

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 584 316**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/82** (2006.01)

**A01H 5/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.03.2005** **E 12191983 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.03.2016** **EP 2557166**

54 Título: **Promotores preferidos del cámbium/xilema y usos de los mismos**

30 Prioridad:

**06.04.2004 US 560227 P**

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

**27.09.2016**

73 Titular/es:

**FIBRIA CELULOSE S/A (100.0%)  
Alameda Santos, 1357, 6th floor  
Sao Paulo / SP, BR**

72 Inventor/es:

**PAPES, FABIO;  
GERHARDT, ISABEL RODRIGUES y  
ARRUDA, PAULO**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 584 316 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Promotores preferidos del cámbium/xilema y usos de los mismos

## 5 Campo de la invención

La invención se refiere, en líneas generales, al campo de biología molecular, bioquímica y agricultura. Más particularmente, la invención se refiere a polinucleótidos adecuados para la regulación de la expresión génica en plantas y la generación de plantas transgénicas con calidad y productividad mejoradas.

10

## Antecedentes y técnica anterior de la invención

La modificación de un rasgo en plantas, a través de modificación por ingeniería genética, depende de la inserción, en el genoma de la planta, de una construcción polinucleotídica que contiene el gen de interés, unido operativamente a un promotor que es funcional en la planta transgénica. Dentro del genoma de una planta, cualquier gen sencillo está, en general, unido operativamente a un promotor, que determinará cuándo y dónde, debe expresarse el gen dentro de los tejidos y órganos de la planta. Por lo tanto, si se quiere expresar un gen de interés en los tejidos u órganos específicos dentro de una planta transgénica y de una manera temporalmente regulada, deben usarse promotores preferidos de tejido. Por otro lado, la expresión en todos los tejidos de la planta, a lo largo del ciclo de vida de la planta, se conseguiría usando promotores constitutivos.

En diversas situaciones, la expresión de genes particulares en tejidos u órganos particulares, confiere a la planta un fenotipo de interés específico. Por ejemplo, si se quiere mejorar la calidad nutricional de semillas de cereales, se inserta un gen que confiere dicho fenotipo usando promotores específicos de semillas, en lugar de usar promotores constitutivos, que permitirían al gen expresarse en todos los tejidos de la planta produciendo, en algunos casos, fenotipos no deseables. En otro ejemplo, si se quiere aumentar la cantidad de celulosa en los tejidos vasculares en desarrollo de un árbol forestal, en el genoma de la planta debe introducirse un promotor preferido de xilema y/o cámbium unido operativamente a un gen heterólogo que codifica una enzima implicada en el metabolismo de celulosa, de tal manera que podrían producirse más moléculas de celulosa en el xilema de la planta en desarrollo. En otro ejemplo, el fenotipo deseado podría obtenerse inhibiendo la expresión de un gen endógeno dentro de un tejido específico de la planta. Eso podría realizarse introduciendo una construcción que comprendiese un promotor preferido de tejido unido operativamente a un polinucleótido que inhibiese la expresión del gen endógeno, bien mediante hibridación antisentido o bien mediante silenciamiento de ARN (Matzke (ed.) et al. (2000) Plant Gene Silencing. Kluwer Academic Publishers).

35

El documento WO 99/09188 desvela un promotor específico de xilema derivado del gen de la CCoAOMT del álamo.

Hasta ahora, la producción de plantas modificadas por ingeniería genética que expresan rasgos útiles y/o deseables requiere la disponibilidad de promotores que permitan al gen o genes de interés expresarse de una manera específica de tejido y sincronización. Por tanto, el aislamiento y la caracterización de promotores preferidos de tejido, particularmente preferidos de cámbium/xilema, que pueden servir como regiones reguladoras para la expresión de secuencias nucleotídicas heterólogas de interés de una manera preferida de tejido, es esencial para la modificación de plantas, mediante ingeniería genética, que exhiben rasgos particulares.

## 45 Sumario de la invención

Un primer objeto de la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene la capacidad de iniciar, en una planta, la transcripción de un gen de una manera preferida de tejido de xilema y/o cámbium, en el que dicha molécula de ácido nucleico aislada comprende una secuencia de nucleótidos como se expone en la SEQ ID NO: 3.

50

Un segundo objeto de la invención se refiere a un vector de expresión, preferentemente un plásmido, que comprende:

55 i) la molécula de ácido nucleico aislada, como se define anteriormente; y

ii) una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de interés, en la que (i) y (ii) están en unión operativa, en la que (i) no regula normalmente (ii).

60 Un tercer objeto de la invención se refiere a una célula de planta hospedadora recombinante, en la que dicha célula hospedadora recombinante se transforma o transfecta con y comprende

i) la molécula de ácido nucleico aislada, como se define anteriormente; y

65 ii) una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de interés, en la que (i) y (ii) están en unión operativa, en la que (i) no regula normalmente (ii).

Un cuarto objeto de la invención se refiere a una célula hospedadora recombinante, en la que dicha célula hospedadora recombinante se transforma o transfecta con, y comprende, el vector de expresión como se define anteriormente.

5 Otro objeto de la invención se refiere a un método de preparación de una célula de planta hospedadora recombinante, comprendiendo dicho método transformar o transfectar una célula con el vector de expresión como se define anteriormente.

10 Otro objeto de la invención se refiere a un método de preparación de una proteína codificada por el vector de expresión como se define anteriormente que comprende transformar o transfectar una célula con dicho vector de expresión, y cultivar dicha célula en condiciones favorables para la expresión de dicha proteína.

15 Otro objeto de la invención se refiere a un método para la preparación de una proteína, comprendiendo dicho método cultivar una planta o una parte de la planta, que comprenda una célula de planta hospedadora recombinante como se define anteriormente, en condiciones que favorezcan la producción de dicha proteína por dicha planta o parte de planta.

20 Otro objeto de la invención se refiere a una planta o a una parte de la planta que comprende la célula de planta recombinante como se define anteriormente.

25 La presente memoria descriptiva describe moléculas de ácido nucleico reguladoras aisladas del genoma de *Populus* sp, y métodos para regular la expresión de secuencias nucleotídicas heterólogas en tejidos de plantas, tal como de una manera preferida de xilema y/o cámbium. En el presente documento se describen moléculas de ácido nucleico aisladas que representan promotores con capacidad para dirigir la expresión específica de tejido de genes de interés. Las moléculas de ácido nucleico reguladoras descritas en el presente documento corresponden a secuencias promotoras de genes que se expresan preferentemente en el cámbium y/o en el xilema de *Populus* sp. Se descubrió que, los genes que codificaban isoformas de sacarosa sintasa (SuSy), alfa-tubulina (TUB), proteína arabinogalactánica (ARAB), ácido cafeico 3-O-metiltransferasa (COMT), cinamil alcohol deshidrogenasa (CAD), cinamato 4-hidroxilasa (C4H), cinamoil CoA reductasa (CCR), ferulato-5-hidroxilasa (F5H), sinapil alcohol deshidrogenasa (SAD), UDP-D-glucuronato carboxi-liasa (UDP), proteína de transferencia de lípidos (LTP) y ag-13 (AG13), se expresaban en el tejido del cámbium/xilema de *Populus* sp y sus promotores, se habían aislado, clonado y validado. Cuando estos promotores se asociaban en una planta transgénica con genes distintos a aquellos con los que se unían originalmente, los genes en cuestión se expresaban preferentemente en el cámbium y/o en el xilema de dicha planta transgénica. Se proporcionan métodos de uso de los promotores preferidos de cámbium/xilema, desvelados en el presente documento, para la regulación, en una planta, de la expresión de secuencias de nucleótidos heterólogas, de una manera preferida de cámbium y/o xilema.

40 Los promotores preferidos de cámbium/xilema se identificaron mediante el análisis de un conjunto de etiquetas de secuencia expresada (EST, acrónimo del inglés *Expressed Sequence Tag*) de *Populus* sp, que representan tejidos del brote apical, la corteza, el cámbium, la semilla, el xilema, la hoja y la raíz. Basándose en el perfil de expresión de estas EST entre los diferentes tejidos, se mostró que los doce genes indicados anteriormente se expresaban de manera elevada y preferentemente en el cámbium y/o xilema de *Populus*.

45 Los promotores preferidos de cámbium/xilema descritos en el presente documento se exponen en las SEQ ID NOS.: 1-12. También se describen fragmentos de estas secuencias de nucleótidos, es decir, los expuestos en las SEQ ID NOS.: 1-12 que comprenden al menos 20 nucleótidos consecutivos. Los fragmentos más pequeños, aunque no necesariamente codifican promotores o proteínas con actividad promotora, pueden actuar como moléculas antisentido y desactivar genes expresados y de origen natural. Las composiciones descritas comprenden adicionalmente secuencias de nucleótidos que tienen una identidad de al menos 65 % con las secuencias expuestas en las SEQ ID NOS.: 1-12 o con un fragmento de las mismas, y secuencias de nucleótidos que hibridan en condiciones de alta rigurosidad con una cualquiera de las secuencias anteriormente mencionadas.

55 "Condiciones rigurosas", como se usa en el presente documento, se refieren a parámetros con los que la técnica está familiarizada, tales como hibridación en 3,5xSSC, solución 1xDenhardt, tampón fosfato sódico 25mM (pH 7,0), SDS al 0,5 % y EDTA 2mM durante 18 horas a 65 ° C, seguido de 4 lavados del filtro a 65 ° C durante 20 minutos, en 2XSSC, SDS al 0,1 %, y un lavado final durante hasta 20 minutos en 0,5xSSC, SDS al 0,1 % o 0,3xSSC y SDS al 0,1 % para mayor rigurosidad, y 0,1xSSC, SDS al 0,1 % para incluso mayor rigurosidad. Otras condiciones pueden sustituirse, siempre que el grado de rigurosidad sea igual al proporcionado en el presente documento, usando un lavado final de 0,5xSSC.

60 Otras facetas de la presente invención incluyen construcciones, tales como vectores de expresión que comprenden los promotores unidos operativamente a una secuencia de nucleótidos de interés, que codifica una proteína deseada. El promotor desvelado en el presente documento tiene la capacidad de dirigir la expresión de polinucleótidos de interés en una célula de planta y dicho promotor comprende una cualquiera de las secuencias de nucleótidos de la presente invención.

65

También son una parte de la invención plantas recombinantes o células de plantas que tienen, en sus genomas, incorporada de manera estable la construcción descrita anteriormente o el propio promotor.

5 Los métodos de la invención también incluyen métodos para incorporar en las células, de manera estable, los productos de la invención.

Breve descripción de los dibujos

10 La Figura 1 ilustra esquemáticamente el vector plasmídico pAPROMATG+promotor que comprende el gen indicador GUS unido operativamente a una secuencia promotora. Los promotores se clonaron en este vector plasmídico en sustitución de la secuencia promotora representada.

La Figura 2 muestra el perfil de expresión de genes SuSy, TUB, ARAB, UDP, LTP y AG13, en un conjunto de tejidos de *Populus*, que están bajo el control de los promotores descritos en el presente documento en *Populus*.

15 La Figura 3 muestra el perfil de expresión de genes COMT; CAD, C4H, CCR, F5H y SAD, en un conjunto de tejidos de *Populus*, que están bajo el control de los promotores de la memoria descriptiva en *Populus*.

La Figura 4 ilustra esquemáticamente el vector plasmídico pALELLYXgi que es otro aspecto de la divulgación.

Las Figuras 5A y 5B muestran actividad beta-glucuronidasa en el tallo en floración de plantas de *Arabidopsis* transformadas de acuerdo con el Ejemplo 3.

20 Descripción detallada de las realizaciones preferidas

25 Las composiciones descritas en el presente documento comprenden nuevas secuencias de nucleótidos para promotores de plantas, particularmente promotores preferidos de cámbium/xilema para los genes de *Populus* (álamo leñoso) que codifican sacarosa sintasa (SuSy), alfa-tubulina (TUB); proteína arabinogalactánica (ARAP), ácido cafeico 3-O-metiltransferasa (COMT), cinamil alcohol deshidrogenasa (CAD), cinamato 4-hidrolasa (C4H), cinamoil CoA reductasa (CCR), ferulato-5-hidroxilasa (F5H), sinapil alcohol deshidrogenasa (SAD), UDP-D-glucuronato carboxi-liasa (UDP), proteína de transferencia de lípidos y ag-13 (AG13). Las secuencias de nucleótidos de estos promotores se exponen en las SEQ ID NOS.: 1-12, respectivamente. Estos promotores se aislaron de la región no traducida 5' que flanquea los sitios de inicio de la transcripción de sus genes respectivos. En la técnica se conocen bien métodos para el aislamiento de los promotores e incluyen herramientas bioinformáticas, tales como Phred, Phrap, Consed (Gordon et al. (1998) Genome Research. 8:195-202) para el ensamblaje de genes, alineamiento de secuencias (Durbin et al. (1998) Biological sequence analysis - probabilistic models of proteins and nucleic acids. Cambridge University Press, Cambridge, UK), búsqueda funcional (Altschul et al. (1997) Nucleic Acid Res: 25:3389-3402) y técnicas de PCR (Sambrook y Russell (2001) Molecular Cloning - a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA). Algunos de estos métodos se describen en el Ejemplo 1 anteriormente.

40 Se describen moléculas de ácido nucleico aisladas que abarcan 0,1 kb, 0,5 kb, 1 kb, 2 kb, 3 kb, 4 kb o 5 kb que comienzan en el codón de inicio ATG para la región codificante de los genes en cuestión. En el presente documento, las moléculas de ácido nucleico aisladas reciben el nombre de promotores. Los promotores corresponden a las moléculas de ácido nucleico cuya función es regular la expresión de un gen. Un promotor generalmente comprende secuencias de señalización específicas denominadas cajas, que se disponen a lo largo de la secuencia promotora, de tal manera que su composición determina la expresión temporal y espacial de un gen que está bajo su control regulador. "Promotor" o "región de inicio de la transcripción" significa una región reguladora de ADN que normalmente comprende una caja TATA que tiene la capacidad de dirigir la ARN polimerasa 2 para iniciar la síntesis de ARN en el sitio de inicio de la transcripción apropiado para una secuencia codificante particular. Un promotor puede comprender adicionalmente otras secuencias de reconocimiento, generalmente ubicadas cadena arriba o en dirección 5' hacia la caja TATA, denominadas elementos promotores cadena arriba, que influyen en la velocidad de inicio de la transcripción. Se reconoce que, habiendo identificado las secuencias de nucleótidos para las regiones promotoras desveladas en el presente documento, el aislar e identificar elementos reguladores adicionales en la región no traducida 5', cadena arriba desde las regiones promotoras particulares identificadas en el presente documento, se encuentra dentro de la última tecnología.

55 Por tanto, las regiones promotoras desveladas en el presente documento, en general, también se definen por elementos reguladores cadena arriba adicionales, tales como los responsables de la expresión temporal y tisular de la secuencia codificante, potenciadores y similares. De la misma manera, los elementos promotores, que facilitan la expresión en el tejido deseado, tal como xilema y/o cámbium, pueden identificarse, aislarse y utilizarse con otro promotor principal para conferir expresión preferida en el cámbium/xilema.

60 En el presente documento se identificaron promotores que regulaban la expresión de genes específicamente en el cámbium y/o xilema, y se aislaron de *Populus* sp.

65 El gen SuSy codifica una isoforma de sacarosa sintasa, una enzima implicada en la transformación de sacarosa en UDP-glucosa en el xilema en desarrollo. La UDP-glucosa es el bloque funcional de la celulosa que se sintetiza y deposita en la pared celular de la planta. El gen SuSy desvelado en el presente documento se expresa

preferentemente en el cámbium/xilema de *Populus* sp, aunque en otros tejidos pueden observarse niveles de expresión bajos (FIG. 2).

- 5 El gen TUB codifica una isoforma de alfa-tubulina, una proteína globular estructural implicada en la formación de microtúbulos, que forman parte del citoesqueleto. El gen TUB desvelado en el presente documento se expresa preferentemente en el cámbium y/o xilema de *Populus* sp, aunque en otros tejidos pueden observarse niveles de expresión bajos (FIG. 2).
- 10 El gen ARAB codifica una isoforma de proteína arabinogalactánica, miembro de una gran familia de glucoproteínas asociadas a la pared celular de las plantas de función desconocida. El gen ARAB desvelado en el presente documento se expresa preferentemente en el cámbium/xilema de *Populus* sp, aunque en otros tejidos pueden observarse niveles de expresión bajos (FIG. 2).
- 15 El gen COMT codifica una isoforma de ácido cafeico 3-O-metiltransferasa implicado en la metilación tanto del ácido cafeico como del ácido 5-hidroxiferúlico. Estos son compuestos intermedios de la biosíntesis de lignina. El gen COMT desvelado en el presente documento se expresa preferentemente en el cámbium/xilema de *Populus* sp, aunque en otros tejidos pueden observarse niveles de expresión bajos (FIG. 3).
- 20 El gen CAD codifica una isoforma de cinamil alcohol deshidrogenasa, una enzima que cataliza la etapa final en la síntesis de monolignoles, transformando de este modo los cinamaldehídos en sus alcoholes correspondientes. El gen CAD desvelado en el presente documento se expresa preferentemente en el cámbium/xilema de *Populus* sp, aunque en otros tejidos pueden observarse niveles de expresión bajos (FIG. 3).
- 25 El gen C4H codifica una isoforma de cinamato 4-hidroxilasa, un miembro de la superfamilia de monooxigenasas del citocromo P450 implicado en la catálisis de la primera reacción oxidativa en el metabolismo de los fenilpropanoides, en concreto, en la transformación del ácido trans-cinámico en ácido p-coumárico. El gen C4H desvelado en el presente documento se expresa preferentemente en el cámbium/xilema de *Populus* sp, aunque en otros tejidos pueden observarse niveles de expresión bajos (FIG. 3).
- 30 El gen CCR codifica una isoforma de cinamoil CoA reductasa, que cataliza la transformación de ésteres de cinamoil CoA en sus cinamaldehídos correspondientes, la primera etapa específica en la síntesis de monómeros de lignina. El gen CCR desvelado en el presente documento se expresa preferentemente en el cámbium/xilema de *Populus* sp, aunque en otros tejidos pueden observarse niveles de expresión bajos (FIG. 3).
- 35 El gen F5H codifica una monooxigenasa dependiente de P450 que cataliza la hidroxilación de ácido ferúlico en una biosíntesis dirigida hacia ácido sinápico y siringil lignina. El gen F5H desvelado en el presente documento se expresa preferentemente en el cámbium/xilema de *Populus* sp, aunque en otros tejidos pueden observarse niveles de expresión bajos (FIG. 3).
- 40 El gen SAD codifica una sinapil alcohol deshidrogenasa que actúa como mediadora en la reducción de sinapaldehído en siringil monolignoles en angiospermas. El gen SAD gene desvelado en el presente documento se expresa preferentemente en el cámbium/xilema de *Populus* sp, aunque en otros tejidos pueden observarse niveles de expresión bajos (FIG. 3).
- 45 El gen UDP codifica la enzima UDP-D-glucuronato carboxi-liasa implicada en la degradación de UDP-D- glucuronato en UDP-D-xilosa y CO<sub>2</sub>. El gen UDP desvelado en el presente documento se expresa preferentemente en el cámbium/xilema de *Populus* sp, aunque en otros tejidos pueden observarse niveles de expresión bajos (FIG. 3).
- 50 El gen LTP codifica una isoforma de proteína de transferencia de lípidos, un miembro de una familia que se piensa que participa en la formación de cutina, embriogénesis, reacciones de defensa contra fitopatógenos, simbiosis, y en la adaptación de las plantas a diversas condiciones ambientales. El gen LTP desvelado en el presente documento se expresa preferentemente en el cámbium/xilema de *Populus* sp, aunque en otros tejidos pueden observarse niveles de expresión bajos (FIG. 3).
- 55 El gen AG13 codifica una proteína ag-13 de función desconocida, cuya expresión se ha asociado con el proceso de maduración en diversas especies de plantas. El gen AG13 desvelado en el presente documento se expresa preferentemente en el cámbium/xilema de *Populus* sp, aunque en otros tejidos pueden observarse niveles de expresión bajos (FIG. 3).
- 60 Las secuencias promotoras preferidas de cámbium/xilema descritas en el presente documento dirigen la expresión de secuencias de nucleótidos unidas operativamente de una manera preferida de cámbium/xilema. El Ejemplo 4 ilustra la expresión del gen indicador GUS en el complejo de vasos/fibras del cámbium/xilema de *Arabidopsis thaliana* transformado con una construcción que contiene el gen indicador GUS unido operativamente a dos promotores preferidos de cámbium/xilema de la invención, es decir, los promotores TUB (SEQ ID NO.: 2) y C4H (SEQ ID NO.: 6). El ejemplo 4 también resume resultados que muestran la expresión del gen indicador GUS en plantas de *Arabidopsis* transformadas con construcciones que contienen el gen indicador GUS unido operativamente
- 65

a cada una de las secuencias promotoras desveladas en el presente documento. Por tanto, las secuencias promotoras preferidas de cámbium/xilema desveladas en el presente documento pueden usarse para expresar una secuencia de interés unida operativamente en el cámbium y/o en el xilema. Por tanto, pueden usarse promotores preferidos de cámbium/xilema para mejorar la calidad de la madera de los árboles, bien aumentando la síntesis de celulosa o disminuyendo la síntesis de lignina. “Disminuyendo la síntesis de lignina” significa disminuir el contenido total de lignina de los árboles leñosos de entre cualquiera de 1-90 %, preferentemente entre aproximadamente 80-90 % con respecto al contenido de lignina en plantas normales cultivadas en campos. “Aumentando la síntesis de celulosa” significa aumentar el contenido total de celulosa de árboles leñosos en 1,90 %, preferentemente entre aproximadamente 80-90 %, en comparación con plantas normales cultivadas en campos.

Además, los promotores preferidos de cámbium/xilema pueden usarse para inhibir la expresión de genes implicados en el metabolismo del xilema en desarrollo. La inhibición de dichos genes disminuye la concentración de lignina y/o cambia la relación entre guayacilo y siringilo, los bloques funcionales de las ligninas. La composición monomérica de las ligninas es una característica importante desde el punto de vista industrial, porque las ligninas ricas en unidades siringilo se degradan más fácilmente durante el proceso de pulpeo, ya que contienen enlaces de carbono 5-5' menos fuertes. Por tanto, la determinación de la proporción de siringilo con respecto a guayacilo (S/G) es útil en la evaluación de la calidad de la madera para la producción de celulosa y la fabricación de papel (Boudet et al., 1998). “El cambio de la relación entre siringilo y guayacilo” se refiere a aumentar la proporción de siringilo/guayacilo en 1-90 %, preferentemente de aproximadamente 80-90 % en comparación con plantas normales cultivadas en campos.

Otras moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento son variantes y/o fragmentos de las secuencias promotoras preferidas de cámbium/xilema, tales como las que codifican fragmentos, análogos o derivados de secuencias promotoras preferidas de cámbium/xilema nativas desveladas en el presente documento. Dichas variantes y/o fragmentos pueden ser, por ejemplo, variantes de origen natural de secuencias promotoras preferidas de cámbium/xilema, o variantes de origen no natural de secuencias promotoras preferidas de cámbium/xilema. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos de dichas variantes y/o fragmentos puede incluir delecciones, adiciones y/o sustituciones de uno o más nucleótidos en comparación con las secuencias promotoras nativas preferidas de cámbium/xilema. Dichas variantes y/o fragmentos puede conservar la actividad biológica y por tanto conducir, de una manera preferida de cámbium/xilema, la expresión de secuencias de nucleótidos unidas operativamente. Los fragmentos de secuencias promotoras preferidas de cámbium/xilema comprenden de aproximadamente 10, a aproximadamente 4.000 nucleótidos o hasta el número de nucleótidos en las secuencias promotoras preferidas de cámbium/xilema de longitud completa desveladas en el presente documento, tal como los 700-3.500 nucleótidos de las SEQ ID NOS.: 1-12.

Por “variantes” se entiende la inclusión de secuencias sustancialmente similares. Las “variantes” de origen natural y no natural de secuencias promotoras preferidas de cámbium/xilema, son moléculas de ácido nucleico que tienen una identidad de secuencia de al menos 65 % con las secuencias promotoras preferidas de cámbium/xilema nativas desveladas en el presente documento, es decir, SEQ ID NOS.: 1-12. Las “variantes” también incluyen moléculas de ácido nucleico que hibridan en condiciones rigurosas, como se define en el presente documento, con las secuencias de ácido nucleico promotoras preferidas de cámbium/xilema de SEQ ID NOS.: 1-12 o con el complemento de las secuencias de SEQ ID NOS.: 1-12. Por ejemplo, dichas “variantes” pueden ser moléculas de ácido nucleico que hibridan con la secuencia de SEQ ID NOS.: 1-12 o con el complemento de las secuencias de SEQ ID NOS.: 1-12 en condiciones de rigurosidad baja, en condiciones de rigurosidad moderada, o en condiciones de rigurosidad alta. Como alternativa, dichos ácidos nucleicos son los que tienen una secuencia de nucleótidos que es el complemento de la longitud completa o de partes de las secuencias de SEQ ID NOS.: 1-12. Otras variantes de secuencias promotoras preferidas de cámbium/xilema descritas en el presente documento son polinucleótidos que comparten una identidad de secuencia de al menos 65 %, preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 90 %, y lo más preferentemente al menos 95 %, con las secuencias de SEQ ID NOS.: 1-12 o el complemento de las secuencias de SEQ ID NOS.: 1-12.

Las “condiciones rigurosas”, como las usadas en el presente documento, se refieren a los parámetros expuestos anteriormente.

Para los fines de la presente invención, la identidad de secuencia de cualquiera de las secuencias promotoras desveladas en el presente documento se realiza preferentemente usando metodologías conocidas en la técnica tales como el programa BLAST, o cualquier programa de alineamiento de secuencias que permita el alineamiento de nucleótidos idénticos y la verificación de emparejamientos erróneos entre nucleótidos no idénticos de manera que pueda calcularse el porcentaje de identidad de las secuencias comparadas.

Los promotores preferidos de cámbium/xilema descritos en el presente documento pueden usarse para expresar un gen de interés. Por ejemplo, usando promotores preferidos de cámbium/xilema, la expresión de genes nativos y/o no nativos podría regularse en los tejidos del cámbium y/o xilema de una planta, alterando de este modo el contenido de celulosa, el contenido lignina, la resistencia a patógenos o a insectos, el desarrollo y calidad de la madera, y similares, de la planta:

Los genes nativos y/o no nativos incluyen aquellas enzimas codificantes, transportadores; cofactores, factores de la transcripción y diversos otros genes que afectarían a la deposición de celulosa y/o lignina en la planta o a la resistencia a patógenos o a insectos.

- 5 Para la presente invención, los “genes de interés” incluyen aquellos que están implicados en el metabolismo de la celulosa y de la lignina. Se reconoce que cualquier gen de interés puede estar unido operativamente al promotor de la invención y expresarse en los tejidos del cámbium y/o xilema de la planta.

10 Cuando los promotores preferidos de cámbium/xilema de la presente invención están unidos operativamente a un gen de interés e incorporados de manera estable en el genoma de una planta, dirigen la expresión preferida de cámbium y/o xilema de dicho gen de interés. Se entiende que, la expresión preferida de cámbium y/o xilema significa que la expresión del gen de interés es más abundante en el cámbium y/o en el xilema, aunque en otros tejidos de la planta puede aparecer algún nivel de expresión del gen de interés. El cámbium incluye cualquier parte del tejido del cámbium o procámbium en cualquier órgano de la planta, incluyendo, pero sin limitación, la raíz, brote, tallo, madera, 15 hoja, peciolo y similares. Xilema significa cualquier parte del tejido del xilema, incluyendo pero sin limitación, traqueidas, elementos traqueales, vasos, fibras anastomosadas y médula. Algunos de los promotores desvelados en el presente documento pueden dirigir, de forma perceptible, la expresión de genes, al xilema secundario en lugar de al xilema primario.

20 Las construcciones que contienen los promotores preferidos de cámbium/xilema desvelados en la presente invención y un gen de interés unido operativamente, pueden proporcionarse en casetes de expresión como se representa en las figuras. Dichos casetes de expresión comprenden el promotor preferido de cámbium/xilema de la presente invención, o variantes o fragmentos del mismo, unido operativamente a un gen de interés cuya expresión se dirige al cámbium y/o xilema. Dicho casete de expresión puede contener sitios de restricción para la inserción del 25 gen de interés bajo el control transcripcional de los promotores preferidos de cámbium/xilema. El casete de expresión puede contener adicionalmente diversas otras secuencias de ácido nucleico, incluyendo genes marcadores de selección; secuencias de inicio de la transcripción y de la traducción y una secuencia de terminación de la transcripción y la traducción de la planta. La región de terminación puede ser nativa con la secuencia de ADN de interés o puede ser la del plásmido Ti de *A. tumefaciens*, tales como las regiones terminadoras de la octopina sintasa y de la nopalina sintasa (Gielen et al., EMBO J., 3:835-846 (1984), Depicker et al., Mol. y Appl. Genet., 30 1:561-573 81982))

En los casetes de expresión pueden incluirse genes indicadores o genes marcadores de selección. Pueden encontrarse ejemplos de genes indicadores adecuados conocidos en la técnica, por ejemplo, en Jefferson et al. 35 (1991) en Plant Molecular Biology Manual, ed. Gelvin et al. (Kluwer Academic Publishers), pág. 1-33. Los genes marcadores de selección para la selección de células o tejidos transformados pueden incluir genes que confieren resistencia a herbicidas. Los ejemplos de genes marcadores de selección adecuados incluyen, pero sin limitación, genes que codifican resistencia a sulfonamida (Guerineau et al. (1990) Plant Mol. Biol. 15:127-136), bromoxinil (Stalker et al. (1988) Science 242:419-423), glifosato (Shaw et al. (1986) Science 233:478-481) y a fosfinitricina (DeBlock et al. (1987) EMBO J. 6:2513-2518).

Los casetes de expresión de la presente invención, unidos operativamente a un gen de interés, son útiles para la transformación de diversas plantas. Dichas plantas, incluyen, pero sin limitación, especies de *Eucalyptus* (*E. alba*, *E. 45 albens*, *E. amygdalina*, *E. aromaphloia*, *E. baileyana*, *E. balladoniensis*, *E. bicostata*, *E. botryoides*, *E. brachyandra*, *E. brassiana*, *E. brevistylis*, *E. brockwayi*, *E. camaldulensis*, *E. ceracea*, *E. cloeziana*, *E. coccifera*, *E. cordata*, *E. cornuta*, *E. corticosa*, *E. crebra*, *E. croajingolensis*, *E. curtisii*, *E. dalrympleana*, *E. deglupta*, *E. delegatensis*, *E. delicata*, *E. diversicolor*, *E. diversifolia*, *E. dives*, *E. dolichocarpa*, *E. dundasii*, *E. dunnii*, *E. elata*, *E. erythrocorys*, *E. erythrophloia*, *E. eudesmoides*, *E. falcata*, *E. gamophylla*, *E. glaucina*, *E. globulus*, *E. globulus subsp. bicostata*, *E. globulus subsp. globulus*, *E. gongylocarpa*, *E. grandis*, *E. grandis x urophylla*, *E. guilfoylei*, *E. gunnii*, *E. hallii*, *E. houseana*, *E. jacksonii*, *E. lansdowneana*, *E. latisinensis*, *E. leucophloia*, *E. leucoxydon*, *E. lockyeri*, *E. lucasii*, *E. maidenii*, *E. marginata*, *E. megacarpa*, *E. melliodora*, *E. michaeliana*, *E. microcorys*, *E. microtheca*, *E. muelleriana*, *E. nitens*, *E. nitida*, *E. obliqua*, *E. obtusiflora*, *E. occidentalis*, *E. optima*, *E. ovata*, *E. pachyphylla*, *E. pauciflora*, *E. pellita*, *E. perriniana*, *E. petiolaris*, *E. pilularis*, *E. piperita*, *E. platyphylla*, *E. polyanthemos*, *E. populnea*, *E. preissiana*, *E. pseudoglobulus*, *E. pulchella*, *E. radiata*, *E. radiata subsp. radiata*, *E. regnans*, *E. risdonii*, *E. robertsonii*, *E. 55 rodwayi*, *E. rubida*, *E. rubiginosa*, *E. saligna*, *E. salmonophloia*, *E. scoparia*, *E. sieberi*, *E. spathulata*, *E. staeri*, *E. stoatei*, *E. tenuipes*, *E. tenuiramis*, *E. tereticornis*, *E. tetragona*, *E. tetradonta*, *E. tindaliae*, *E. torquata*, *E. umbra*, *E. urophylla*, *E. vernicosa*, *E. viminalis*, *E. wandoo*, *E. wetarensis*, *E. willisii*, *E. willisii subsp. falciformis*, *E. willisii subsp. willisii*, *E. woodwardii*), especies de *Populus* (*P. alba*, *P. alba x P. grandidentata*, *P. alba x P. tremula*, *P. alba x P. tremula var. glandulosa*, *P. alba x P. tremuloides*, *P. balsamifera*, *P. balsamifera subsp. trichocarpa*, *P. balsamifera subsp. trichocarpa x P. deltoides*, *P. ciliata*, *P. deltoides*, *P. euphratica*, *P. euramericana*, *P. kitakamiensis*, *P. lasiocarpa*, *P. laurifolia*, *P. maximowiczii*, *P. maximowiczii x P. balsamifera subsp. trichocarpa*, *P. nigra*, *P. sieboldii*, *P. grandidentata*, *P. suaveolens*, *P. szechuanica*, *P. tomentosa*, *P. tremula*, *P. tremula x P. tremuloides*, *P. tremuloides*, *P. wilsonii*, *P. canadensis*, *P. yunnanensis*) y coníferas, tales como, por ejemplo, pino del lodazal (*Pinus taeda*), pino del inciado (*Pinus elliotii*), pino ponderosa (*Pinus ponderosa*), pino lodgepole (*Pinus contorta*) y pino Monterey (*Pinus radiata*); abeto de Douglas (*Pseudotsuga menziesii*); cicuta occidental (*Tsuga canadensis*); abeto Sitka (*Picea glauca*); secuoya (*Sequoia sempervirens*); abeto verdadero, tal como abeto de navidad (*Abies amabilis*)

y abeto balsámico (*Abies balsamea*); y cedros tales como cedro rojo occidental (*Thuja plicata*) y cedro amarillo de Alaska (*Chamaecyparis nootkatensis*).

Los casetes de expresión pueden incorporarse de manera estable en los genomas de las plantas mediante transformación mediada por *Agrobacterium* (Fraley et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80:4803-4807) o mediante el método biobalístico (Klein et al. (1987) Nature. 327:70-73).

Todos los términos técnicos que se utilizan en el presente documento son términos comúnmente usados en bioquímica, biología molecular y agricultura, y un experto habitual en la materia, a la cual pertenece la presente invención, los conoce. Estos términos técnicos pueden encontrarse en: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª ed., vol. 1-3, ed. Sambrook y Russel, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 2001; Current Protocols in Molecular Biology, ed. Ausubel et al., Greene Publishing Associates y Wiley-Interscience, Nueva York, 1988 (con actualizaciones periódicas); Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, 5th ed., vol. 1-2, ed. Ausubel et al., John Wiley y Sons, Inc., 2002; Genome Analysis: A Laboratory Manual, vol. 1-2, ed. Green et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1997. En el presente documento se describen métodos que implican técnicas de biología vegetal y se describen con detalle en tratados de metodología, tales como Methods in Plant Molecular Biology: A Laboratory Course Manual, ed. Maliga et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1995. Se describen diversas técnicas que usan PCR, por ejemplo, en Innis et al., PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, San Diego, 1990 y en Dieffenbach y Dveksler, PCR Primer: A Laboratory Manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2003. Los pares de cebadores de PCR pueden proceder de secuencias conocidas usando programas informáticos diseñados para ese propósito (por ejemplo, Primer, versión 0.5, 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA). Se analizan métodos de síntesis química de ácidos nucleicos, por ejemplo, en Beaucage y Caruthers (1981) Tetra. Lett. 22:1895-1862 y en Matteucci y Caruthers (1981) J. Am. Chem. Soc. 103:3185.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos específicos. Los ejemplos se proporcionan únicamente como ilustración y no debe considerarse que limitan, de ningún modo, el ámbito o contenido de la invención.

#### EJEMPLO 1

Perfil de expresión de genes que se expresan preferentemente en el Cábium/Xilema

Las etiquetas de secuencia expresada (EST) de *Populus* sp se agruparon usando el programa CAP3 (Huang and Madan (1999) Genome Res. 9:868-877). Dichas EST se obtuvieron de bibliotecas que representaban los siguientes tejidos: brote apical, corteza, cámbium, semilla, xilema, hoja y raíz. El conjunto de grupos así generados se investigó para los grupos compuestos por al menos el 90 % de las EST de bibliotecas que representaban tejidos de xilema y cámbium de *Populus*. Se seleccionaron 12 grupos basándose en su nivel de expresión alto y preferido en el cámbium y/o xilema de *Populus*. Después, se realizó una búsqueda con BLASTX frente a la base de datos del GenBank no redundante con cada uno de los doce grupos, y se llegó a la conclusión de que representaban secuencias expresadas de los siguientes genes: sacarosa sintasa (SuSy), alfatubulina (TUB), proteína arabinogalactánica (ARAB), ácido cafeico 3-O-metiltransferasa (COMT), cinamil alcohol deshidrogenasa (CAD), cinamato 4-hidroxilasa (C4H), cinamoil CoA reductasa (CCR), ferulato-5-hidroxilasa (F5H), sinapil alcohol deshidrogenasa (SAD), UDP-D-glucuronato carboxi-liasa (UDP), proteína de transferencia de lípidos (LTP) y ag-13 (AG13). Las Figuras 2 y 3 muestran el perfil de expresión en diversos tejidos de *Populus* para cada uno de los grupos que representan los genes cuyos promotores se desvelan en el presente documento. La serie de histogramas en las Figuras 2 y 3 representan finalmente la abundancia relativa de cada gen en genotecas de ADNc que representan los tejidos anteriormente mencionados (brote apical, corteza; cámbium, semilla, xilema, hoja y raíz). Por tanto, los histogramas componen un conjunto de datos de expresión digitales que es una aproximación del nivel de expresión relativa de los doce genes cuyos promotores se desvelan en el presente documento.

#### EJEMPLO 2

Aislamiento de secuencias promotoras

Se realizó BLASTN para cada uno de los doce grupos frente a las secuencias genómicas de *Populus trichocarpa* disponibles en el Joint Genome Institute US Department of Energy como parte del "Proyecto de Secuenciación del Genoma de *Populus*" (<http://genome.jgi-psf.org/poplar0/poplar0.info.html>). Las regiones de nucleótidos seleccionadas de cada grupo, correspondientes a supuestos exones, se usaron como secuencias conductoras en la recuperación de lecturas de secuencia genómica que comprendían la región de inicio de la transcripción y secuencias promotoras aguas arriba adyacentes. Estas lecturas genómicas se ensamblaron usando el programa PHRAP (Gordon et al. (1998) Genome Res. 8:195-202) para obtener un cóntigo que incluía aproximadamente de 700 a 3.500 nucleótidos de la supuesta región promotora aguas arriba desde el punto de inicio de la transcripción (+1 nucleótido, que correspondía al inicio del ARNm respectivo). Se llegó a la conclusión de que estos cóntigos, que contenían las regiones promotoras de cada uno de los genes que codifican los ARNm representados por los doce



## ES 2 584 316 T3

grupos, se expresaban preferentemente en los tejidos del cámbium y/o xilema de *Populus*. Estas doce regiones promotoras corresponden a las secuencias desveladas en el presente documento como SEQ ID NOS: 1-12.

Para el aislamiento de regiones promotoras específicas, se diseñaron pares de promotores específicos de genes (normalmente de una longitud de 30 nt) de las secuencias de los cóntigos promotores descritos anteriormente, para ampliar por PCR un fragmento de 700 a 3.500 nucleótidos desde la región promotora de cada uno de los doce genes cuyas secuencias promotoras se desvelan en el presente documento. La primera ronda de PCR se realizó sobre una muestra de ADN genómico de *Populus deltoides* o *P. trichocarpa*, que se preparó de hojas usando el método de extracción del bromuro de cetil-trimetil amonio (CTAB) (Aldrich y Cullis (1993) Plant Mol. Biol. Report. 11:128-141). Los cebadores se diseñaron para amplificar la región aguas arriba de la región codificante, es decir, la región no traducida 5' y la región promotora del gen seleccionado. A continuación se ofrecen las secuencias de los cebadores usados para cada promotor:

sacarosa sintasa (SuSy)

5'- GCCATAGCTCCTTAAGAGAAACAGAAAGCAA -3' (SEQ ID NO: 13)  
5'- CAATATAGAATCAATGAACAGCACTAGTTTGC -3' (SEQ ID NO: 14)  
5'- TCATGTCCTATCCAACGGCG - 3' (SEQ ID NO: 15)

alfatubulina (TUB)

5'- CTCATTTTCTCTCAAAGCTCAAAG -3' (SEQ ID NO: 16)  
5'- GACAACCTAGTCTAAAGTTAAACTTAGACC -3' (SEQ ID NO: 17)  
5'- CCCTGGAGGTTGGGGTGAGT - 3' (SEQ ID NO: 18)

proteína arabinogalactánica (ARAB)

5'- GCGTTCATCTACAAAACCCCTCCTCC -3' (SEQ ID NO: 19)  
5'- TTCATCCTTATTTTTTGGGATA -3' (SEQ ID NO: 20)  
5'- CAAAGGATCATGGAGTTGGA - 3' (SEQ ID NO: 21)

ácido cafeico 3-O-metiltransferasa (COMT)

5'- TATACTAATATGACCTAATAACTTAGAAGTGTGG -3' (SEQ ID NO: 22)  
5'- CATCTTGATCAAGATTGAATTC -3' (SEQ ID NO: 23)  
5'- CATAATATCAAACTTAAGC - 3' (SEQ ID NO: 24)

cinamil alcohol deshidrogenasa (CAD)

5'- TGAATTGATGACGTAGGAAACATGATAAACATG -3' (SEQ ID NO: 25)  
5'- CATTTCCTTGAAACAATGAGGCTAAGAG -3' (SEQ ID NO: 26)

cinamato 4-hidroxilasa (C4H)

5'- GACATGAGAACTAACGTTGCTTGAATTC -3' (SEQ ID NO: 27)  
5'- CATAATATTGGAAGTGGTTTCTTTGTCAGAAAG -3' (SEQ ID NO: 28)

cinamoil CoA reductasa (CCR)

5'- GCGCTCGGGTTGTCACCATAGTTTC -3' (SEQ ID NO: 29)  
5'- CATGTTGTTATATTTAGATAAATGTA -3' (SEQ ID NO: 30)

ferulato-5-hidroxilasa (F5H)

5'- TTCATCAAGCAATAATAATAAGGTGAGGC -3' (SEQ ID NO: 31)  
5'- CATGGATGCAGATTTTTGTGTTTGTG -3' (SEQ ID NO: 32)  
5'- TTCAGTGAACATGCTGCCACAATGAC - 3' (SEQ ID NO: 33)

## ES 2 584 316 T3

sinapil alcohol deshidrogenasa (SAD)

5'- AATCGAAACCGATCGATTTGAACTGG -3' (SEQ ID NO: 34)

5'- CATGGTGCTTGCTTCAGATAG -3' (SEQ ID NO: 35)

5 UDP-D-glucuronato-carboxi-liasa (UDP)

5'- GGAAATGTCAACACTTGTGTGACCACAC -3' (SEQ ID NO: 36)

5'- GACATTCTTGCCAATTTCTGAA -3' (SEQ ID NO: 37)

10 proteína de transferencia de lípidos (LTP)

5'- GGAGCCTCCATATTTCTGTATCTC -3' (SEQ ID NO: 38)

5'- CAAGACGATGAAATGAAGAACTGATAGC -3' (SEQ ID NO: 39)

ag-13 (AG13)

5'- GACATTCCTTGACTTAATATGATGCT -3' (SEQ ID NO: 40)

15 5'- GAATTCGCATCCATGCGGTGAGTTCG -3' (SEQ ID NO: 41)

La PCR se realizó usando reactivos disponibles en el comercio y los parámetros de ciclo de 5 minutos a 94 °C seguido de 35 ciclos de 94 °C durante 1 minuto, después una temperatura de hibridación modificada, como se describe más adelante durante un minuto, después 72 °C durante 3 minutos. La temperatura (T) de hibridación se ajustó para cada par de cebadores y varió de 50 °C a 59 °C. Finalmente, las muestras se mantuvieron a 72 °C durante 7 minutos, después a 4 °C hasta análisis posterior. Diez µl de cada uno de los fragmentos de ADN amplificados resultantes se procesaron en un gel de agarosa al 0,8 %, se purificaron usando el kit de Purificación de gel GFX (Amersham), se subclonaron en el vector pGEM-T-Easy (Promega) y después en sitios EcoRI y BglIII del vector pAPROM-ATG. Las secuencias finales se determinaron en los plásmidos resultantes. La Figura 1 ilustra esquemáticamente el casete de expresión pAPROM-ATG que comprende el gen GUS unido operativamente a un promotor desvelado en el presente documento. La Figura 4 ilustra esquemáticamente el vector plasmídico que comprende un gen de interés unido operativamente a un promotor de la invención.

### 30 EJEMPLO 3

#### Transformación de plantas de *Arabidopsis*

Usando un protocolo de transformación mediado por *Agrobacterium tumefaciens* (Bechtold et al., (1993) C. R. Acad. Sci. Paris 316:1194-1199; Bent et al., (1986) Mol. Gen. Genet. 204:383-396) se transformaron plantas de *Arabidopsis thaliana* Columbia con construcciones individuales que contenían uno cualquiera de los promotores de la invención unido operativamente a un gen de interés. Las construcciones también contenían el gen marcador de selección *Bar* que confiere resistencia a análogos de fosfotricina herbicida como glufosinato de amonio (Thompson et al. (1987) EMBO J. 9:2519-2523). En este ejemplo, el gen de interés unido operativamente a los promotores preferidos de cámbium/xilema de la invención es el gen indicador GUS que codifica la enzima beta-glucuronidasa (GUS) (Jefferson (1987) Plant Mol. Biol. Rep. 5: 387-405) que posibilita la inspección visual del fenotipo deseable, es decir, la expresión de GUS de una manera preferida de cámbium/xilema.

Se sembraron semillas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia en macetas que contenían vermiculita. Las plantas se cultivaron en un régimen de oscuridad/luz de 16/8 horas a 22 °C. Después de 4-5 semanas, las plantas se transformaron con la cepa GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens* de acuerdo con Bent et al., (1986) Mol. Gen. Genet. 204:383-396; que lleva el vector plasmídico que comprende el gen de interés unido operativamente a cada uno de los promotores descritos en el presente documento.

Para la transformación de la planta, 1 litro de medio LB que contenía rifampicina, gentamicina y kanamicina se inoculó con una alícuota de cultivo iniciador de *Agrobacterium* durante una noche. Después, el cultivo se dejó crecer durante una noche a 28 °C en un agitador rotativo, hasta que la DO600 fue  $\geq 8,0$ . La *Agrobacterium* se precipitó por centrifugación y el sedimento bacteriano se resuspendió en ~300 ml de sacarosa al 5 % y Silwet L-77 al 0,03 %. Esta suspensión de *Agrobacterium* se pulverizó sobre las plantas. Las macetas se colocaron en una bandeja que se cubrió con una envoltura de plástico para mantener la humedad y las plantas se dejaron crecer bajo el régimen anterior para madurar y asentar las semillas.

Las semillas se recogieron y la superficie se esterilizó con una solución que contenía lejía 50 % y Tritón X-100 al 0,02 % durante 7 minutos. Después, las semillas se lavaron 3 veces con agua destilada estéril y se sembraron en placas en medio MS que contenía 6 mg/l de Finale como agente de selección. Después de 5 a 7 días, los

transformantes eran visibles como plantas verdes. Las plantas transformadas se transfirieron sobre nuevas placas de selección y después de 6-10 días se transfirieron a macetas que contenían vermiculita y se cultivaron en condiciones de 16 horas de luz/ 8 horas de oscuridad a 22 °C.

5 EJEMPLO 4

Ensayo de expresión de GUS en plantas de *Arabidopsis*

10 Tallos con inflorescencias de las plantas transformadas descritas en el Ejemplo 3 se cortaron y se tiñeron histológicamente para determinar la actividad GUS. Esquejes posteriores indujeron la formación de xilema secundario en la base de plantas que también pudieron teñirse histológicamente para determinar la actividad GUS.

15 En las Figuras 5A y 5B, se muestra la actividad de la beta-glucuronidasa en tallos en floración de plantas transgénicas de *Arabidopsis*. Estas plantas transgénicas de *Arabidopsis* se transformaron con una construcción que contenía el gen GUS unido operativamente a promotores preferidos de cámbium/xilema descritos en el presente documento, en concreto TUB (SEQ ID.:2) (A) y C4H (SEQ ID NO.:6) (B). Bandas más oscuras a lo largo del eje longitudinal del tallo (cabezas de flecha) representan haces vasculares primarios teñidos de azul después del ensayo cromogénico, indicando la funcionalidad y especificidad tisular del promotor respectivo en cada una de las líneas transgénicas.

20 La siguiente tabla resume datos del ensayo GUS obtenidos mediante el análisis de esquejes de tallos con inflorescencias de plantas de *Arabidopsis thaliana* transformadas con construcciones de expresión de acuerdo con el EJEMPLO 2 que comprendían el gen GUS bajo el control de secuencias promotoras desveladas en el presente documento. Para todos los promotores ensayados, se observó un patrón de expresión de GUS vascular. En algunos casos, la actividad de GUS fue notablemente alta en tipos específicos de células vasculares, tales como elementos de los vasos, como por ejemplo en plantas transformadas con construcciones que compendian los promotores LTP (SEQ ID NO.:11), C4H (SEQ ID NO.:6) o TUB (SEQ ID NO.:2). En otros casos, se observó un patrón vascular pero no pudo señalarse ningún tipo específico de célula como el sitio principal de expresión GUS.

Promotor	Número de eventos analizados	Total de eventos positivos a GUS	Patrón de expresión		
			Solo elementos de los vasos	Elementos de los vasos + otros tipos de células vasculares	Tipos de células no vasculares
SUSY	92	21	1	17	3
LTP	75	38	19	14	5
C4H	89	43	14	28	1
TUB	78	20	9	10	1
COMT	72	24	2	15	7
CAD	79	37	8	16	13
SAD	75	30	4	13	13
UDP	72	20	4	14	2
CCR	74	22	4	14	4

30 Otros aspectos de la invención serán obvios para los expertos en la materia y no es necesario que se repitan en este documento.

LISTADO DE SECUENCIAS

35 <110> PAPES, Fabio  
GERHARDT, Isabel Rodrigues  
ARRUDA, Paulo

40 <120> PROMOTORES PREFERIDOS DEL CÁMBIUM/XILEMA Y USOS DE LOS MISMOS

<130> 39125P EP-WO

45 <140>  
<141>

<150> US 60/560,227  
<151> 06-04-2004

50 <150> 05 714 408.1  
<151> 28-03-2005

ES 2 584 316 T3

<160> 41

<170> PatentIn version 3.2

5

<200> CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

<210> SEQ ID NO 1

<211> LONGITUD: 3035

<212> TIPO: ADN

10

<213> ORGANISMO: *Populus* sp.

<220> RASGO:

<221> NOMBRE/CLAVE: promotor

15

<222> LOCALIZACIÓN: (1)...(3035)

<223> OTRA INFORMACIÓN: Promotor de sacarosa sintasa (SUSY)

<400> SECUENCIA: 1

tcatgtocta tccaacggcg atgcaaactt cgctgtcccg cactttttca taggacgagg tgaagtttag  
70  
ctatatatct ttttttttta atttaaattg ttaattcttt atatttttat attcttttaa ttttatattt  
140  
ttatattatt ttgatatatt acatcaagaa taaattttaa aaaaataatt tttaaaattt acttaaccac  
210  
gcaatacata aaaaataata gaaccaccca acctaagaat acttgtcaat gcatagaagt acacctgcta  
280  
gttcttaaaa ccaacaaaag gaagcaaagt agatctctga gtcaaaaacc agaggaaacc atagaaacac  
350  
ataataataa taataataat aataataata aaattaattt aacttggtgt aataataaaa ttaatttaat  
420  
tacaagaggt gtaactcaac tagtcatggt ctaaatttat tctctagaga ttactagttt gagttttaca  
490  
aattttaagg ccaactgaaga tttatatagt cattaatttc agaatatata agattagttg agttacgtat  
560  
aaattgatta aaaaatcata ttaataaaaa taaaaaatt aatttaaagg ttaagaaat caaattaaga  
630  
gaaaagagtg gtgttttatt tttcatcgtg ccctctctca acagacaagt agaagatga gagagagagg  
700  
gtaaagaaat ggatttatga gaacattgac cacagggaaa gagagaagcg gttttgtgaa aggaacaatg  
770  
aaaccacagg aaggtaaagc ggtaatgata tttttcacga atactaaaac tagaacaaca agttttttaa  
840  
tcaaattaaa ccacgagtg c aaggcctct tctctgtgta taaaagggtc cttcttcttt ctcatttccc  
910  
attctcatct gcaaacttct cctttgcaat ctttctttct tgcgttctgt gtgttctgtg tgatttctgt  
980  
tcattcttct tgtctattag cttgtccccc cgtccgactg ctttctgtat ttattctggc ataaagotta  
1050  
aggtaaagat ccctcaacta tccaagcaa tttattctgt ttttatgtga tcttgaggga tcttctctt  
1120

20

ggatgogott tttatttttt cttcctcctt cttcctgctc cttottaact tgtatctgat cccccagacg  
 1190  
 aaaatgtttt ttgttttttt aattagctca acaaatcaaa aacattcaca taataacaca gctogaaaga  
 1260  
 aatctgatac agttttaatc tgttgatttt taaaaatcat tacagttcat gcatgctgat actttaccat  
 1330  
 gtcataaagt taaatcccag catccttttc catagccaaa gaaggatcag cagcatgctg atagtttacc  
 1400  
 atgtcatgaa attaaatccc agcatccttt tccatagcca aagaaagatc agcagcatgc ttgcttatac  
 1470  
 aagggtttcg cttgcttatac aaggccaactg aaacatcatc atcgtcataa ctatgataga acccgccatc  
 1540  
 tgccggcatt gaaaacatca tcactagtgt ctctacatta aaaaacaccc actgtctaata ttcctatttt  
 1610  
 tttactctta aatgtcttt cggcttgagc tcctcgggct ccacggatgg caactgctgt attatatata  
 1680  
 tatatatata tatatatata tatatatata tatatatata tatatatata tatatttccc tgttggtctac  
 1750  
 atagacctgt taataccgta taaatagata atattaatat atagaattca tgtatctttc cgagattaag  
 1820  
 cgatgcogta taaataatat taatatcttt gaatcagtat gtatattaat taaaattaat ttttttcaaa  
 1890  
 gtaattttta gagcgcattt tcaacatoca tttagttttt ttttaataat aatctctctt ttgcattaat  
 1960  
 cctaacgttt gaacttagta aattaaaaaa aggaaaatac ctttttcacc aatatagaat caatgaacag  
 2030  
 cactagtttg cttgaaataa aaataaaaaat aaaatctaata aagacatttc gaaatcatcc ttatccgcaa  
 2100  
 atcactacat tagtatagta tcttgaaaga taagcaagga tcatgcaagt ttataataat taaacttaa  
 2170  
 acgtactatg acgtgtgcat cattcattca ttctgcatga aactctccac aagtctagcc tttgcatcat  
 2240  
 tcattctact tcattttatt ttttctctta atgggttctga ttgatttttc tttcttagag tctggtcttt  
 2310  
 tagttcaact ttacatgttt taggctcgtta ttttgagaga aaaaaaagaa aaaagtatgc agatcatgat  
 2380  
 totgcaaaat actgaactag tgttctgatg aattaacatg tagcatgtat aatgctggaa gaactaaaga  
 2450  
 gcagttgggc tgccatgacc aaaagaaact tcgactgatt ataaatgtca aaacttgggc ccattctttg  
 2520  
 gtttctgtct gttgttttat gccatggcaa aactctgctt atttttcaac gtccaacgtc aaatgggaga  
 2590  
 ggtttaaatt ctattgttat gtctaaacca cgtgggttgt atctatatct gaccgaacat tcaagctttt  
 2660  
 ggtattccac aagaagggtt ttctctcttc tttcttttca taattgtaat gtgtttaatt tgtttcttgc  
 2730  
 ccaataatct tctctgcttc aaactaactt taattgttgc atctcttgcg ttattttaga catgtgcaat  
 2800  
 cacctttcac tgttgaaaaa atgggttggg aggtgaggtg gtaggttttg aagtcttcta gaataatgtg  
 2870  
 gtttctctgt tgctcttgac ttcttcttgt agatcatttc tggctggcta agctatccat accccccgcg  
 2940  
 ccctacaaat aatattgagt tgttgctggt ctttaattcct attatctggt attactccca ctgattgctt  
 3010  
 tctgtttctc ttaaggagct atggc  
 3035

<200> CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

<210> SEQ ID NO 2

5 <211> LONGITUD: 2513

<212> TIPO: ADN

<213> ORGANISMO: *Populus* sp.

<220> RASGO:

10 <221> NOMBRE/CLAVE: promotor

<222> LOCALIZACIÓN: (1)...(2513)

ES 2 584 316 T3

<223> OTRA INFORMACIÓN: promotor de alfa tubulina (TUB)

<400> SECUENCIA: 2

```

cactggaggt tggggtgagt gaaataagag ggtaaataat tttttttgga ttaaaccatt caaagtgaat
70
ttttaataa aatctcatag gctgattaaa tgaaattcct ttagagtcac catacggtaa atttgatgtt
140
agtttgggtg tatagtgcaa attacttttt aattaaaga tagcaatgct tocagcatgg tggactcgtt
210
tttcaaatcg aaagctgctt cttctctctt gttttttttt tttaatcttg tttttcctaa ttcataaaaa
280
ccaatcatta tttcgcaggt caggtagtta aatttggttag gctaattgat ccagaaacct ccggaaagtc
350
aaactcaaat aaactgctga cttttttatt tttttttatt ttttgaattc taattcgtcg gactatctgg
420
tcaagataat ccacctctca tgcaataact tottagagtg ccatcatta taccctgta agttgccggt
490
gattgcacat gtttgaccac cctccctccc ctaattttca cggcggaaag gggcttgttt gggcttgttt
560
taaattataa taatagtgat gatttaaagt attttttatt taaaaatata taaaataat tttttttatt
630
ttttaaaaat ttttttaac atcaaaaaca catgaaaaca taaaaaatt gttttcattc tttttaaaaa
700
tatttttttt ctatttttat tcaatattat tatatagttt tcttattttt atttttctat taagtattat
770
taggtttttc tgtttttttt ttttaattaa aggaaataat tttttttcta ttcaatatta ttagaaattt
840
ctaatttttt ctatataaag gattttaaaa ttgtaataac attttgaca gaaatttaat gaataaaaat
910
taaattttct agatatctct tcacagttat gacattcttg gttttaattt ataataaatc gcattatcat
980
taaccctcgg ctaaattatc tatttattta tgaccatgga aacacaagtg cgtgtgtatt tggggaggtg
1050
tgggtttaaa gcctgcaata taattgaaga aaaaatttaa gaatttttcc gcgttgatga aacctgatt
1120
gaaggttggg gcatgcctca ataggcagac gggcgaacct tagaaaccag gaataaacgt gaaacacggg
1190
attcacacga atttgaaat ccacgcttgt aaagaaaacc aaaccgcata attttatttc ctatttgttt
1260
tcgctcttg tttttaaaaa atttaaattt tattttattt tttttctttt aaattaatat ttttttgata
1330
attttagatc attttaatat gctgatatca aaaataaatt ttaaaaaata aaaaaaatat attattttaa
1400
tatatttcta aataaaaaac acttcaaaaa acaattataa ccatattttc aaacaagtac tattaaaaaa
1470
gtgatggaca agagaaatca aggggtcgcg gatgcgcttc agcaatagtg aatgacaact agtctaaagt
1540
taaaacttag acctcctcgc gtaaatttta tatttatatt tttaatatta atacattaaa ataattaaaa
1610
aataatttaa aaatcattaa ttcatacaaa atttttaaag catattaaaa agagaataaa cggcaaaaac
1680
aaacctacgc taatttgtaa ataaaagatt aatctatgca cacggtatcg ttttacttca ctggctcggg
1750
taataatttc tctaacctta tgaccaaca attcactatt ttgaaacctc tgttattatt ttttttatca
1820
accattttct taatctccat ttactcatt ccagttgctt ggacagtgga catggtggcg gtgcctcttg
1890
atcttttcta gttgggccac atgaatacac ttcaagggat ttgaaactag gcctaataca ttgaaacgta
1960
gaatccactc tctaattgag aggacggccc acctcctcgg gcgacgtgcc ctctcatcca ccaggaccac
2030
cgccatcatg ccttctctgc tcttctctca cgcctcccaa cagaatgaca ttattagcct ccatcccaac
2100
tatagaccgg cagtggcaca actgcaattt cctacaacct aagacgatcc ccaaaactaa attcaaaaat

```

ES 2 584 316 T3

2170  
caaaatggag cgggcaacta accatggta aaataacgat tcggccaacc tggcaaaatc aagaattagg  
2240  
tggcttggga aacggcatca ttggcatgca cctaatttga cccgtggta aactaacct ggtagctaa  
2310  
accacacact ccctocgtcc cctaatttct ctccctctga aagtatataa accccatact cacagaccta  
2380  
aaagctcacc cctgaaattt cataggcgtc ttgataaacg ccaccctccc tcagcatcaa ttccaattgt  
2450  
ctttgcttcc gattttctct tcttttaata tctgttgatc tttgtgcttt gagagaaaat gag  
2513

<200> CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

<210> SEQ ID NO 3

5 <211> LONGITUD: 2041

<212> TIPO: ADN

<213> ORGANISMO: *Populus* sp.

<220> RASGO:

10 <221> NOMBRE/CLAVE: promotor

<222> LOCALIZACIÓN: (1)...(2041)

<223> OTRA INFORMACIÓN: promotor de la proteína arabinogalactánica (ARAB)

<400> SECUENCIA: 3

15

ES 2 584 316 T3

caaaggatca tggagttgga atccccacca tccctatttt atttgataaa aattaagcac cagggtggtgta  
 70  
 gggatctatg caagttccaa gttcaaagga cttttcactg gaagtgatat gtcagagaat aatatataaa  
 140  
 ttatttcttg gaatctcacc aatccctatt tatttgataa aaattaagta caaggtagtg cgaaacctgt  
 210  
 acaagtttta agcctaaagg gctttcactt gaagaggtgt gttagagaat aatataaatc atatcttaga  
 280  
 accttaccta acatcttaag ctattgagat gagatgattc tttgacatgg tatcagaact ttaatgacca  
 350  
 aacagtcacg agtttgaatc tcaccatccc tatttatttg ataaaaatta agcacaagat agtgtgggca  
 420  
 tgtgcaagtt tcaagcttaa ttgactttta cttgaggggt gtgtgttaga gaatgatata aatcatatct  
 490  
 tggaatctta octaataact taagttattg gattgagatg attatttgac gatcagagaa gacaaagcat  
 560  
 gcattaagga gggtagagag aaaggaaaag gaggttgacg gacaatggtg aaagcaaata tttcattaca  
 630  
 agtttttgaa gtggttggaa tcaaaatggt gttctcttta atctgtaaga ttatatatgg ttctgctgac  
 700  
 aacatttgaa tgcgaggctg aacataatgc aaaagagtag aaaatgctaa ttatcaagaa atcaggcttc  
 770  
 tgaaacagaa ctacctttac taggttatct cttgaacttc tactaaactt aatgtgaaca aatctgctgt  
 840  
 attgctctca cacaggaacc ttttaagttt octcagaatg aattttctc tagtttaagc aatcccacat  
 910  
 caggttaagt tctttctoc tgtttcaaaa ctgctggtgt tgataattag agaaaagaga gtggttagaga  
 980  
 gcataggatt gttacttta gcttgaggaa gtggattcca atcagtaaaa ttgtcgaggt tatatcacia  
 1050  
 ttttcataaa ctgaatgtga cagacgactg ccagaaaaac ccttctatga tttgctgcat tatggaggaa  
 1120  
 aatcatgggt ttgggtggaag catgatccat tcatcctagt acgtttaaca tgaataaaaag gcttgagctc  
 1190  
 tagtacagaa tcccttgcc tcaactccct catccttct cctccgcgtt catctacaaa accctcctcc  
 1260  
 accgcctttt ctttcatcct ctccatgaat aaaagactat tatgccattc aacatcatgt aaaagaacac  
 1330  
 aattcctttt acttcgaaat ggctatctta aagtttcaag acttgcgttt gcatactgca aaatcacttt  
 1400  
 tatcaatagc atgacctta cgggctcatg tacataaggt aagtgtttct tcatgaagtt gtgtaagtg  
  
 1470  
 atggtctggt gtgagatttg atttctgagc gtgcgaatct agaaaattag tgatctatca atgtctgtca  
 1540  
 aggattaagg atgtaaataat togttctttt aagctaaaag agcaaagact tggctattta cgatacaaa  
 1610  
 gtcagtttag atcgcttct taaatcttct gtcattatag atgatttgtt ttgatgttaa gaagcatgct  
 1680  
 cagctgttct gctagtgatg attcacaatc atggacatct ttatttgttg tcacagccac ttgaaatota  
 1750  
 ccttttagaa cctttttttt ttgctgctt ttccaaggaa agtagttgct gcagcattgt taaatttccc  
 1820  
 tctccattga tgaccctaca gcttttgag tgagataagg tactagcaat ctagttgtat aactaaaatt  
 1890  
 gtatattgca cctaactga tcctctgtcc actactataa aaacctcact ctatctcatc tttacacatc  
 1960  
 aaacacttta tgattgaaat caatttgcac tagtatattt gaattgtttc gagcatttta toccaaaaaa  
 2030  
 ataaggatga a  
 2041

<200> CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:  
 <210> SEQ ID NO 4  
 <211> LONGITUD: 2422  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Populus* sp.



ES 2 584 316 T3

<220> RASGO:

<221> NOMBRE/CLAVE: promotor

<222> LOCALIZACIÓN: (1)...(2422)

5

<223> OTRA INFORMACIÓN: promotor de ácido cafeico 3-O-metiltransferasa (COMT)

<400> SECUENCIA: 4

```
cataatatca aaacttaagc agatcaaatt gaaatatatt tgtaattttt atataaatta gcaactgatat
70
gtcaaaataa agacttcaaa ttcaaaactt aagtagacca aactgaaata tttttgtaat tcctatagaa
140
atcaacattg gtataccaaa ataaagagtt tagattttctg atctagcctg cagcagcaga gtaaaacaaa
210
aataaagtct gaataggaat cacgaaataa aatgaaatga agaattgcaa aatcataatt aatgaagtc
280
tgaagtttca aaatcctgac caggtataaa attaagatgc aaaaaacaaa atcttatcag aactaaagtt
350
agataatcga aagtaaagta gaatctagat ttaattaatg tattggaggg gaacaattgt tcatattcga
420
tcaaggaaat taacacctaa ttaaataaaa aggctcgaag atgagaagga cgggtgcatgg atggtcaaaa
490
aacgaagcag cagaagagaa tggctcgggtg tgcacagtca tgttaaatgt ccaaattaaa aacaaaaaaa
560
aggtttaatt atgaaaatat ttcattotta acgaatatat caaactgcca aacccccccac cggttccatt
630
tatatgggag gagtgattga tttttttatt aaactcaatt tatttataat ttaatttaa atctgattga
700
tgtcttataa taaattttaa aaaaatatat agataaaggt tgatctagtc aattcaagag tcaataatga
770
ttttatcaaa atttaattta atttttttta aaacaaaaca taattccaaa acaatggtgt ttggattttt
840
tttttaaaaa aaaacataat ccacccatgt cattaattta ccaaactcct aacacaatca tgtttaataa
910
cccttcaatt ttcaaaaata atttcagttc ttatatttat ttttatttgc aaattagtcc ttgtttgaat
980
tttcttttta gttcttatac tttacaaaaa ttatagttta tttttttatt gtgattcttt ttattataat
1050
taaggtcocct acatgctttt ttttttatgt aatgcttttt aatgtaataa atcattctga ttgtaatcat
1120
caattatata attattttga caattacata attaaatata gaaatataat aaattattac gttacatgat
```

ES 2 584 316 T3

1190  
ctattactaa gtacccaagt ctctacgtca atgttcaatt ttcagcaggt ggttctgta gaatgtcca  
1260  
tccaaaatat ggattcattg atacgatttt taagtccaaa caaccotcat attaagcaaa accctcatat  
1330  
taagcaaaaag attattatta ttattattat tattattatt tattattatt attattgttt ttgttgtgtg  
1400  
gcttcttctt tttctcaatc aacaaaattt ttaccaactt caagattttt ttttttatgg ttaaaggtat  
1470  
actaatatga cctaataact tagaagtgtg gattatagat aaaattagca attcgtgcta tatagtgggt  
1540  
tggatattta tttatataaa aaaattatat atataagttt ttttttatgc atacttgtaac aaaaaaaaa  
1610  
tataaataca aatcaaatat ttattcaatc aatgataat agaaccagat atatatgaaa ttgattaaaa  
1680  
aaaatatatc atggttaggtc aacatattag aaatactata caaaaataaa tatttatatg tatataacac  
1750  
atacaaagat tttctatagc gtgtgtttat tcagttagtt tcatttatat taactttaa atcattagtt  
1820  
ttataggatg taaatttatc ttttattaat tttaaatgtg ttcaataaat acaatcgggt gaatgtatca  
1890  
ttatgtgatt gaatatctta atctgcattt atctcttaat ttttccagtt tttttttgt tattgttaat  
1960  
gaattttttt ttatttatat aaatgattat tgatttattt aattagatgc tttatacttt aattttttat  
2030  
atataaaaaa acatattaaa acaatctata tacctgatat ttttattttt aaaaattata acccatgata  
2100  
aagaagtttt ataaacctac ctgottgaca tattacatca tgttccaata gtctccctg aaacaggtta  
2170  
aaaaaaaaaa agtttgcaa ataagacgag gaaaaatata tagaaaaaa ggtaggaggat cagttctagg  
2240  
aagaagacat ttgtgcatca agtagagagg agggaccaac cacaaggtgg ttgagcactt caccatatat  
2310  
agcaccactt tgcaacctct ttttcagtat tctcatatcc tcttcacttc ttttcttttc accttctca  
2380  
accttttggt tccttaaga attcaatctt gatcaagatg gg  
2422

<200> CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

5

<210> SEQ ID NO 5

<211> LONGITUD: 793

<212> TIPO: ADN

<213> ORGANISMO: *Populus* sp.

10

<220> RASGO:

<221> NOMBRE/CLAVE: promotor

<222> LOCALIZACIÓN: (1)...(793)

<223> OTRA INFORMACIÓN: promotor de cinamil alcohol deshidrogenasa (CAD)

15

<400> SECUENCIA: 5

ES 2 584 316 T3

ttgaattgat gacgtaggaa acatgataaa catgtaatct aaatatatct catgtctagg tcatggggtt  
70  
cacgtattag tccagottta tccaaaataa tttttttatt tgttattatt gttacottat tttttcatca  
140  
tattattaaa ttaattaaaa tttaaatcaaa acattaattt tttcttactt ttttttaaaa tataatcttc  
210  
tcttaaattt cttttttcat gtttaaaaaa atttcagtcg acggcacaac aatccagtaa ataccaaggg  
280  
tatattgtcg ccaactacca ccaactacgt caattaagca aataatataa ttaggcaact gtgtaaccac  
350  
catggaaatt aagatattcc tttcatgaaa tacttaatta gtgacgtata catgatgctc caaacctcat  
420  
cacagattca gtgttcttaa ctattatggt cccttttgtt toccaagaac catgaggttaa tcaggacct  
490  
cgatactact gaggcccccac caatgttttg atcatgtgga caatgttcac ttgattttca actttgaaga  
  
560  
aatgacccat ggttgtggaa gcagaggatg gcgccactcc atcacattc acctaccacc acccgtaaaa  
630  
tatggggagc tgtccttgtc ttttttgttg ccaagtaacc tttgccattc tttattgtgc ttttgtatat  
700  
atactcatcc atagtggcctt ataattcttc aactctccac agaaactcca taggtctctc ttagcctcat  
770  
tgtttcaaga aaatggtaga tct  
793

<200> CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

<210> SEQ ID NO 6

5 <211> LONGITUD: 984

<212> TIPO: ADN

<213> ORGANISMO: *Populus* sp.

<220> RASGO:

10 <221> NOMBRE/CLAVE: promotor

<222> LOCALIZACIÓN: (1)...(984)

<223> OTRA INFORMACIÓN: promotor de cinamato 4-hidroxilasa (C4H)

<400> SECUENCIA: 6

15

ES 2 584 316 T3

```

tgatatgaga aactaacggt gcttgaattc aagatagaaa ttgaccttgc aagaagacaa acgtattcct
70
ggaaacacgt attaataaat acaaagtagt ttgtcacact acgggagaaa atatctaata aaagtaagac
140
cttatagttt caggaggtta ggttgatatt taaagagaga tttcttttat taacttttta tatatgttga
210
aatcttgaaa ttaatattaa aaagatttgt taatcctttt ctcttgaata ctttgattg atgtgagga
280
ttcacattta aactattcct aaatgaatct tgaagctgta tgtttgatat tgtgttttta aaatgtattt
350
atctttaaaa aatatcaaat taatgatttt ttaatgtttt ttaaagattt gaaagtatta atttaaaaa
420
taaaataaaa ttattttaat atatttttaa ataaaaata tttttgaaga gcgactgca ccctatactt
490
gatctcaatt ttaaagagat ttggagaaca caagaattaa aaaagaaaag gataggaaaa aaaaactttc
560
ttgtttgata gccttattac ttgaagctga aatcatcata gattagtggc gccacatta catcttgtat
630
agaaatatag aaaggcctgg caaattaatt aatatgatga ccatatgaca ttttcggcca ccaaccgcc
700
ttacctacta ctatocatga tcatcaatgt cactctcta ccacctcaa tgtaacgccc ttaactcccc
770
cccccccaca cacacacaca accctagcta gtagccacac gctccaccac ctaacgtgtg aaattcaact
840
tcatttctc tctaattttt gtagcttata aaaccaagc tctcctogtc ctggttctcc catccaaca
910
ccatcactct tcttacctca aaaatcccca cctctttctg acaagaaac cagttccaat attatggtag
980
atct
984

```

- 5 <200> CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
- <210> SEQ ID NO 7
- <211> LONGITUD: 1007
- <212> TIPO: ADN
- <213> ORGANISMO: *Populus* sp.
  
- 10 <220> RASGO:
- <221> NOMBRE/CLAVE: promotor
- <222> LOCALIZACIÓN: (1)...(1007)
- <223> OTRA INFORMACIÓN: promotor de cinamoil CoA reductasa (CCR)
  
- 15 <400> SECUENCIA: 7

ES 2 584 316 T3

tgcgctcggg ttgtcaccaat agtttcattt cttaatttat taagttaaat taagatacaa taagttggtc  
70  
acgtttttaa gcaaagagaa acaggaatg ggtaaaaagc aacataaatt ctctttcaca tttttttgtc  
140  
accaggttct ttgttggctt aggagtatta attaattaat gctttgacat tgatttattc gttaattctt  
210  
ttaaaacact gaattaaatc caatccacac acaaaatgaa atgggggtag gtgatgtggg tgattathtt  
280  
ttattcgggt tgatttttat taaaaaaaaat aaccaaaactg aattattata tttttaaaaa aactaaaacc  
350  
ggttcaaac ggctcggttc aattcggttt tttaggacaa caaccggttc aaaccacttt ggctcggttt  
420  
aggtttgatt cggttcogatt tttttgattt taggtttata aaacggaaat tgaactgaac cggttaattt  
490  
tttaaaaatt ttaaatttaa ttttttaatt attttctttt taattttttg atttttatcag tttttcaaat  
560  
ttttttttca ctttaagagag gccatgggtca tcatgtacct tcaaagaaga gagagaaata gcaaagcaca  
630  
tggtgacggt gtgttgacga ttcacattac aaagacccat actcctactt cacaaacctt aataataata  
700  
ataataataa taataataat aatagtaata agagaaaaaa ctagaaaaac aaaaacaaag agagaagaat  
770  
ctctttctc tctctcagag gcgaatattt accagtagta ggtgaggatg gtaacttcta acctataaa  
840  
tacatccact ccaccatgtc tttccttgta acatccactt ttcaagocaa gataagaaga aaagacatct  
910  
cctctcctct ttctctctgt ctgttctcca ctttcccagt caccaaactc gtatacatat aattacattt  
980  
atctaaatat aacaacatgg tagatct  
1007

<200> CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

<210> SEQ ID NO 8

5 <211> LONGITUD: 2081

<212> TIPO: ADN

<213> ORGANISMO: *Populus* sp.

<220> RASGO:

10 <221> NOMBRE/CLAVE: promotor

<222> LOCALIZACIÓN: (1)...(2081)

<223> OTRA INFORMACIÓN: promotor de ferulato-5-hidroxilasa (F5H)

<400> SECUENCIA: 8

15

ES 2 584 316 T3

ttcagtgaac atgctgccac aatgacatat atatcatcac aaattaatta atgtctactt taatgctgat  
 70  
 atatcttttg tttattatth ttttctctat catgggaaat gagatcaact ttttcagatg aaaattacta  
 140  
 attaaactat catatthcca gtttaatcaa agatatggaa tctttatthc actaaagata ttattattca  
 210  
 taagaatttg atgagttctt gcattatthg ttagattatc ttcacctct tgcaattagt gcttcatgga  
 280  
 ctctthttt tcttgthgaa gtagthtgcc atthaaatat agaaatatct catgctthtac aaaatataat  
 350  
 aatctcccct aagatataat aaattgaaact gagatgcaat taagtcgggt aaaaggcctg gatactgcca  
 420  
 gtgaataaga tttacacaaa atattggatt ttttcccgtc ctgaaagcta attattgtca gaaaaatagc  
 490  
 tttgaaata gttgatttht attgatatgg tggaataaaa acatcaatgg thccaatgtc taaccacgaa  
 560  
 aatgacttgt aaaatttata ataaggtcta tttthttcat caagcaataa taataaggtg aggcatacaa  
 630  
 atctctact tttgcttct gatcaaagat cactaagcag aacttgcatg gaacctcatc tctctctctc  
 700  
 tccccctctc tctctctccc cctctcccctc tctatatata tatatatata tatatatata tatgcaagta  
 770  
  
 ttagtcacat tgcatagta cgtggcagtt ttggatatgc tttgataacg gataacaccg agagtacaaa  
 840  
 acaaaatctg ggtaggtagc tggctcaatt gcaaccaaact aataataaga aatthtagct gcaagcaatt  
 910  
 aagaaaatga aagattgcac ctatgtcaac cactgggtta atatthtga tcttaactct tthttthtgt  
 980  
 ataatttctt ttatatgccc tgaaatgaag tcagccccta agthttacat aatgthtag gthaattaga  
 1050  
 aggagthta ttctatatat aataagtht tgaatgaaac aaaatatggt ctgtcactct atthttgggt  
 1120  
 tgctthttat tgcatagtac thctgccccta ttgattcagt gaacctthc gthttataa tataataaag  
 1190  
 tagaccttga ataaatattg acatgthact taaaacatta attgtcccctg tthtgacaac ataaatctg  
 1260  
 tatcaacgta cgtgctcttg thtaggtht thcttagaca actthtatct tagaaaactg aatthcaatca  
 1330  
 aaaaagatat atatatatat atatatatat atatatatat atatatatat atatatagac agacgacata  
 1400  
 acaaaaatgt tccggthcaga actctggact actgatcgaa gthgthtcaa atatatgaa tggthtatct  
 1470  
 taccatagta atthactgag thattthcaag atattacaca gacataacat atthtthtct tgatcaaat  
 1540  
 atatthtatt taaaaatata thaaaataat atatththta ththtaaaaa tatatththta atthcaatc  
 1610  
 atthaaataa ththaaatath aaaaatacaa aataththth taaccacaaa aaaaaaaac thgaaaat  
 1680  
 aatgthctta aatattgthc thcatocaga ththgthtagc thtgctgthc cagthgthtag thgthtatga  
 1750  
 agthctactc ththththca actththctca agacattgaa thtagthaaac aatgththtag gaatgggata  
 1820  
 cgaaacctc caaaataata tatatatata tatatatata tatatatata tatatatata tatatatata  
 1890  
 tatatatata tatatatata aagagggagg gagggggtg gggaggtcac aaaaaacctg tatataaagc  
 1960  
 cccgthaatat ththctcagc thtagcaacat ctgaaagthg caatthcaatca thgthgthgta ctgthgatgca  
 2030  
 cacaatacaa thcatacct agacacaaaac acaaaaactc gcatccatgg a  
 2081

<200> CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

<210> SEQ ID NO 9

<211> LONGITUD: 995

<212> TIPO: ADN

<213> ORGANISMO: *Populus* sp.

ES 2 584 316 T3

<220> RASGO:

<221> NOMBRE/CLAVE: promotor

<222> LOCALIZACIÓN: (1)...(995)

5

<223> OTRA INFORMACIÓN: promotor de sinapil alcohol deshidrogenasa (SAD)

<400> SECUENCIA: 9

taatcgaaac cgatcgattt gaactggtt cttttttttt ttaattttgg tttggttgct tttttttgtc  
70  
accctaata attatatata ataataaaa taaaattatt taccattatt tgtctgagat tttttttaat  
140  
agaatgatta aaatgatatt gtaaaaaaaaa cctaataata ccatactttt caaataatat tttttactat  
210  
tattagtgat tggtttgctg tcaaagttgt tttttttttt tttactattc ttaggagttt gtttctttta  
280  
ccctagtcta caggagtttg ttagttacta tcatttcttt aaaaaggaaa ctcatatgga aaaggaaaa  
350  
ttgattaaat acaaaaaatt ataaaattac atagagtttt tatttatttg aacgattgag ttttaattta  
420  
acttaataaa atataattaa ttacaggtaa aacaagtact tatcaatcat tataagtata ttataaaaaca  
490

tattaattat gagttcagca aagatttggtg ctgatttctt gtctcttcta aactacatgt gacaagatag  
560  
aaaaaacatc taaatgctaa tgattcttta atatatgact atgcaagtca tttatcttat ttaaatacat  
630  
taattttaa at caaactta at tttaaattat tggattctaa tataattgtg ttttaaaaaca cttaggtagc  
700  
ttccttggtg gacccgaaac tggttcatga actgaaataa tctatgcaa taacgttttc ccacaaaaag  
770  
aagaacgact tgctttttta gcgacaatca tgcctccttc gacctcaccg atgacaccac ctgtgagtgc  
840  
tgtttgccag taacatcacc tccttgtccc tatgtgtata tagaaagaca aacttgccaa gcataaaaaa  
910  
gaagaagaag aagtcatact atatatttcc tgccttcctt ctgcgacgata tttctctatc tgaagcaagc  
980  
accatggtag atcta  
995

10

<200> CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

<210> SEQ ID NO 10

<211> LONGITUD: 1269

<212> TIPO: ADN

15

<213> ORGANISMO: *Populus* sp.

<220> RASGO:

<221> NOMBRE/CLAVE: promotor

<222> LOCALIZACIÓN: (1)...(1269)

20

<223> OTRA INFORMACIÓN: promotor de UDP-D-glucuronato carboxi-liasa (UDP)

<400> SECUENCIA: 10

ES 2 584 316 T3

ggaaatgtca acacttgtgt gaccacacgc acactgtaga cgctacctta cctggccaga ccccgctcgc  
 70  
 cagggattac aatttaattt gaatttgata atatcatctc aactaacttg aatgaatatt ctttttttaa  
 140  
 cagttgtatt gcttcatgga aaataaatat tgtatatatt aggatattta atttgaaata aatattatca  
 210  
 aatattgactc aaaaccagc ctaatatatt tatattttga atatgatata atataaacct ttttagtatt  
 280  
 aacataatgc atgtgtttaa taaatatttt tttttattaa ataataaata tggattgaat gtcgaaaaga  
 350  
 gaaataaata gtgtactcat agttaccca tgtacaagtt gagtacaaca acagatgtag tcaaaataaa  
 420  
 agaaaactcg gtctgacgtg tcgttaccat tactgtcatt ggacagtaa gtctttcgat tgtaacagaa  
 490  
 catgttctcc ttctctctgg ccagtaacga ccgcgaatta cgcttcctcg aaatttcaat ctaaccttga  
 560  
 acactatata agtatatgcc ctgtctctca tcatccgctg tccttaaata ccttcaaaat actacaacia  
 630  
 aatatttttt tccctcaatt tatttcagca gcaaaagtct acgtggtaat taaatctcaa tttccattcg  
 700  
 tttttatagg gatttttggg tgtctggaga aaaaaataat ggtcatggga ttgagagatt ttgagattca  
 770  
 gatctgaagt ttgtttttaa ttttttcaat aactgggtggg gtatgggtttt tcggtgattt gaagcattgt  
 840  
 acatttcgtg tttttgaagt ctcatttaat ttatgcgtcc ctocctttct ctctcactag ctggtgttgt  
 910  
 ttgttgggtg gtttattatc atgattagtt gttaacatc tattttttta tctaatttgg ttacaatcga  
 980  
 gttctttata taaagctgta gtctttgagt ttcatgactc gcagcgaaaa aagtttgaga ttttgactct  
 1050  
 atttttcac accactcagg tgaactggat ttattatcat gtttttaatt gaaacttgtt ggctggtttg  
 1120  
 atttaagggt tttgatttgt gggttattta tgaatgtgag gattatgcaa tgttttggtt ctgggttgtt  
 1190  
 tttacaattt atggtggatt gatttttttt ttttaatttc atgattttca gaaattggac aagaatgtca  
 1260

gatctgata  
1269

<200> CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

<210> SEQ ID NO 11

5 <211> LONGITUD: 1025

<212> TIPO: ADN

<213> ORGANISMO: *Populus* sp.

<220> RASGO:

10 <221> NOMBRE/CLAVE: promotor

<222> LOCALIZACIÓN: (1)...(1025)

<223> OTRA INFORMACIÓN: promotor de proteína de transferencia de lípidos (LTP)

<400> SECUENCIA: 11

15



ES 2 584 316 T3

gaattcgatt acgatgaaat gaagaactga tagcataatc aatcagaaga ttgataatta ttcaaaaataa  
 70  
 tttttcgaac aatattcaat gcatgatgat tatatgtcgg atcaataaat aatcaattta atgtaaaaaa  
 140  
 ggggtactta agtaataaat aataataata ataatgaatg cottagcatc taaaattcgc tattttttaga  
 210  
 agaatcacat tccaagcttc atgaacaatc taatgttcaa tgacatttga tatttttaaat aattcaagaa  
 280  
 tctcaacaat acaagaatca ttggcatcgc aagatatttt ccctaagcaa gctctaaaat ccccgtaaaa  
 350  
 aacatccttt aaggatata tattagttcg aaaataatta tgtgttaatc ttcattgtgca gtggtgagta  
 420  
 tttcggccat tcaggcgggt gaccgggat cgttcccag caacggcgtc agttttaatt tttatgtttt  
 490  
 cttgaaagtt ttcttaattc ttggcgtggt ctttttgggt ggaaggaacg cgggtgtgcg aaaggtaatg  
 560  
 gccactaatt gggcaagata atggcatgtc tgtgttgctg tagttggctc aaaggggagc tttgtggtgg  
 630  
 tggtaatatt ggagttctag tcttctagag acccactgag atggctggat aatgagcttc aagggttaat  
 700  
 tttgctgtgt cattaaaatg gtaacatctg gatatatgca atggaatggg atgatatggc acccaaatca  
 770  
 ccaacctttg attggactgg aaagaactat aatttacaac actaattttc taaagccaag tgotgcaata  
 840  
 atatcaactt gtctcttgtt gtagtgctag cccattttg attagtggac tgggcatoga gttgaggttc  
 910  
 atcttgagc ataaaagctg tccataggag taggagcatt gcattcccat acagcaagaa aatcaatttg  
 980  
 ttcatatata tagttgagat acagaaatat ggaggctcca gatct  
 1025

<200> CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

<210> SEQ ID NO 12

5 <211> LONGITUD: 2341

<212> TIPO: ADN

<213> ORGANISMO: *Populus* sp.

<220> RASGO:

10 <221> NOMBRE/CLAVE: promotor

<222> LOCALIZACIÓN: (1)...(2341)

<223> OTRA INFORMACIÓN: promotor de ag-13 (AG13)

<400> SECUENCIA: 12

15

gaattcgcat ccatgctgtg agttcgcatt ggtttgatcc aagtggaaca tttccatacc cacacccccca  
 70  
 ttagcataac aatcctttat taaaccaacta gctagacatg caagattcaa cctacacaca agaaccocact  
 140  
 agatagactt ccaactggaac catgcagcat tctcccgatg tgacctcatt actcagtctt ttctactggg  
 210  
 gtttctgttt caacottctc ctctgtttca acaggcttct gttcttcctt ttcttctctt tcttttgggg  
 280  
 cttcgaactgc aacctccgct tcttctgctg gtgctcacc aggccctgta gtctcttttag cctcctcgac

350  
aacaggctct acgggtatat cgggctcctc ttttgtctcc tcaacaaccg gctctggtgt ttccttaggt  
420  
gtctcctcct cagttttctc tagtacggtt ggctcttctg cagcgatctt ggtctcttcg agcacttctt  
490  
tagtttcagc ttcagctggg gcctcgggct ctgggtgccac gggctcctca gatgctgcaa ctttctctgc  
560  
ttcttttggc tcttcatgag ttactgcctc tgggtgctgca gtgaccgctt cttctgtggt ggtctcaacc  
630  
ttgattgggt gttcattttt ttcctctaca agtgcattct gcgctgacac aacctgcagg ataogttatt  
700  
aaaagaaaag aatgttcacc aaaatgctga tgaggctta ccatttgta tatatataga gatgaatata  
770  
cgaattttca aatatgaaca tccacgaatt aaagatcata attaagatgg aggtgttgat cttgatgtac  
840  
attccatcag cataaaactt atcagagtta tatatataaa tatatttaaat gacttggag aagtaataga  
910  
tgaatctgt taaataaact tctcaagagg gagattaaat cattcttagt gaatgagta cctcaacagt  
980  
ggccattgga actagaagga aaataaagca cagctgggat gcaaaagaaa actgtaagaa gcaaaaagg  
1050  
acgttgaggt aattatcaca gaagaggatg aagaaattgc tttgagtatt tgatgcagag tactgatgaa  
1120  
cgagggtgga tttatataga gatgtagggg gctcactcga gcgaggagg gagtgagtga gagaagagag  
1190  
ctaccgtccg aggaatcttg ggatctgaca ccatagctga tgtcattaaa gaattgttg aagtgaattc  
1260  
cttttttaga tttttttat ttataaatat attataataa tttttttat tttttaaata ttattttgat  
1330  
atatgtatat taaaaagaat aaaaataaaa attaaatttt acaaatctc catttgggca cacgatttaa  
1400  
tttgaagagg ctaaaataat ggaggccatt ttcactctag ccatcatctt cttttggtcg cgtgtgctga  
1470  
tgtgctttgt gcagtcggtc atgtaggatga ttatcatcca ttcattgtct caacttgcca ttcgtcatta  
1540  
acaactcctc cttttttttt cttttttttt taaggataaa tgaattaatt ttttaagaaa ataagaaa  
1610  
taatttgca aaaatttttag aaataaaaaa ttccaacaat gctgggtcac taaaattatt aataatatt  
1680  
aagaaataaa agcaattgac caaagaact ttcaaaaaa gctatcttta ttttttttt taatattct  
1750  
caatattgca ttgcactata aactagtact gtgattttct catgttaaat aataataata ataataata  
1820  
tcacccttaa ccaataggca taatttactt caaacaagcg aataaaactc tgacgtggaa atttaagttg  
1890  
gtcccacgct ctctctoggc cattgottta tcaattatgg tatttcataa aaaatttaaat tttttttaa  
1960  
tagttttaat atattaatat taaaaataat ttttaaaata aaaaatatta ttttaataata totttaaatt  
2030  
aaaactactt taataaacia gctatcacat tatcaaacgc tatttaaaagt cggcggatoc cacgagatgc  
2100  
agggatagca acattagtgt aggactggat cagctgagct ggagctgggtg gacggccatg tccacggatt  
2170  
tcgtcgctgt cgattacgtg tcaacagttt ttttttatat tttttcttc tacttttcca gatggatcca  
2240  
agcctccaag aacgaaacat tggctacagt ttgaaaactc ttaaaaatgt taagattaat aagattagca  
2310  
gcatcatatt aagtcaagga atgtcagatc t  
2341

<200> CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:  
<210> SEQ ID NO 13  
<211> LONGITUD: 31  
<212> TIPO: ADN  
<213> ORGANISMO/FUENTE: sintética  
<221> NOMBRE/CLAVE: cebador/oligonucleótido

<400> SECUENCIA: 13  
 5?- GCCATAGCTC CTTAAGAGAA ACAGAAAGCA A -3?

5 <200> CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:  
 <210> SEQ ID NO 14  
 <211> LONGITUD: 32  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO/FUENTE: sintética  
 10 <221> NOMBRE/CLAVE: cebador/oligonucleótido

<400> SECUENCIA: 14  
 5?- CAATATAGAA TCAATGAACA GCACTAGTTT GC -3?

15 <200> CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:  
 <210> SEQ ID NO 15  
 <211> LONGITUD: 20  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO/FUENTE: sintética  
 20 <221> NOMBRE/CLAVE: cebador/oligonucleótido

<400> SECUENCIA: 15  
 5?- TCATGTCCTA TCCAACGGCG - 3?

25 <200> CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:  
 <210> SEQ ID NO 16  
 <211> LONGITUD: 24  
 <212> TIPO: ADN  
 30 <213> ORGANISMO/FUENTE: sintética  
 <221> NOMBRE/CLAVE: cebador/oligonucleótido

<400> SECUENCIA: 16  
 5?- CTCATTTTCT CTCAAAGCTC AAAG -3?

35 <200> CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:  
 <210> SEQ ID NO 17  
 <211> LONGITUD: 30  
 40 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO/FUENTE: sintética  
 <221> NOMBRE/CLAVE: cebador/oligonucleótido

<400> SECUENCIA: 17  
 45 5?- GACAACACTAGT CTAAAGTTAA AACTTAGACC -3?

<200> CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:  
 <210> SEQ ID NO 18  
 50 <211> LONGITUD: 20  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO/FUENTE: sintética  
 <221> NOMBRE/CLAVE: cebador/oligonucleótido

<400> SECUENCIA: 18  
 55 5?- CCCTGGAGGT TGGGGTGAGT - 3?

<200> CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:  
 <210> SEQ ID NO 19  
 60 <211> LONGITUD: 25  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO/FUENTE: sintética  
 <221> NOMBRE/CLAVE: cebador/oligonucleótido

65 <400> SECUENCIA: 19

5?- GCGTTCATCT ACAAACCCT CCTCC -3?

5 <200> CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:  
 <210> SEQ ID NO 20  
 <211> LONGITUD: 23  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO/FUENTE: sintética  
 <221> NOMBRE/CLAVE: cebador/oligonucleótido

10 <400> SECUENCIA: 20  
 5?- TTCATCCTTA TTTTTTTGGG ATA -3?

15 <200> CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:  
 <210> SEQ ID NO 21  
 <211> LONGITUD: 20  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO/FUENTE: sintética  
 <221> NOMBRE/CLAVE: cebador/oligonucleótido

20 <400> SECUENCIA: 21  
 5?- CAAAGGATCA TGGAGTTGGA - 3?

25 <200> CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:  
 <210> SEQ ID NO 22  
 <211> LONGITUD: 34  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO/FUENTE: sintética  
 <221> NOMBRE/CLAVE: cebador/oligonucleótido

30 <400> SECUENCIA: 22  
 5?- TATACTAATA TGACCTAATA ACTTAGAAGT GTGG -3?

35 <200> CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:  
 <210> SEQ ID NO 23  
 <211> LONGITUD: 22  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO/FUENTE: sintética  
 <221> NOMBRE/CLAVE: cebador/oligonucleótido

40 <400> SECUENCIA: 23  
 5?- CATCTTGATC AAGATTGAAT TC -3?

45 <200> CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:  
 <210> SEQ ID NO 24  
 <211> LONGITUD: 20  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO/FUENTE: sintética  
 <221> NOMBRE/CLAVE: cebador/oligonucleótido

50 <400> SECUENCIA: 24  
 5?- CATAATATCA AAACCTTAAGC - 3'

55 <200> CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:  
 <210> SEQ ID NO 25  
 <211> LONGITUD: 33  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO/FUENTE: sintética  
 <221> NOMBRE/CLAVE: cebador/oligonucleótido

60 <400> SECUENCIA: 25

5?- TGAATTGATG ACGTAGGAAA CATGATAAAC ATG -3?

5 <200> CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:  
 <210> SEQ ID NO 26  
 <211> LONGITUD: 28  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO/FUENTE: sintética  
 <221> NOMBRE/CLAVE: cebador/oligonucleótido

10 <400> SECUENCIA: 26  
 5?- CATTTCCTTG AAACAATGAG GCTAAGAG -3'

15 <200> CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:  
 <210> SEQ ID NO 27  
 <211> LONGITUD: 29  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO/FUENTE: sintética  
 <221> NOMBRE/CLAVE: cebador/oligonucleótido

20 <400> SECUENCIA: 27  
 5?- GACATGAGAA ACTAACGTTG CTTGAATTC -3?

25 <200> CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:  
 <210> SEQ ID NO 28  
 <211> LONGITUD: 33  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO/FUENTE: sintética  
 <221> NOMBRE/CLAVE: cebador/oligonucleótido

30 <400> SECUENCIA: 28  
 5?- CATAATATTG GAACTGGTTT CTTTGTCAGA AAG -3?

35 <200> CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:  
 <210> SEQ ID NO 29  
 <211> LONGITUD: 25  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO/FUENTE: sintética  
 <221> NOMBRE/CLAVE: cebador/oligonucleótido

40 <400> SECUENCIA: 29  
 45 5?- GCGCTCGGGT TGTCACCATA GTTTC -3?

50 <200> CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:  
 <210> SEQ ID NO 30  
 <211> LONGITUD: 26  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO/FUENTE: sintética  
 <221> NOMBRE/CLAVE: cebador/oligonucleótido

55 <400> SECUENCIA: 30  
 5?- CATGTTGTTA TATTAGATA AATGTA -3'

60 <200> CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:  
 <210> SEQ ID NO 31  
 <211> LONGITUD: 29  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO/FUENTE: sintética  
 <221> NOMBRE/CLAVE: cebador/oligonucleótido

65 <400> SECUENCIA: 31

5?- TTCATCAAGC AATAATAATA AGGTGAGGC -3?

5 <200> CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:  
 <210> SEQ ID NO 32  
 <211> LONGITUD: 26  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO/FUENTE: sintética  
 <221> NOMBRE/CLAVE: cebador/oligonucleótido

10 <400> SECUENCIA: 32  
 5?- CATGGATGCA GATTTTTGTG TTTGTG -3?

15 <200> CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:  
 <210> SEQ ID NO 33  
 <211> LONGITUD: 26  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO/FUENTE: sintética  
 <221> NOMBRE/CLAVE: cebador/oligonucleótido

20 <400> SECUENCIA: 33  
 5?- TTCAGTGAAC ATGCTGCCAC AATGAC - 3?

25 <200> CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:  
 <210> SEQ ID NO 34  
 <211> LONGITUD: 26  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO/FUENTE: sintética  
 <221> NOMBRE/CLAVE: cebador/oligonucleótido

30 <400> SECUENCIA: 34  
 5?- AATCGAAACC GATCGATTTG AACTGG -3?

35 <200> CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:  
 <210> SEQ ID NO 35  
 <211> LONGITUD: 21  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO/FUENTE: sintética  
 <221> NOMBRE/CLAVE: cebador/oligonucleótido

40 <400> SECUENCIA: 35  
 5?- CATGGTGCTT GCTTCAGATA G -3?

45 <200> CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:  
 <210> SEQ ID NO 36  
 <211> LONGITUD: 28  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO/FUENTE: sintética  
 <221> NOMBRE/CLAVE: cebador/oligonucleótido

50 <400> SECUENCIA: 36  
 5?- GGAAATGTCA ACACTTGTGT GACCACAC -3?

55 <200> CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:  
 <210> SEQ ID NO 37  
 <211> LONGITUD: 23  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO/FUENTE: sintética  
 <221> NOMBRE/CLAVE: cebador/oligonucleótido

60 <400> SECUENCIA: 37

5?- GACATTCTTG TCCAATTTCT GAA -3?

5 <200> CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:  
<210> SEQ ID NO 38  
<211> LONGITUD: 24  
<212> TIPO: ADN  
<213> ORGANISMO/FUENTE: sintética  
10 <221> NOMBRE/CLAVE: cebador/oligonucleótido

<400> SECUENCIA: 38  
5?- GGAGCCTCCA TATTTCTGTA TCTC -3?

15 <200> CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:  
<210> SEQ ID NO 39  
<211> LONGITUD: 28  
<212> TIPO: ADN  
20 <213> ORGANISMO/FUENTE: sintética  
<221> NOMBRE/CLAVE: cebador/oligonucleótido

<400> SECUENCIA: 39  
5?- CAAGACGATG AAATGAAGAA CTGATAGC -3?

25 <200> CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:  
<210> SEQ ID NO 40  
<211> LONGITUD: 26  
<212> TIPO: ADN  
30 <213> ORGANISMO/FUENTE: sintética  
<221> NOMBRE/CLAVE: cebador/oligonucleótido

<400> SECUENCIA: 40  
35 5?- GACATTCCTT GACTTAATAT GATGCT -3?

<200> CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:  
40 <210> SEQ ID NO 41  
<211> LONGITUD: 26  
<212> TIPO: ADN  
<213> ORGANISMO/FUENTE: sintética  
<221> NOMBRE/CLAVE: cebador/oligonucleótido

45 <400> SECUENCIA: 41  
5?- GAATTCGCAT CCATGCGGTG AGTTTCG -3?  
25697179.1 1

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene la capacidad de iniciar, en una planta, la transcripción de un gen de una manera preferida de tejido de xilema y/o cámbium, en la que dicha molécula de ácido nucleico aislada comprende una secuencia de nucleótidos como se expone en la SEQ ID NO: 3.
2. Un vector de expresión, preferentemente un plásmido, que comprende:
- 10 (i) la molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 1, y  
(ii) una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de interés, en la que (i) y (ii) están en unión operativa, en la que (i) no regula normalmente (ii).
- 15 3. Una célula de planta hospedadora recombinante, en la que dicha célula hospedadora recombinante se transforma o transfecta con y comprende
- (i) la molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 1 y  
(ii) una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de interés, en la que (i) y (ii) están en unión operativa, en la que (i) no regula normalmente (ii).
- 20 4. Una célula hospedadora recombinante, en la que dicha célula hospedadora recombinante se transforma o transfecta con y comprende el vector de expresión de la reivindicación 2.
- 25 5. Un método de fabricación de una célula de planta hospedadora recombinante, comprendiendo dicho método transformar o transfectar una célula con el vector de expresión de la reivindicación 2.
6. Un método de fabricación de una proteína codificada por el vector de expresión de la reivindicación 2, que comprende transformar o transfectar una célula con dicho vector de expresión y cultivar dicha célula en condiciones favorables para la expresión de dicha proteína.
- 30 7. Un método de fabricación de una proteína, comprendiendo dicho método cultivar una planta o una parte de planta que comprende una célula hospedadora de planta recombinante de la reivindicación 3, en condiciones que favorezcan la producción de dicha proteína por dicha planta o parte de planta.
- 35 8. El método de la reivindicación 7, en el que dicha planta es una dicotiledónea, una monocotiledónea o una gimnosperma.
9. El método de la reivindicación 8, en el que dicha planta es *Eucalyptus*, *Populus* o *Pinus*.
- 40 10. Una planta o parte de planta que comprende la célula de planta recombinante de la reivindicación 3.
11. La planta de la reivindicación 10, en la que dicha planta es una monocotiledónea, una dicotiledónea o una gimnosperma.
- 45 12. La planta de la reivindicación 11, en la que dicha dicotiledónea es *Eucalyptus*, *Populus* o *Pinus*.
13. La parte de planta de la reivindicación 10, en la que dicha parte de planta es una semilla.
- 50 14. La célula hospedadora recombinante de la reivindicación 3, en la que dicha célula hospedadora recombinante es una célula de polen.
15. El método de la reivindicación 7, en la que dicha parte de planta se selecciona del grupo que consiste en una raíz, un tallo, una hoja, una flor y un fruto.



FIG. 1.

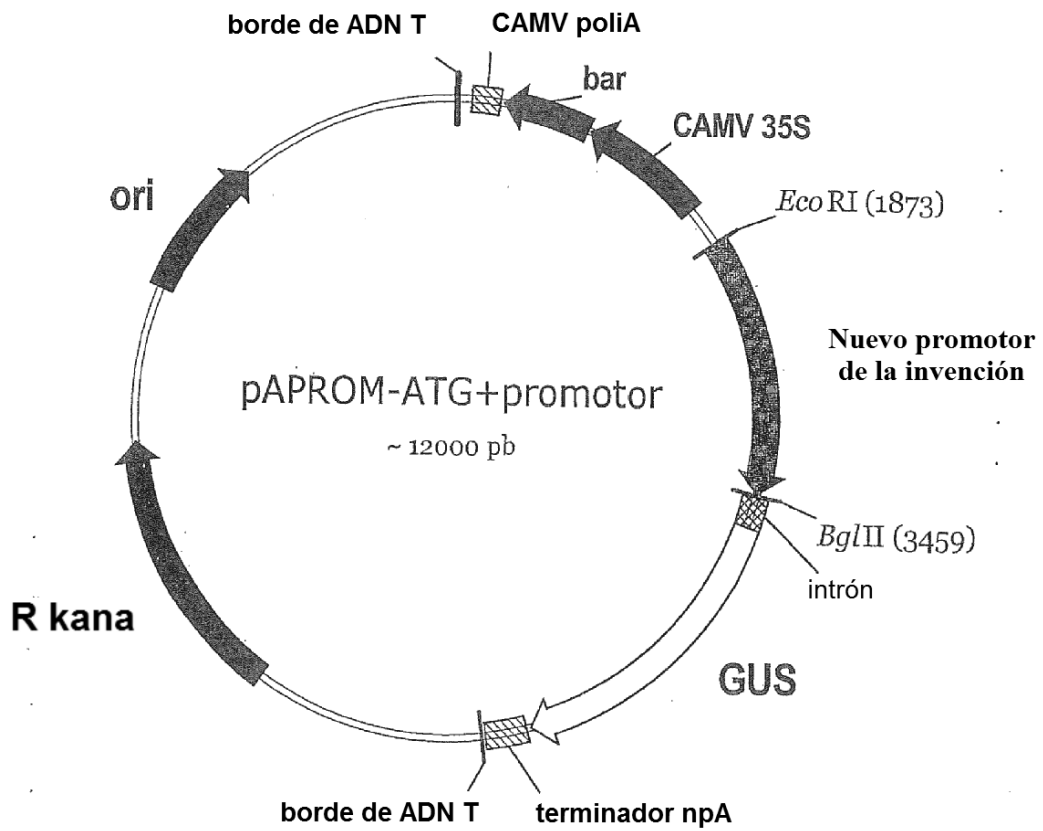


FIG. 2.

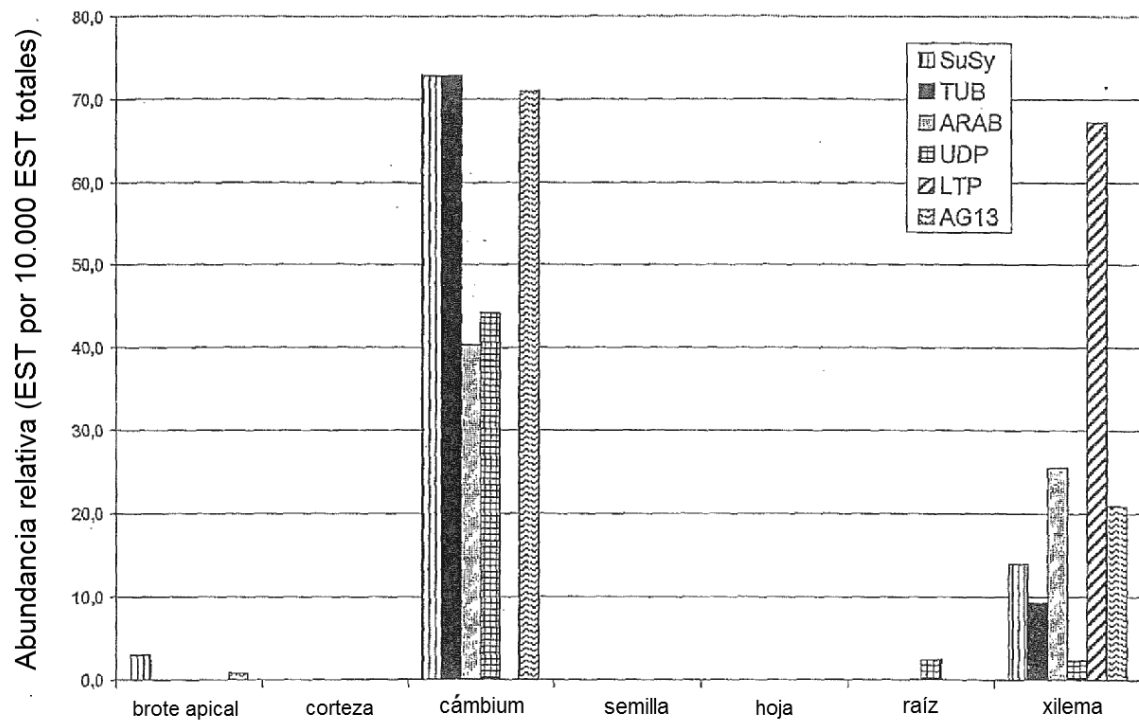


FIG. 3.

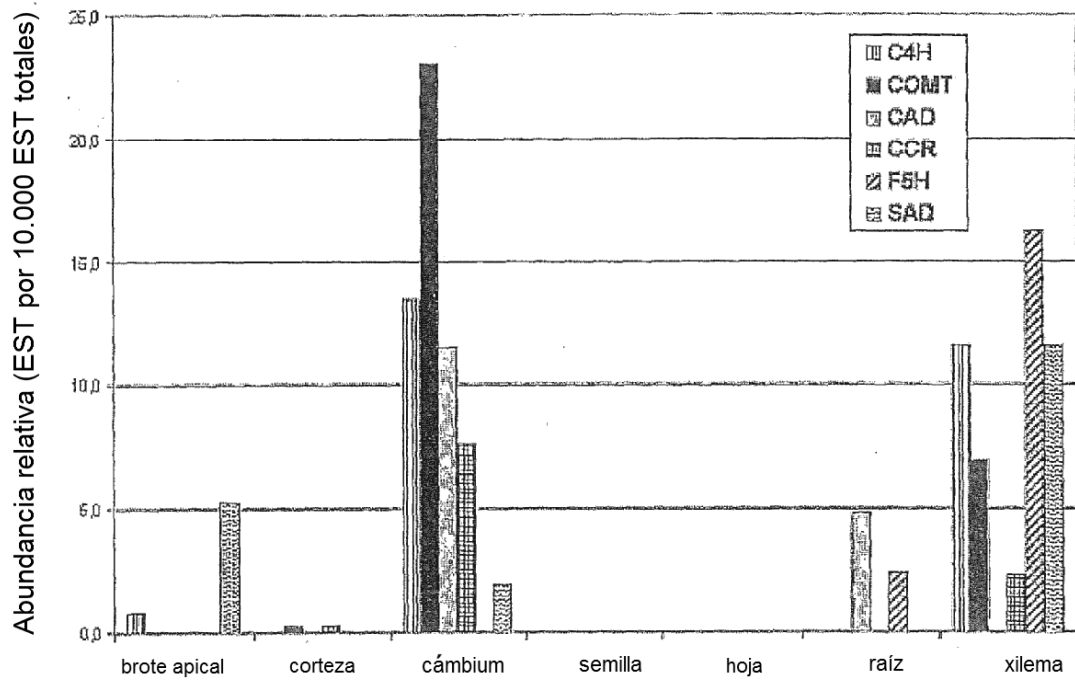
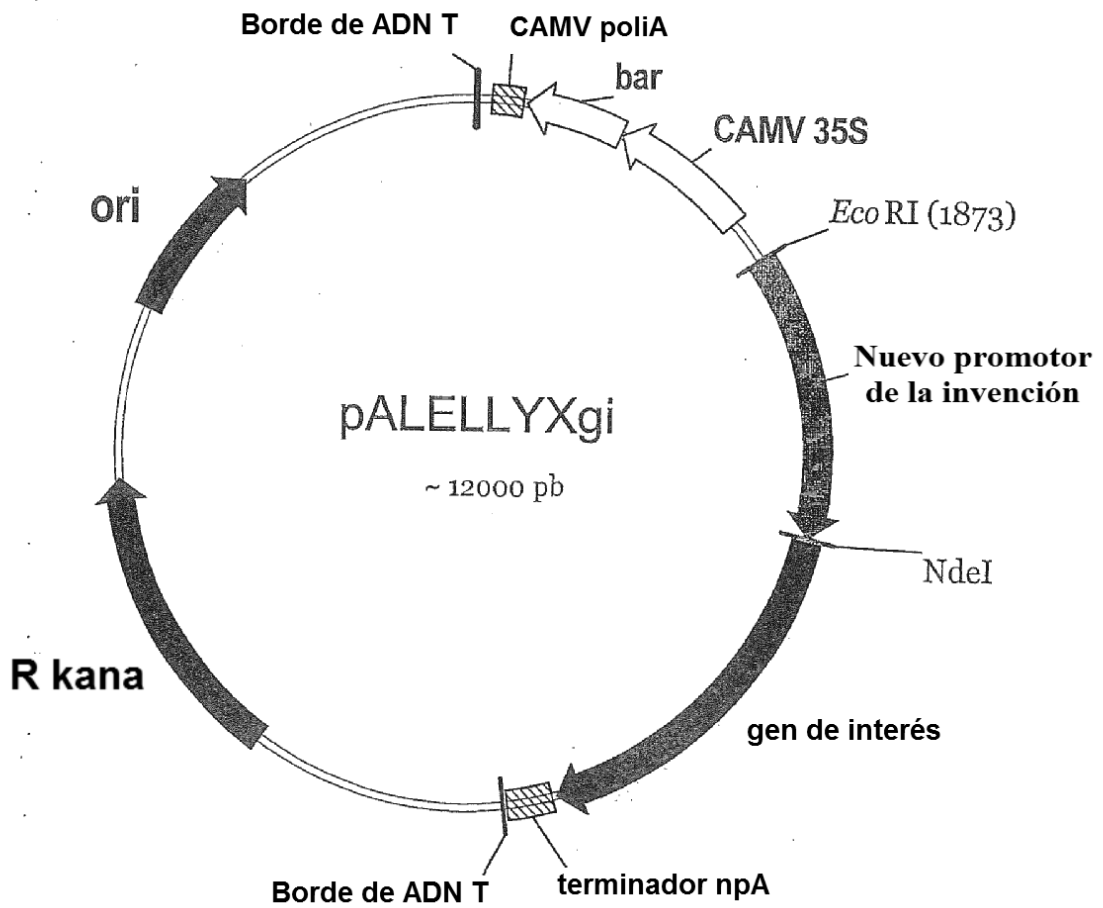


FIG. 4.



**FIG. 5.**

