51

```

cttgttcgat cctgcacta atcctgatta atgcctgcat tcccttttag atthtgtgtt      60
tgatthtgtc ctgtaaggag ctggatatgc gggatcatat ggagagattt gtagttcttc      120
cattctccat cgcctgtgct tctcactcca gtggtgatgt ggcctccagt gaatcctcca      180
agaaaccaag acccgaaacc aaatcacatg catcaagagg acaagaaggg gaggaagct      240
cttgtaaaga aaagacgaag aacagtacac ttggtttcct gctggctctt ccaaagcctt      300
gcatatccag tagcttgcac aaattgatta gaggcacaa gactctctcc caagtatttg      360
tgtacaagga agaagacgag gagctaattg aaagagagat ggaaatcgga tatccaactg      420
atgtgaagca tgtaacacac ataggattgg atggaactac gatgacaaat cctataaagg      480
gctgggattg tctgaaatct ccagaaataa ttccattccc ttcatttact ttaaggcagt      540
togagcttgc aatggctgca caagctcatg gacctcttgt tggggtcgat cattccaagc      600
ttgthtgatt cattgatttt tctthtcatt tctgatctt gthtcttga cactagatga      660
ctgatgtgat gaagattgat caatgtthtt gatggaggca ctggttgacg tgatgtgttt      720
ttggtgtttg tgtgggacct tgacaatgth tttctgggtg gccattgaaa ttgttcttgc      780
aaaaaaaaaa aa                                                    792

```

10

ES 2 571 338 T3

<210> SEQ ID NO: 52
<211> 682
<212> ADN
<213> *Populus tremula* * *tremuloides* KR152

5

<400> SEQ ID NO: 52

```
cttttcagtc gtgagttaag cagcacaaca agcatgagag gcactctctg ttatgttgct      60
ccagaatatg gtgggtgtgg atacttgatg gagaaggctg atatatacag cttagggggt      120
ctaatectcg tgattgtctc cggtaggagg ccattacatg ttcttgcttc accgatgaag      180
cttgaaaagg caaatttaat aagctggtgc aggcagttag ctcaaactgg gaacatctta      240
gaacttgtag atgagagaat gaaggacgaa cacaataagg agcaggcaag cttgtgtata      300
aacttggctc tgacatgctt gcagaggatg cctgaattga ggccagatat tggagagata      360
gtgaagattc tgaaggga gatggatcta ccgcatcttc ctttogaatt ttctccctcc      420
ccaccttcca aattgtttag taggtcaagg agaaaacaaa aatctaattgc agagtagggt      480
cagtacatat tctttgtttt cttccattga tcatgttttt actgagtggg acataggatg      540
ggagctgtaa tctgataaca cattatggat gtgaaggat tttcttaatt cgagcttaca      600
atgctatag tacatcagaa tctcagatga gtggattttg ctttccttgt ctctaattgg      660
atatggaaaa aaaaaaaaaa aa                                             682
```

10 <210> SEQ ID NO: 53
<211> 911
<212> ADN
<213> *Populus tremula* x *tremuloides* KR163

15 <400> SEQ ID NO: 53

ES 2 571 338 T3

ttgtgtttga agaatggggt ggagatccaa atgggatttc tttggttaga agagatgtag 60
 acagtgtgtg tgctgatatt tatgagtggc agccaacttt gatgaattat cagatgcaag 120
 catctggtaa agtcaataag ccactgagge ctaaagctca tctgtcatgt ggccctggac 180
 agaaaatcag atcaatcaag tttgccagct ttgggacacc agaaggggtt tgtggtagct 240
 atcgccaggg aagctgtcat gccttccact cttatgatgc ttttaacaat ctttgtgttg 300
 ggcagaattc atgctcgggt actgtagcac ctgaaatggt tgggggagat ccttgccctga 360
 atgtcatgaa gaaactagca gtagaggcca tttgcagctg atgagctaca acggctgaag 420
 taaatgaaat aaagaagatt ctggatttga ttttctcacc ctccaataca gcatcttcgg 480
 tatactatctt tatggttaaa ttaaaagctt cacaaccagg agcactacaa acatttgctc 540
 tggcttttcc aggggtgaagt tgtacaaata tacagcacac catctggctg atagccatat 600
 agattgtgca aatgattgca gataagcttt tttatgtagg eggagccagt gtttattggt 660
 ggtgtcctgt atgtatatgc agcaacaag tgaaggagtg ggttcggtag aagcacattg 720
 agatgaaaaa ctaaacgagt ccatgtgcaa atttggtagt ttttagagta tggaaagcct 780
 ctggtttcct gtgatcttat attttttatt caatgtaaac ttcctgggaa ccccacttcc 840
 tttgttgeta tgttcttgta agaaagtctc taagttaaag aatgatacc aaacttcgga 900
 aaaaaaaaa a 911

<210> SEQ ID NO: 57

<211> 725

<212> ADN

<213> *Populus tremula x tremuloides* KR221

<400> SEQ ID NO: 57

ccttcggcga gtcaccaga tgtgtcctga ctgccttggg tgacaacaag caactggaat 60
 tattgctgca ttaactatat tataagaagc agttactcag tggggattct ggtgggcatt 120
 tgctgtcatg gacactacca gatgagagct tgctgacgct atctaatacag ggggtgagagg 180
 gggggaaact gatttaagcg tgattgtttc agctcgtggc agctatztat tatctattga 240
 aatcctatgc gggttttgtc tgccaccacg gcaaaggaag taaaggattc tatgttcgta 300
 atacattgag aagggagaac aaggcagcag ggctggcctg ggattgaaag aggacaggca 360
 aaaagaagat gagatctttt atagatgact gataaatgct gacttcctgg caagcatgaa 420
 gactctcgtg ccaggcttct tattgagaat ggaaagtgga gtcttgcttc ttgttgact 480
 ctgggttctt ggcgaggaca tttttgattt tgcacgtgaa cagagtcatt aggttgcttg 540
 ttcaatgtac atagatggaa ttaccaacag tgtgttatga agttgtatag agaaaaagtg 600
 tgcgcaagga atggagagct gtgaaaccac ctggccaagt taattgggct attgtattct 660
 tcgacttaat ttttttaaaa tagtgcaatg gggcaccac tgcccatttc ttgctaaaaa 720
 aaaaa 725

ES 2 571 338 T3

<210> SEQ ID NO: 55
 <211> 949
 <212> ADN
 <213> *Populus tremula x tremuloides* KR224

5

<400> SEQ ID NO: 55

```

gctagctgta tagttgaaga gaagctgaag aggaagagat ggcagagcag gaggtgaaga      60
aggtagagggc tgtaacgccc gtggctccag ctccagtggg aactaaaagt gatgtggccg      120
atgggaaagt tacggctcca ccacctccag tggctgcaga gaaagagaag gcagccactg      180
ctgctgagga atcaaaagct cttgctggtt ttgaaaagac agaacctgct tcgaagaagg      240
tttcagggcg atcaattgac agagatgtag ctcttgctga ccttgaaaag gaaaagagac      300
tttcctttat caaggtatgg gaagacagcg agaaaactaa agccgagaac aagtctcaga      360
aaaatttctc tgctgttggt gcctgggaga acagcaaaaa ggcagctctg gaagccaaac      420
tgagaaagag ggaggaaaaa ctggagaagc aaaaggcaga atatgcagag aaaatgaaaa      480
acaggattgc ttaattcac aaagaagctg aggaaaagaa ggcaattgtg gaagccaaac      540
gcggggaaga ggtcttaag gcaggggaga cggctgcaaa ataccgtgct accgggcaaa      600
ccccgaagaa gtccttggt tgcttctgaa gtcgcaactg taggagcatg gaagcggaaa      660
gttgaatcat aattcttct ctgcatatag tgtttttaac tccttgcttt tcttgcttgc      720
ttgttattat tattattatt ttttttccca catggtttca tgtcttcttt cattaacat      780
cggcaaattt aaatattcag tgtgtttatt atgtatagga atacaatatt tgatctgtga      840
gaaacaagct taacatgttt gtgaagttgg cttctcttgg catactagtg aggttgcctt      900
gtcgaacaca tccttttcat atttttcggt atcttcccaa aaaaaaaaaa      949
    
```

10 <210> SEQ ID NO: 56
 <211> 1226
 <212> ADN
 <213> *Populus Tremula x tremuloides* KR235

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (482)..(482)
 <223> n es a, c, g, o t

20 <400> SEQ ID NO: 56

gtaaagctcc gtatTTTTag ctgggtttct cttaaaaaat ggaacttggg ctCGTggggt 60
 tgtagagagc agcctggatt gcagggacgc tgcctatact tatagcttca ctGCCatgtg 120
 cttggctggg ttcttttcat ggacttgttt tggggtttgc aaggagagga aagatcatgc 180
 aatcatcatc tcatcgtaa ttcactgctc cccaaagatt cttttctcat ttctatgtgg 240
 tggctgtggc gtggacaact ctcttgcttc ttggaacatc gatatatgct tatagaatga 300
 caccaatagt ttctgagccg tttttctact ctgatctagg cagctacttg gcaggacgat 360
 caaacatatt ctcatttcat cgatcacggg tgatgagttt agagaataga tacagggttt 420
 ggctttctgt gtttctgctt ttgctaattg aagttcaagt ctCGaggcgt cttttcgaga 480
 cngcatatgt atttaaatat agcgcctctg ctCGgatgca catttttggc tatcttactg 540
 gctattcttc tacacagcag cgcctctgac actctgctgt acctgtgcac ccgaagtact 600
 caaatTTggc ataaatgaag tgtctgagct cattcttaa ggcaaacgct caatgcaaaa 660
 cattgaattt cactggTggg actttgTtaa ccctttattg aagctTggat ggtgccagtg 720
 gattggcgca gttatatttc tttggggTtg gattcatcag catcgTtgcc atgcaattct 780
 tggctcacta agggaacacg tgggaaaggc tgatgaatat gtaattcccc gtggTgattg 840
 gttcgagatt gtttcatctc cacactattt ggCagagatt gttatatatg ctggcatggt 900
 tttgctagt ggaggggCag acctcaccat ttggTtagtt tttggatttg tggTgtcaaa 960
 tctggTgTtt gcagctgcag aaacacacag ttgccatcgc gtgattaaga tgatggctac 1020
 agcaaatgtct tgacaagagg taggaaaaaa tttattagag aagcaaatTA gtttggTgaa 1080
 tgTttatgtt atgtccagat gccctttctg aggcgattga attctatctg attgtgtagt 1140
 tcctgtaagc ttcagacatc tcatccaatt ggatggTgca attactataa tgaattgtgc 1200
 attcaattg ttgctcgaaa aaaaaa 1226

<210> SEQ ID NO: 57
 <211> 1020
 <212> ADN
 <213> *Populus Tremula x tremuloides* KR242

5

<400> SEQ ID NO: 57

gtcaagataa agtccattc tttttcctag ccccaagttt gtttgagggg tgataaaaaa 60
 tgaaccaaga gatgaatggt gttgacactg agattgatca gaaccaccaa gagaatgtgc 120
 aagagaaaat cgattatgtg ttaaggtgg tggTgatcgg tgactctgca gtgggcaaga 180

10

ES 2 571 338 T3

```

cgcaaattct ttccaggttt accaagaatg aattctgctt tgattcaaag tctaccatcg      240
gtgtcgagtt cccagactag gactgtcatc attaaagaca aggtcatcaa ggctcagatc      300
tgggatactg ctggccaaga aaggtagcgg gcagtgacaa gcgcatacta tagaggggca      360
ctaggggcca tgtagtcta cgacattacc aagagaccaa cgtttgatca tgtggctagg      420
tgggtggagg agctccgagc ccatgctgac agctcaattg tgatcatgct gatcggaaac      480
aaggctgac ttgtggacct cagggcagtt ccaacagaag acgcggtgga atttgcagag      540
gatcaaggcc tcttttttcc tgagacatca gcccttagtg gtgacaatgt ggatggtgca      600
tttttcaggc tgctagaaga aatttacggt gtgatttgta agaagtcatt ggaatgtggc      660
aatggaaaac cccatgctgc tgatgccata acgcttagag gttctaagat tgatggcata      720
tcagggacgg atctggggat tagtgagatg aagaaattat ctgcttgctc gtggtgattt      780
gatcatttct cttgtgaatt gtgtactata agacttcacc actcccatgt tcttaattga      840
ttctgtggct ttctttggaa agtgggtgac ggtcgtgtgg tgaggggtggc aagtttttcc      900
ttttctgtga cctgtcaaga ttttagcagt attgtacttg tcttacagaa cccatgaatt      960
tggttttttt atatgtattg atttggatgg atggttttcc ttttcctctg aaaaaaaaaa    1020

```

<210> SEQ ID NO: 58

<211> 844

<212> ADN

<213> *Populus Tremula x tremuloides* KR292

<400> SEQ ID NO: 58

5

ES 2 571 338 T3

```

cacaaagcta gatttttttg tgcctctggc atgagtatat gaacgcttct ctatgggttt      60
gtcatgtgga gaggatgatt ttgaaaagaa tggaagtcac gaagttccgt taatagttga      120
tagcagaggg actagagtca gcggtggcta tatggattta caacatcttc atcatgcagt      180
tgagtacgag gtogaattct ggccagttga acaccaatg gaaccacagg atgaagatcg      240
tcctgtcaaa tgtccaatgc caacctcttc tgttatcaag aatggaaggc cgcatgagga      300
gagattagag aagagagcgg acgacctcca actacctgcg gtaatgaaca aacaaggcat      360
tgttgtggtg gctgcagagc cccaagtccg agcagtgcgt aaaaggcacc atacacttac      420
ccgccaggac cacogtgtaa tagcacctga tctaacaagg atggcttcac ttctgtctct      480
gccaactcag aacgtcacca tttttcaaat gcttcaagaa ctgacaagt tcgatcagta      540
ttaaaaaggt ataaagaata aattaggaaa cccacatttc cgetccatct agctttaata      600
gctacttttc aatccattgc ggagcggcca atgaattctt catgatttgt atttcggggc      660
aatagggaaa gaaatatcat agatatgcgg tataagaagc actcttattg tactatgatt      720
tttatttttt atatattctg tagaatgtgt cttccagcct aattgtaggt ttctttatc      780
atctctttgt tcagatttgg atggataatt agcatgacac tctgcaatac cgaaaaaaaa      840
aaaa

```

<210> SEQ ID NO: 59

<211> 1003

<212> ADN

<213> *Populus Tremula x tremuloides* KR313

<400> SEQ ID NO: 59

5

ES 2 571 338 T3

gaaaaattct cctggaccag ctaagagaga gcttagacaa gctactagac aggcacttca 60
 attgcttcaa gacaactatc cagaatttgt ggccaaacag atcttcatca atgttccctg 120
 gtggtaccta acagtaata gaatgataag tccattttta acccagagga ccagaagtaa 180
 gtttgtcttt gttggtcctt ccaaactctgc cgaaacctt atcaggtaca tagccgctga 240
 gcaaatacca gtgaagtacg gaggcctaag caaagatggt gaatttggct cagctgacgc 300
 tgttactgag attaccgtga agccagcagc aaaacacacc gtagaattcc cagttactga 360
 gacatgcctt ttaacatggg aagtgagagt tgcgggatgg gatgtgagct atggtgcaga 420
 atttgtacca agtgctgaag atagctacac agtgatcatc caaaaggcta gaaaggttgt 480
 tgcaactgaa caaccagtgg tttgcaacag tttcaaaatt ggtgaacctg gtaaagttgt 540
 tctcaccatt gacaatacca catccaagaa gaagaagaag ctctctatc gcttgaaaac 600
 caagcccgtt tcttctgatt aattaaggga ctatatatag tgaaacaata atagaagatt 660
 ttgcttacat tcttgctgct gctgctgctg ccaattttat caacatgatc atatcacagc 720
 ttgaaggtgt tctgagggtc tcgatcatgg agaagataaa gaaatcttga agatgtttat 780
 ttatatgttt atttataatt gaattttgtt ttggtgtgga atggattaag gatgttgtgc 840
 aattgaaggc tagaagcatg tgtggggata ggaagaagc tccattacta gtgccaagag 900
 ttttctttgt aaattcgtta tggctttctt tctctttccc tgtaagtatc ttttggacat 960
 attatgatat taatgaagac agtatcttcc ataaaaaaaa aaa 1003

<210> SEQ ID NO: 60
 <211> 896
 <212> ADN
 <213> *Populus Tremula x tremuloides* KR318

5

<400> SEQ ID NO: 60

cattatccca aaaaacgagc aaggcagata cagcagccaa aaccatgtca cccggtcccg 60
 tcggtgagge tgaacccgcc gccgccgtgg aagatacaca gaagaagaag cctcctcagc 120
 aggacgtgga tgaacctgtg gtggaggacg tgaaagaaga tgagaaggaa gaggacgacg 180
 acgatgatga tgaagacgac gatgatgaag atgatgacaa ggatgatgat accccaggtg 240
 ctaatgggag ttccaagcag agcagaagtg aaaagaagag tcgcaaggca atggtgaagc 300
 ttggcatgaa acctgttact ggtgtagca gagtcccat caagagaacc aaaaatatac 360
 tgttttttat ctcaaagcct gatgtcttca agagccaaaa ttctgagacc tatatcatat 420

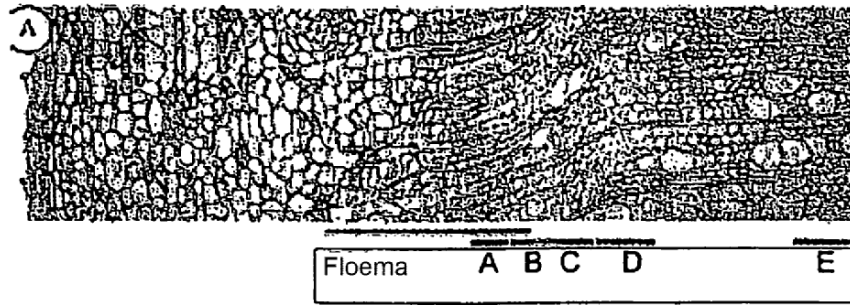
10

ES 2 571 338 T3

ttggagaggc	aaagatagag	gatttgagct	ctcagctgca	gacacaggct	gctcagcagt	480
ttagggtgcc	agacatgtca	tctatgctac	caaaatcaga	tgcttctact	gcagctgctg	540
ctgcaccagc	agatgaagaa	gaggaagaag	tcgatgagac	tggggttgag	cctagggaca	600
ttgatcttgt	tatgacacag	gctggagttt	ctaggagcaa	ggctgtcaag	gctctccaga	660
cgaacaatgg	ggacattgtc	agtgctatca	tggagcttac	tacatagggt	ggctccctgg	720
ttactctcct	atcttctgct	cacaagttct	tggaacaatt	taatcatggt	agtcacattg	780
gcttgccatc	tatgaggtcg	ctaattatcc	attgtttgtg	tcaaatttga	gattattacc	840
tattgcggtt	tttctttagt	agcaagctct	tattgtgctc	tttgcaaaaa	aaaaaa	896

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para producir una planta leñosa transgénica que tiene una altura de crecimiento aumentada en comparación con su tipo silvestre, que comprende suprimir la expresión en la planta del nivel de un producto génico expresado específicamente durante las fases de formación de la madera codificado por
- 10 a) la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 15; o
b) una secuencia de nucleótidos que es al menos un 70 % idéntica a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 15;
- en donde la expresión se suprime mediante interferencia de ARN.
- 15 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha expresión se suprime proporcionando una construcción de ADN recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre el grupo que consiste en
- 20 d) una secuencia de nucleótidos complementaria de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 15; y
e) una secuencia de ácido nucleico que es al menos un 70 % idéntica a la secuencia en d);
- y expresar la construcción de ADN recombinante en la planta transgénica para producir un transcrito de ARN.
- 25 3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la secuencia de nucleótidos comprende la secuencia SEQ ID NO: 36 o una secuencia de nucleótidos complementaria de la misma.
4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la secuencia de nucleótidos codifica un polipéptido que comprende una variante sustituida de manera conservativa de un polipéptido de (a).
- 30 5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la secuencia de nucleótidos comprende una sustitución silenciosa en una secuencia de nucleótidos.
6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la construcción de ADN recombinante comprende además un promotor constitutivo, inducible o específico de tejido unido operativamente a dicha secuencia de nucleótidos, tal como un promotor constitutivo fuerte delante de un casete transcrito que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se ha definido en la reivindicación 2 seguido de un intrón funcional en plantas seguido de la secuencia de nucleótidos tal como se ha definido en la reivindicación 2 en orientación invertida.
- 35 7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el método comprende la etapa adicional de transformar células regenerables de una planta leñosa con dicha construcción de ADN recombinante y regenerar una planta leñosa transgénica a partir de dicha célula transformada.
- 40 8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la planta transgénica es una planta leñosa tal como una del grupo de *Populus* o una conífera que puede seleccionarse entre el grupo que consiste en ciprés, abeto de Douglas, abeto, secoya, cicuta, cedro, enebro, alerce, secoya, picea y tejo o un frutal que puede seleccionarse entre el grupo que consiste en manzano, ciruelo, peral, bananero, naranjo, kiwi, limonero, cerezo, parra e higera, o en donde la planta leñosa se selecciona entre el grupo que consiste en algodón, bambú y plantas del caucho, una planta de madera dura que puede seleccionarse entre el grupo que consiste en acacia, eucalipto, carpe, haya, caoba, nogal, roble, fresno, sauce, nogal, abedul, castaño, álamo, aliso, arce, sicómoro, ginkgo, una palmera y la goma dulce, tales como de la familia salicáceas, incluyendo variantes de los mismos.
- 45 9. Una planta leñosa transgénica que tiene una altura de crecimiento aumentada en comparación con su tipo silvestre con expresión suprimida del producto génico expresado específicamente durante las fases de formación de la madera, que comprende una construcción de ADN recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre el grupo que consiste en:
- 50 a) una secuencia de nucleótidos complementaria de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 15; y
b) una secuencia de ácido nucleico que es al menos un 70 % idéntica a una cualquiera de las secuencias en a);
y
- 55 10. Una construcción de ADN que comprende al menos una secuencia descrita en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 60 11. Una célula de planta leñosa o descendencia de una planta leñosa que comprende la construcción de ADN de acuerdo con la reivindicación 10.
- 65



B

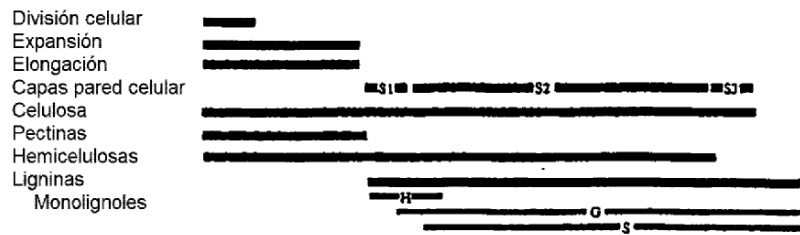


Fig. 1a

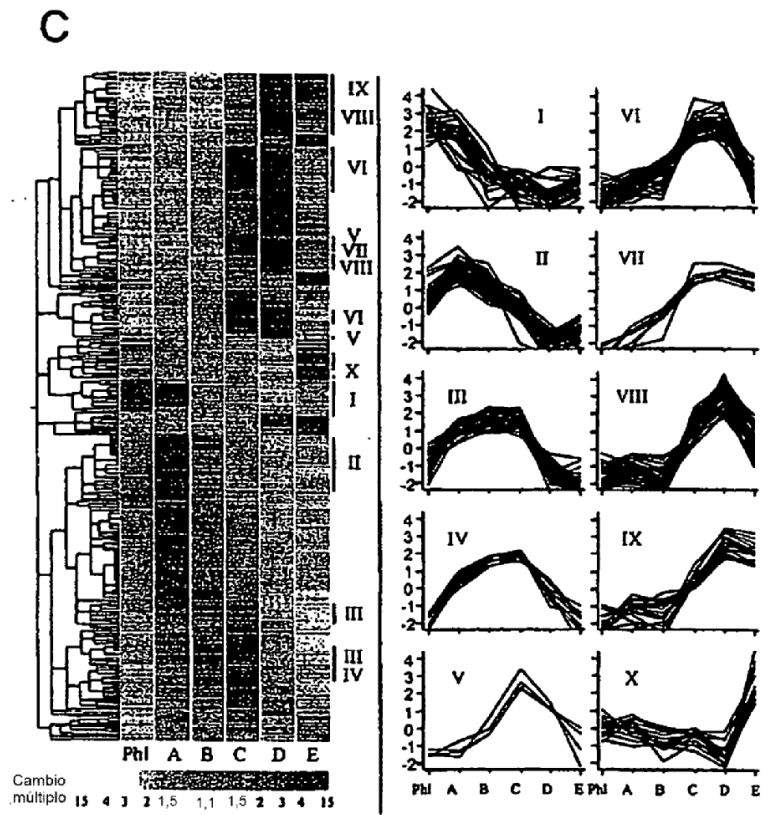


Fig. 1b

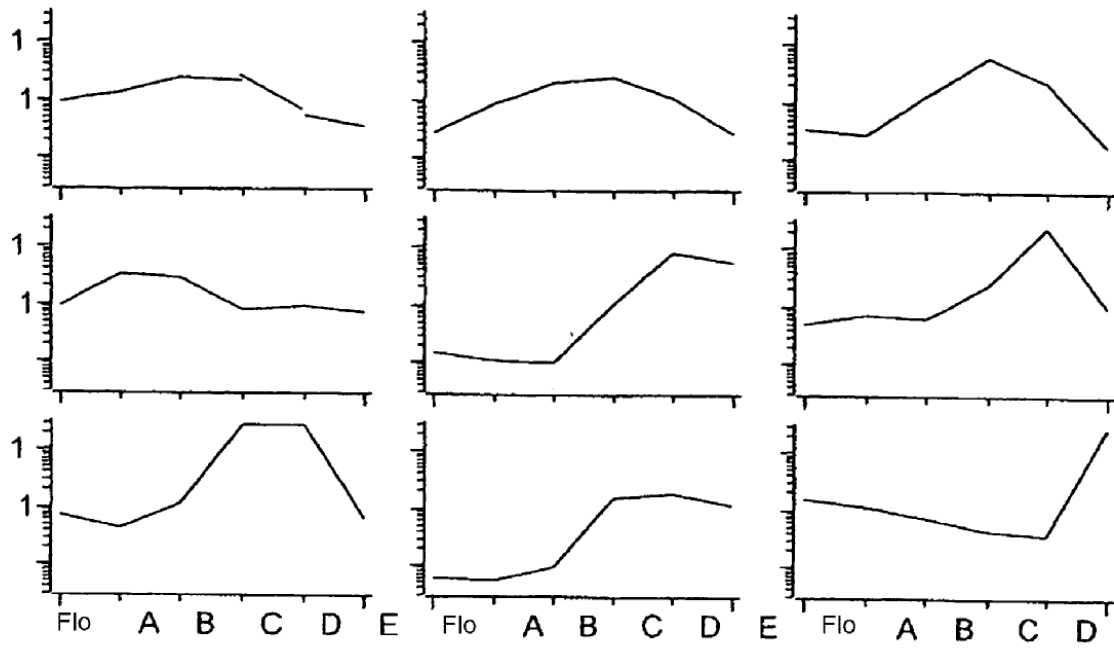


Fig. 2

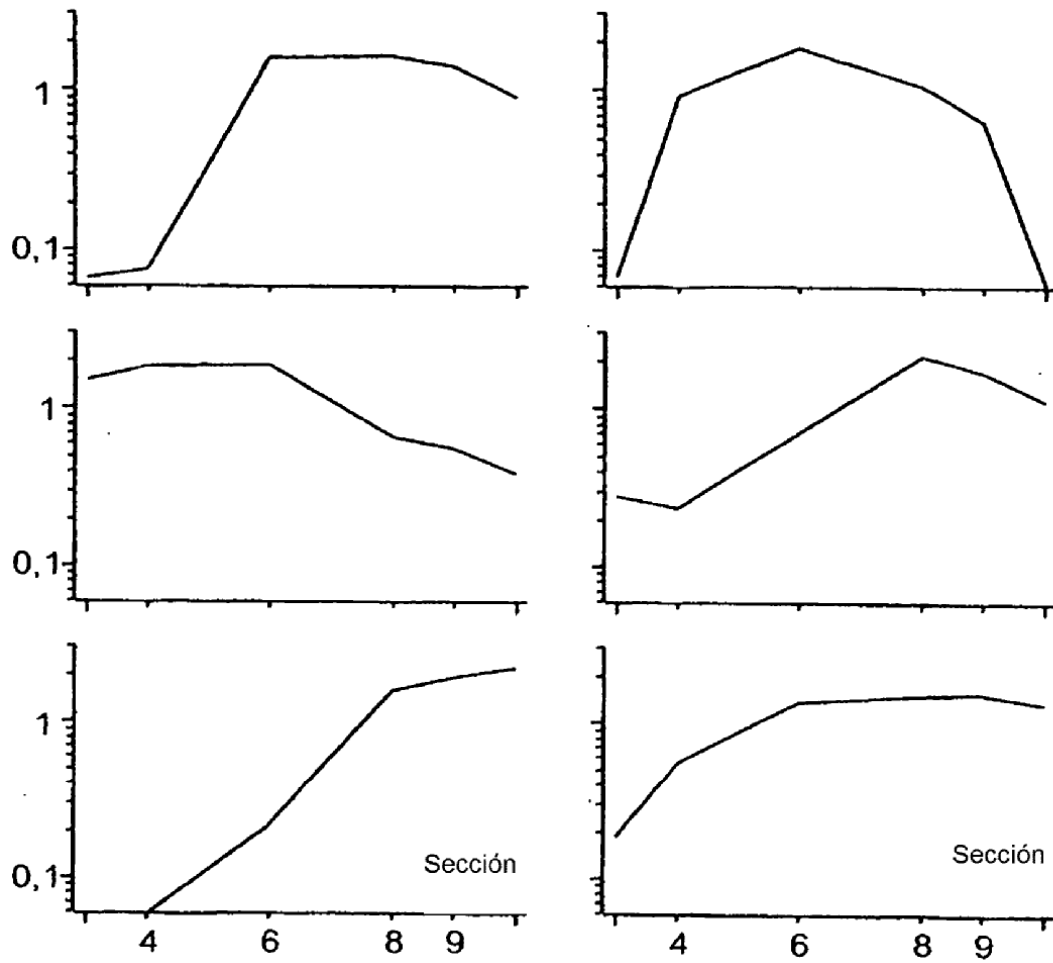


Fig. 3

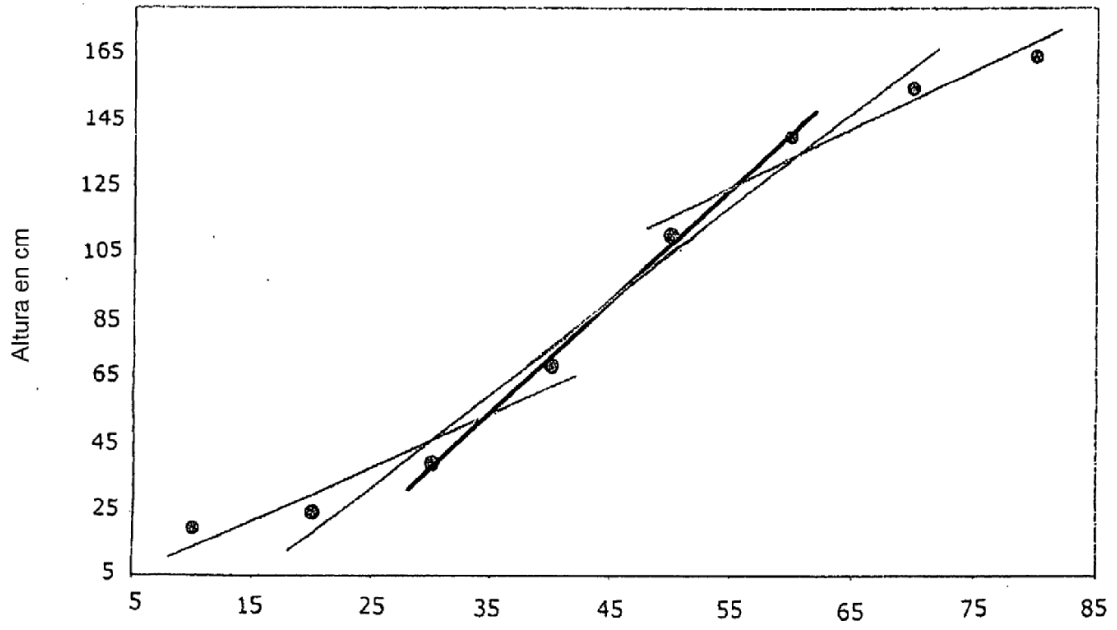


Fig. 4 Tiempo en días en el invernadero