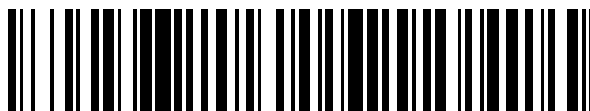


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 674 256**

51 Int. Cl.:

C12P 7/64 (2006.01)

C12N 1/00 (2006.01)

C12N 1/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.05.2009 PCT/IL2009/000508**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.11.2009 WO09141824**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.05.2009 E 09750276 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.03.2018 EP 2279258**

54 Título: **Polinucleótidos y polipéptidos aislados y métodos de uso de los mismos para aumentar el rendimiento de la planta**

30 Prioridad:

22.05.2008 US 71885 P

17.06.2008 US 129296 P

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

28.06.2018

73 Titular/es:

EVOGENE LTD. (100.0%)

Gad Finstein Street 13

76121 Rechovot, IL

72 Inventor/es:

EMMANUEL, EYAL;

DIBER, ALEX;

GOLD, EVGENIA;

NEVO, INBAR;

VINOCUR, BASIA JUDITH;

AYAL, SHARON;

RONEN, GIL;

HERSCHKOVITZ, YOAV;

GANG, MICHAEL;

DIMET, DOTAN y

IDAN, ANAT

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones :

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

ES 2 674 256 T3

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

DESCRIPCIÓN

Polinucleótidos y polipéptidos aislados y métodos de uso de los mismos para aumentar el rendimiento de la planta

Campo y antecedentes de la invención

5 La presente invención, en algunas realizaciones de la misma, se refiere a polipéptidos, polinucleótidos que los codifican, plantas transgénicas que expresan lo mismo y métodos de producción y uso de los mismos y, más particularmente, pero no exclusivamente, a métodos para aumentar el rendimiento de la planta, el rendimiento de aceite, el rendimiento de semillas, la biomasa, el ritmo de crecimiento, el vigor, el contenido de aceite, la tolerancia al estrés abiótico y/o la eficiencia de uso de nitrógeno.

10 Las condiciones de estrés abiótico tales como salinidad, sequía, inundaciones, temperatura subóptima y contaminación química tóxica, causan daños sustanciales a las plantas agrícolas. La mayoría de las plantas han desarrollado estrategias para protegerse contra estas condiciones. Sin embargo, si la gravedad y la duración de las condiciones de estrés son demasiado grandes, los efectos sobre el desarrollo, el crecimiento y el rendimiento de la planta de la mayoría de las plantas de cultivo son profundos. Además, la mayoría de las plantas de cultivo son altamente susceptibles al estrés abiótico (ABS) y, por lo tanto, necesitan condiciones de crecimiento óptimas para los rendimientos de cultivos comerciales. La exposición continua al estrés causa alteraciones importantes en el metabolismo de la planta, lo que finalmente causa la muerte celular y en consecuencia pérdidas de rendimiento.

15 La escasez mundial de suministro de agua es uno de los problemas agrícolas más graves que afectan el crecimiento de las plantas y al rendimiento de los cultivos, y se realizan esfuerzos para mitigar los efectos nocivos de la desertización y la salinización de las tierras cultivables del mundo. Por lo tanto, las compañías de Agbiotech intentan crear nuevas variedades de cultivos que sean tolerantes a diferentes estreses abióticos, centrándose principalmente en el desarrollo de nuevas variedades que puedan tolerar la escasez de agua durante períodos más largos.

20 Los nutrientes subóptimos (macro y micronutrientes) afectan al crecimiento y al desarrollo de la planta a lo largo de todo el ciclo de vida de la planta. Uno de los macronutrientes esenciales para la planta es el nitrógeno. El nitrógeno es responsable de la biosíntesis de aminoácidos y ácidos nucleicos, grupos prostéticos, hormonas vegetales, defensas químicas de las plantas y similares. El nitrógeno es a menudo el elemento limitante del ritmo del crecimiento de las plantas y todos los cultivos de campo tienen una dependencia fundamental del fertilizante nitrogenado inorgánico. Dado que los fertilizantes se agotan rápidamente en la mayoría de los tipos de suelo, se deben suministrar a cultivos en crecimiento dos o tres veces durante la temporada de crecimiento. Macronutrientes importantes adicionales son fósforo (P) y potasio (K), que tienen una correlación directa con el rendimiento y la tolerancia general de la planta.

25 Los aceites vegetales o de semillas son la principal fuente de energía y nutrición en la dieta humana y animal. También se usan para la producción de productos industriales, tales como pinturas, tintas y lubricantes. Además, los aceites vegetales representan fuentes renovables de hidrocarburos de cadena larga que pueden usarse como combustible. Dado que los combustibles fósiles usados actualmente son recursos finitos y se están agotando gradualmente, los cultivos de biomasa de crecimiento rápido pueden usarse como combustibles alternativos o como materias primas energéticas y pueden reducir la dependencia de los suministros de energía fósil. Sin embargo, el principal obstáculo para aumentar el consumo de aceites vegetales como biocombustible es el precio del aceite, que sigue siendo más alto que el del combustible fósil [Hypertext Transfer Protocol://World Wide Web (.) eia (.) doe (.) gov/oiia/analysispaper/biodiesel/; Hypertext Transfer Protocol://World Wide Web (.) njbiz (.) com/weekly_article.asp?alD=19755147 (.) 6122555 (.) 957931 (.) 7393254 (.) 4337383 (.) 561&aID=73678]. Además, la tasa de producción de aceite vegetal está limitada por la disponibilidad de tierras agrícolas y agua. Por lo tanto, aumentar los rendimientos de aceite vegetal de la misma área de cultivo puede superar eficazmente la escasez en el espacio de producción y puede disminuir los precios del aceite vegetal al mismo tiempo.

30 Los estudios que apuntan a aumentar los rendimientos de aceite vegetal se centran en la identificación de genes implicados en el metabolismo del aceite, así como en genes capaces de aumentar los rendimientos de plantas y de semillas en plantas transgénicas.

35 Los genes que se sabe que están implicados en el aumento del rendimiento de aceite vegetal incluyen aquellos que participan en la síntesis de ácidos grasos o secuestrantes tales como desaturasa [p. ej., DELTA6, DELTA12 o acil-ACP (Ssi2; Arabidopsis Information Resource (TAIR; Hypertext Transfer Protocol://World Wide Web (.) arabidopsis (.) org/), TAIR No. AT2G43710)], OleosinA (TAIR No. AT3G01570) o FAD3 (TAIR No. AT2G29980), y diversos factores de transcripción y activadores tales como Lec1 [TAIR No. AT1G21970, Lotan et al. 1998. Cell. 26; 93(7): 1195-205], Lec2 [TAIR No. AT1G28300, Santos Mendoza et al. 2005, FEBS Lett. 579(21): 4666-70], Fus3 (TAIR No. AT3G26790), ABI3 [TAIR No. AT3G24650, Lara et al. 2003. J Biol Chem. 278(23): 21003-11] y Wri1 [TAIR No. AT3G54320, Cernac y Benning, 2004. Plant J. 40(4): 575-85].

40 Zabrouskov V., et al., 2002 (Physiol Plant. 116: 172-185) describen un aumento en la fracción lipídica total mediante la regulación positiva de las desaturasas de ácidos grasos del retículo endoplásmico (FAD3) y plastídicos (FAD7) en la patata.

Wang HW et al., 2007 (Plant J. 52: 716-29. publicación on line 2007 septiembre 18) describen un aumento en el contenido de ácidos grasos y lípidos totales en semillas de plantas al sobreexpresar los factores de transcripción GmDof4 y GmDof11.

5 Vigeolas H, et al. [Plant Biotechnol J. 2007, 5(3): 431-41] y solicitud de patente de Estados Unidos No. 20060168684 describe un aumento en el contenido de aceite de semilla en colza de semilla oleaginosa (*Brassica napus* L.) mediante la sobreexpresión de una glicerol-3-fosfato deshidrogenasa de levadura bajo el control de un promotor específico de semilla.

Katavic V, et al., 2000 (Biochem Soc Trans. 28:935-7) describen el uso de los genes FAE1 de *Arabidopsis* y SLC1-1 de levadura para mejoras en el contenido de ácido erúxico y aceite en colza.

10 La solicitud de patente de Estados Unidos No. 20080076179 describe un ácido nucleico de musgo aislado que codifica una proteína del metabolismo de lípidos (LMP) y plantas transgénicas que lo expresan con niveles de lípidos aumentados.

La solicitud de patente de Estados Unidos No. 20060206961 describe un método de aumento del contenido de aceite en plantas (p. ej., en semillas de plantas), expresando en la planta el polipéptido Ypr140w.

15 La solicitud de patente de Estados Unidos No. 20060174373 describe un método de aumento del contenido de aceite en plantas, expresando un ácido nucleico que codifica una proteína potenciadora (TEP) de la síntesis de triacilgliceroles (TAG) en la planta.

20 Las solicitudes de patente de Estados Unidos No. 20070169219, 20070006345, 20070006346 y 20060195943, describen plantas transgénicas con una eficiencia de uso de nitrógeno mejorada que puede usarse para la conversión en combustible o materias primas químicas.

El documento WO2004/104162 enseña secuencias de polinucleótidos y métodos de utilización de las mismas para aumentar la tolerancia de una planta a estreses abióticos y/o aumentar la biomasa de una planta.

25 El documento WO2007/020638 enseña secuencias de polinucleótidos y métodos de utilización de las mismas para aumentar la tolerancia de una planta a estreses abióticos y/o aumentar la biomasa, el vigor y/o el rendimiento de una planta.

El documento WO2008/122890 enseña secuencias de polinucleótidos y métodos de utilización de las mismas para aumentar el contenido de aceite, el ritmo de crecimiento, la biomasa, el rendimiento y/o el vigor de una planta.

30 El documento US2007214517 describe moléculas de ADN que constituyen fragmentos del genoma de una planta, y polipéptidos codificados por ellas. Las moléculas de ADN son útiles para especificar un producto génico en células, ya sea como un promotor o como una secuencia codificante de proteínas o como una UTR o como una secuencia de terminación 3', y también son útiles para controlar el comportamiento de un gen en el cromosoma, para controlar la expresión de un gen o como herramientas para el mapeo genético, el reconocimiento o aislamiento de fragmentos de ADN idénticos o relacionados, o la identificación de un organismo individual en particular, o para la agrupación de un grupo de organismos con un rasgo común. Este documento describe 81.981 secuencias de proteínas y 30.066 secuencias de ácidos nucleicos en el listado de secuencias, y una lista de genes y proteínas depositados sin orientación con respecto al uso de cada una de las secuencias,

35 Es contra los antecedentes, y las limitaciones y problemas asociados con ellos, que se ha desarrollado la presente invención.

Compendio de la invención

40 La presente invención se refiere a una serie de mejoras en polipéptidos, polinucleótidos que los codifican, plantas transgénicas que expresan lo mismo y métodos para aumentar el rendimiento de la planta, el rendimiento de aceite, el rendimiento de semillas, la biomasa, el ritmo de crecimiento, el vigor, el contenido de aceite, la tolerancia al estrés abiótico y/o la eficiencia de uso de nitrógeno.

45 Para conseguir esto, el método de la invención comprende las características reivindicadas en la reivindicación 1. Según la presente invención, se proporciona un método de aumento del contenido de aceite, el rendimiento de semillas, el ritmo de crecimiento y/o la biomasa de una planta en comparación con una planta nativa, que comprende expresar dentro de la planta un polinucleótido exógeno que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 80 % homóloga a la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:68, aumentando de este modo el contenido de aceite, el rendimiento de semillas, el ritmo de crecimiento y/o la biomasa de la planta en comparación con la planta nativa.

50 En las reivindicaciones dependientes se reivindican realizaciones ventajosas de la invención.

Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un método de aumento del contenido de aceite, el rendimiento, el ritmo de crecimiento, la biomasa, el vigor, la tolerancia al estrés abiótico y/o la

- 5 eficiencia de uso de nitrógeno de una planta, que comprende expresar dentro de la planta un polinucleótido exógeno que comprende una secuencia de ácido nucleico al menos un 80 % idéntica a las SEQ ID NO:18, 1-16, 19-50, 101-378, 657-672, 674-706, 716-719, 724-741 y 755-763 con la condición de que la secuencia de ácido nucleico no sea la expuesta mediante la SEQ ID NO:756 o 762, aumentando de este modo el contenido de aceite, el rendimiento, el ritmo de crecimiento, la biomasa, el vigor, la tolerancia al estrés abiótico y/o la eficiencia de uso de nitrógeno de la planta.
- 10 Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un método de aumento del contenido de aceite, el rendimiento, el ritmo de crecimiento, la biomasa, el vigor, la tolerancia al estrés abiótico y/o la eficiencia de uso de nitrógeno de una planta, que comprende expresar dentro de la planta un polinucleótido exógeno que comprende la secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO:18, 1-16, 19-50, 101-378, 657-672, 674-706, 716-719, 724-741, 755, 757-761 y 763, aumentando de este modo el contenido de aceite, el rendimiento, el ritmo de crecimiento, la biomasa, el vigor, la tolerancia al estrés abiótico y/o la eficiencia de uso de nitrógeno de la planta.
- 15 Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un método de aumento del contenido de aceite, el rendimiento, el ritmo de crecimiento, la biomasa, el vigor, la tolerancia al estrés abiótico y/o la eficiencia de uso de nitrógeno de una planta, que comprende transformar la planta con un polinucleótido exógeno capaz de regular negativamente el nivel de expresión de una secuencia de ácido nucleico al menos un 80 % idéntica a la SEQ ID NO:17 o 673, aumentando de este modo el contenido de aceite, el rendimiento, el ritmo de crecimiento, la biomasa, el vigor, la tolerancia al estrés abiótico y/o la eficiencia de uso de nitrógeno de la planta.
- 20 Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un método de aumento del contenido de aceite, el rendimiento, el ritmo de crecimiento, la biomasa, el vigor, la tolerancia al estrés abiótico y/o la eficiencia del uso de nitrógeno de una planta, que comprende transformar la planta con un polinucleótido exógeno capaz de regular negativamente el nivel de expresión de la secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO:17 o 673, aumentando de este modo el contenido de aceite, el rendimiento, el ritmo de crecimiento, la biomasa, el vigor, la tolerancia al estrés abiótico y/o la eficiencia de uso de nitrógeno de la planta.
- 25 Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un método de producción de aceite, que comprende: (a) proporcionar la planta según el método de la invención; y (b) extraer el aceite de la planta; produciendo de este modo el aceite.
- 30 Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico al menos un 80 % idéntica a las SEQ ID NO:18, 1-16, 19-50, 101-378, 657-672, 674-706, 716-719, 724-741 y 755-763 con la condición de que la secuencia de ácido nucleico no sea tal como se expone mediante la SEQ ID NO:756 o 762.
- 35 Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO:18, 1-16, 19-50, 101-378, 657-672, 674-706, 716-719, 724-741, 755, 757-761 y 763.
- Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico capaz de regular negativamente el nivel de expresión de una secuencia de ácido nucleico al menos un 80 % idéntica a la SEQ ID NO:17 o 673.
- 40 Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico capaz de regular negativamente el nivel de expresión de la secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO:17 o 673.
- 45 Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 80 % homóloga a la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO:68, 51-66, 69-100, 379-656, 707-715, 720-723, 742-754 y 764-772 con la condición de que la secuencia de ácido nucleico no sea tal como se expone mediante la SEQ ID NO: 765 o 771.
- 50 Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 68, 51-66, 69-100, 379-656, 707-715, 720-723, 742-754, 764, 766-770 y 772.
- Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico capaz de regular negativamente el nivel de expresión o la actividad de un polipéptido al menos un 80 % homólogo al polipéptido expuesto mediante la SEQ ID NO:67.
- 55 Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico capaz de regular negativamente el nivel de expresión o la actividad del polipéptido expuesto mediante la SEQ ID NO:67.

Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona una construcción de ácido nucleico que comprende el polinucleótido aislado de la invención, y un promotor para dirigir la transcripción de la secuencia de ácido nucleico en una célula huésped.

5 Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 80 % homóloga a las SEQ ID NO:68, 51-66, 69-100, 379-656, 707-715, 720-723, 742-754, 764-771 o 772 con la condición de que la secuencia de aminoácidos no sea tal como se expone mediante la SEQ ID NO:765 o 771.

10 Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un polinucleótido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 68, 51-66, 69-100, 379-656, 707-715, 720-723, 742-754, 764, 766-770 y 772.

Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona una construcción de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 779-792 y una secuencia de polinucleótido heterólogo, en donde la secuencia de ácido nucleico es capaz de regular la expresión del polinucleótido heterólogo en una célula huésped.

15 Según algunas realizaciones de la invención, el polinucleótido heterólogo es un gen indicador.

Según algunas realizaciones de la invención, la regulación de la expresión del polinucleótido heterólogo es de una manera específica de tejido.

Según algunas realizaciones de la invención, la regulación de la expresión del polinucleótido heterólogo es de una manera específica de la fase del desarrollo.

20 Según algunas realizaciones de la invención, el polinucleótido heterólogo comprende una secuencia de ácido nucleico al menos un 80 % idéntica a la secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO:18, 1-16, 19-50, 101-378, 657-672, 674-706, 716-719, 724-741 y 755-763 con la condición de que la secuencia de ácido nucleico no sea tal como se expone mediante la SEQ ID NO:756 o 762.

25 Según algunas realizaciones de la invención, el polinucleótido heterólogo codifica una secuencia de aminoácidos al menos un 80 % homóloga a las SEQ ID NO:68, 51-66, 69-100, 379-656, 707-715, 720-723, 742-754 y 764-772 con la condición de que la secuencia de aminoácidos no sea tal como se expone mediante la SEQ ID NO: 765 o 771.

30 Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un método de aumento del contenido de aceite, el rendimiento, el ritmo de crecimiento, la biomasa, el vigor, la tolerancia al estrés abiótico y/o la eficiencia de uso de nitrógeno de una planta, que comprende expresar dentro de la planta la construcción de ácido nucleico de la reivindicación 17, en donde el polinucleótido heterólogo comprende una secuencia de ácido nucleico al menos un 80 % idéntica a las SEQ ID NO:18, 1-16, 19-50, 101-378, 657-672, 674-706, 716-719, 724-741 y 755-763 con la condición de que la secuencia de ácido nucleico no sea la expuesta mediante la SEQ ID NO:756 o 762, aumentando de este modo el contenido de aceite, el rendimiento, el ritmo de crecimiento, la biomasa, el vigor, la tolerancia al estrés abiótico y/o la eficiencia de uso de nitrógeno de la planta.

35 Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un método de aumento del contenido de aceite, el rendimiento, el ritmo de crecimiento, la biomasa, el vigor, la tolerancia al estrés abiótico y/o la eficiencia de uso de nitrógeno de una planta, que comprende expresar dentro de la planta la construcción de ácido nucleico de la reivindicación 17, en donde el polinucleótido heterólogo codifica una secuencia de aminoácidos al menos un 80 % homóloga a las SEQ ID NO:68, 51-66, 69-100, 379-656, 707-715, 720-723, 742-754 y 764-772 con la condición de que la secuencia de aminoácidos no sea tal como se expone mediante la SEQ ID NO: 765 o 771, aumentando de este modo el contenido de aceite, el rendimiento, el ritmo de crecimiento, la biomasa, el vigor, la tolerancia al estrés abiótico y/o la eficiencia de uso de nitrógeno de la planta.

40 Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona una célula vegetal que expresa de forma exógena el polinucleótido de la invención, o la construcción de ácido nucleico de la invención.

45 Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona una célula vegetal que expresa de forma exógena el polipéptido de la invención.

Según algunas realizaciones de la invención, la secuencia de ácido nucleico es tal como se expone en las SEQ ID NO:18, 1-16, 19-50, 101-378, 657-672, 674-706, 716-719, 724-741, 755, 757-761 o 763.

50 Según algunas realizaciones de la invención, el polinucleótido consiste en la secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO:18, 1-16, 19-50, 101-378, 657-672, 674-706, 716-719, 724-741, 755, 757-761 y 763.

Según algunas realizaciones de la invención, la secuencia de ácido nucleico codifica una secuencia de aminoácidos al menos un 80 % homóloga a la SEQ ID NO:68, 51-66, 69-100, 379-656, 707-715, 720-723, 742-754, 764-771 o 772 con la condición de que la secuencia de aminoácidos no sea tal como se expone mediante la SEQ ID NO: 765 o

771.

Según algunas realizaciones de la invención, la secuencia de ácido nucleico codifica la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 68, 51-66, 69-100, 379-656, 707-715, 720-723, 742-754, 764, 766-770 y 772.

5 Según algunas realizaciones de la invención, la célula vegetal forma parte de una planta.

Según algunas realizaciones de la invención, el método comprende además cultivar la planta que expresa el polinucleótido exógeno bajo estrés abiótico.

10 Según algunas realizaciones de la invención, el estrés abiótico se selecciona del grupo que consiste en salinidad, sequía, privación de agua, baja temperatura, alta temperatura, toxicidad por metales pesados, anaerobiosis, deficiencia de nutrientes, exceso de nutrientes, contaminación atmosférica e irradiación con UV.

Según algunas realizaciones de la invención, el polinucleótido es un polinucleótido de co-supresión, un polinucleótido antisentido, un polinucleótido de interferencia de ARN o un polinucleótido de ribozima.

Breve descripción de los dibujos

15 Algunas realizaciones de la invención se describen en la presente memoria, a modo de ejemplo solamente, con referencia a los dibujos adjuntos. Con referencia específica ahora a los dibujos en detalle, se destaca que los detalles mostrados son a modo de ejemplo y para los fines de una descripción ilustrativa de las realizaciones de la invención. A este respecto, la descripción tomada con los dibujos hace evidente para los expertos en la técnica cómo pueden llevarse a la práctica las realizaciones de la invención.

En los dibujos:

20 Las figuras 1A-D son imágenes digitales de hojas que representan los parámetros de las hojas. Figura 1A - longitud de la hoja (la longitud de la hoja está representada por la flecha); Figura 1B - longitud laminar (la longitud laminar está representada por la flecha); Figura 1C - área laminar (el área laminar está representada por la elipse blanca); Figura 1D - anchura laminar (la anchura laminar está representada por la flecha). La circularidad del cuerpo de la hoja se calculó como la anchura laminar dividida por la longitud laminar.

25 Las figuras 2A-B son imágenes que representan la visualización del desarrollo de raíces de plantas cultivadas en placas de agar transparentes. Los diferentes transgenes se cultivaron en placas de agar transparente durante 17 días y las placas se fotografiaron cada 2 días comenzando el día 7. Figura 2A - una imagen de una fotografía de plantas tomada después de 12 días en placas de agar. Figura 2B - una imagen de análisis de raíz en la que la longitud de la raíz medida se representa mediante una flecha roja.

30 La figura 3 es una ilustración esquemática del plásmido binario pGI usado para expresar las secuencias de polinucleótidos aisladas de la invención. RB - Borde derecho de ADN-T; LB - Borde izquierdo de ADN-T; H-Enzima de restricción *HindIII*; X - Enzima de restricción *XbaI*; B - enzima de restricción *BamHI*; S - Enzima de restricción *SalI*; Sm - enzima de restricción *SmaI*; R-I - enzima de restricción *EcoRI*; Sc - *SacI/SstI/Ec136II*; (números) - Longitud en pares de bases; NOS pro = promotor de nopalina sintasa; NPT-II = gen de neomicina fosfotransferasa; Terminador NOS ter = nopalina sintasa; Señal de Poli-A (señal de poliadenilación); GUSintron - el gen indicador GUS (secuencia codificante e intrón). Las secuencias de polinucleótidos aisladas de algunas realizaciones de la invención se clonaron en el vector mientras se reemplazaba el gen indicador GUSintron.

Descripción de realizaciones específicas de la invención

40 La presente invención, en algunas realizaciones de la misma, se refiere a polipéptidos aislados y polinucleótidos que los codifican y, más particularmente, pero no exclusivamente, a métodos de uso de los mismos para aumentar el contenido de aceite, el ritmo de crecimiento, el rendimiento, la biomasa, el vigor, la tolerancia al estrés abiótico y/o la eficiencia de uso de nitrógeno de una planta.

45 Antes de explicar en detalle al menos una realización de la invención, debe entenderse que la invención no está necesariamente limitada en su aplicación a los detalles expuestos en la siguiente descripción o ejemplificados mediante los ejemplos. La invención es capaz de otras realizaciones o de ser puesta en práctica o llevada a cabo de diversas maneras.

50 Mientras reducían la presente invención a la práctica, los inventores de la presente invención han identificado nuevos polipéptidos y polinucleótidos que pueden usarse para aumentar el rendimiento, el ritmo de crecimiento, la biomasa, el contenido de aceite, el vigor, la tolerancia al estrés abiótico y/o la eficiencia de uso de nitrógeno de una planta.

De este modo, tal como se muestra en la sección de ejemplos que sigue, los inventores de la presente invención han utilizado herramientas bioinformáticas para identificar polinucleótidos que mejoran el rendimiento (p. ej., rendimiento de semillas, rendimiento de aceite y contenido de aceite), el ritmo de crecimiento, la biomasa, el vigor, la

tolerancia al estrés abiótico y/o la eficiencia de uso de nitrógeno de una planta. Los genes que afectan al rasgo de interés se identificaron basándose en los perfiles de expresión de genes de varios ecotipos y tejidos de Arabidopsis, la homología con genes que se sabe que afectan al rasgo de interés y el uso del perfil de expresión digital en tejidos y condiciones específicos (tablas 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11, ejemplos 1 y 3). También se identificaron polipéptidos y polinucleótidos homólogos que tienen la misma función (tabla 2, ejemplo 2). Las plantas transgénicas que sobreexpresan los polinucleótidos identificados exhiben un mayor rendimiento de semillas (p. ej., peso de 1000 semillas), rendimiento de aceite (por ejemplo, porcentaje de aceite en la semilla), biomasa (p. ej., materia seca), índice de cosecha, ritmo de crecimiento, área de roseta, tolerancia al estrés abiótico (p. ej., a condiciones de sequía) y eficiencia de uso de nitrógeno (tablas 22, 23, 24, 25, 26 y 27, ejemplos 5 y 7, tablas 28-30, ejemplo 8). Además, los inventores de la presente invención han descubierto que los polinucleótidos que reducen el nivel de expresión y/o la actividad de ciertos productos génicos (p. ej., el gen BDL127, SEQ ID NO:17 o 673) pueden aumentar el rendimiento (p. ej., rendimiento de semillas), biomasa y/o ritmo de crecimiento en plantas (tablas 31-36, ejemplo 9). Tal como se muestra adicionalmente en la sección de ejemplos que sigue, los inventores de la presente invención han descubierto secuencias promotoras novedosas que pueden usarse para expresar el gen de interés de una manera específica de tejido y/o específica de la fase de desarrollo (tablas 16, 17, 18, 19, 20 y 21, ejemplo 6). En conjunto, estos resultados sugieren el uso de los polinucleótidos o polipéptidos de la invención para aumentar el rendimiento, el ritmo de crecimiento, la biomasa, el vigor, la tolerancia al estrés abiótico y/o la eficiencia de uso de nitrógeno de una planta

De este modo, según un aspecto de algunas realizaciones de la invención, se proporciona un método de aumento del contenido de aceite, el rendimiento, el ritmo de crecimiento, la biomasa, el vigor, la tolerancia al estrés abiótico y/o la eficiencia de uso de nitrógeno de una planta, que comprende expresar dentro de la planta un polinucleótido exógeno que comprende una secuencia de ácido nucleico al menos un 80% idéntica a las SEQ ID NO:18, 1-16, 19-50, 101-378, 657-672, 674-706, 716-719, 724-741 y 755-763 con la condición de que la secuencia de ácido nucleico no sea la expuesta mediante la SEQ ID NO:756 o 762, aumentando de este modo el contenido de aceite, el rendimiento, el ritmo de crecimiento, la biomasa, el vigor, la tolerancia al estrés abiótico y/o la eficiencia de uso de nitrógeno de la planta.

La frase "contenido de aceite" como se emplea en esta memoria se refiere a la cantidad de lípidos en un órgano vegetal dado, ya sea las semillas (contenido de aceite de la semilla) o la parte vegetativa de la planta (contenido de aceite vegetativo) y se expresa típicamente como porcentaje de peso seco (10 % de humedad de las semillas) o peso húmedo (por parte vegetativa).

Debe observarse que el contenido de aceite se ve afectado por la producción de aceite intrínseca de un tejido (p. ej., semilla, parte vegetativa), así como la masa o el tamaño del tejido productor de aceite por planta o por período de crecimiento.

En una realización, el aumento en el contenido de aceite de la planta se puede conseguir aumentando el tamaño/la masa de uno o varios tejidos de una planta que comprenden aceite por período de crecimiento. Por lo tanto, el aumento del contenido de aceite de una planta se puede conseguir aumentando el rendimiento, el ritmo de crecimiento, la biomasa y el vigor de la planta.

Como se emplea en esta memoria, la frase "rendimiento de la planta" se refiere a la cuantía (según se determina por peso o tamaño) o cantidad (números) de tejido producido por planta o por temporada de cultivo. Por lo tanto, un mayor rendimiento podría afectar el beneficio económico que se puede obtener de la planta en una determinada área de cultivo y/o tiempo de cultivo.

Debe observarse que el rendimiento de una planta puede verse afectado por diversos parámetros que incluyen, pero no se limitan a, biomasa de la planta; vigor de la planta; ritmo de crecimiento; rendimiento de semillas; rendimiento de aceite; contenido de aceite, almidón y/o proteína en órganos cosechados (p. ej., semillas o partes vegetativas de la planta); número de flores (flósculos) por panícula (expresado como una proporción del número de semillas llenas respecto al número de panículas primarias); índice de cosecha; número de plantas cultivadas por área; número y tamaño de los órganos cosechados por planta y por área; número de plantas por área de cultivo (densidad); número de órganos cosechados en el campo; área foliar total; asimilación de carbono y partición de carbono (la distribución/asignación de carbono dentro de la planta); resistencia a la oscuridad; número de órganos recolectables (p. ej., semillas), semillas por vaina, peso por semilla; y arquitectura modificada [tal como aumento del diámetro del tallo, el grosor o la mejora de las propiedades físicas (p. ej., elasticidad)].

Como se emplea en esta memoria, la frase "biomasa vegetal" se refiere a la cantidad (medida en gramos de tejido secado al aire) de un tejido producido a partir de la planta en una temporada de cultivo, que también podría determinar o afectar al rendimiento de la planta o al rendimiento por área de cultivo. Un aumento en la biomasa de la planta puede ser en la planta completa o en partes de la misma, tales como partes aéreas (cosechables), biomasa vegetativa, raíces y semillas.

Como se emplea en esta memoria, la frase "ritmo de crecimiento" se refiere al aumento de tamaño del órgano de la planta por tiempo (puede medirse en cm^2 por día).

Como se emplea en esta memoria, la frase "vigor de la planta" se refiere a la cantidad (medida en peso) de tejido producido por la planta en un tiempo dado. Por lo tanto, un mayor vigor podría determinar o afectar al rendimiento de la planta o al rendimiento por tiempo de cultivo o área de cultivo. Además, el vigor temprano (semilla y/o plántula) da como resultado una plantación mejorada.

5 Como se emplea en esta memoria, la frase "rendimiento de semillas" se refiere al número o peso de las semillas por planta, semillas por vaina, o por área de cultivo o al peso de una única semilla, o al aceite extraído por semilla. Por lo tanto, el rendimiento de semillas puede verse afectado por las dimensiones de la semilla (p. ej., longitud, anchura, perímetro, área y/o volumen), el número de semillas (llenas) y la tasa de llenado de semillas y por el contenido de aceite de la semilla. Por lo tanto, el aumento del rendimiento de semillas por planta podría afectar al beneficio económico que uno puede obtener de la planta en un área de cultivo y/o tiempo de cultivo determinados; y el aumento del rendimiento de semillas por área de cultivo podría conseguirse aumentando el rendimiento de semillas por planta, y/o aumentando el número de plantas cultivadas en la misma área dada.

10 El término "semilla" (también denominado "grano" o "pepita") como se emplea en esta memoria se refiere a una planta embrionaria pequeña encerrada en una cubierta llamada testa (generalmente con algo de alimento almacenado), el producto del óvulo madurado de plantas gimnospermas y angiospermas que se produce después de la fertilización y algo de crecimiento dentro de la planta madre.

15 Debe observarse que el rendimiento de una planta puede determinarse bajo estrés (p. ej., estrés abiótico, condiciones limitantes de nitrógeno) o condiciones sin estrés (normales).

20 Como se emplea en esta memoria, la frase "condiciones sin estrés" se refiere a las condiciones de cultivo (p. ej., agua, temperatura, ciclos de luz-oscuridad, humedad, concentración de sal, concentración de fertilizante en el suelo, suministro de nutrientes tales como nitrógeno, fósforo y/o potasio), que permiten el metabolismo, el crecimiento, la reproducción y/o la viabilidad de una planta normales en cualquier fase de su ciclo de vida (desde la semilla hasta la planta madura y de vuelta a la semilla de nuevo). Debe observarse que, aunque las condiciones sin estrés pueden incluir algunas variaciones leves de las condiciones óptimas (que varían de un tipo/especie de una planta a otra), dichas variaciones no hacen que la planta deje de crecer sin la capacidad de reanudar el crecimiento.

25 La frase "estrés abiótico" como se emplea en esta memoria se refiere a cualquier efecto adverso sobre el metabolismo, el crecimiento, la reproducción y/o la viabilidad de una planta. Por consiguiente, el estrés abiótico puede ser inducido por condiciones de cultivo ambientales subóptimas tales como, por ejemplo, salinidad, privación de agua, inundación, congelación, baja o alta temperatura, toxicidad por metales pesados, anaerobiosis, deficiencia de nutrientes, contaminación atmosférica o irradiación con UV. Las implicaciones del estrés abiótico se describen en la sección de Antecedentes.

30 La frase "tolerancia al estrés abiótico" como se emplea en esta memoria se refiere a la capacidad de una planta para soportar un estrés abiótico sin sufrir una alteración sustancial en el metabolismo, el crecimiento, la productividad y/o la viabilidad.

35 Como se emplea en esta memoria, la frase "eficiencia de uso de nitrógeno (EUN)" se refiere al o los procesos metabólicos que causan un aumento en el rendimiento, la biomasa, el vigor, el ritmo de crecimiento y la tolerancia al estrés abiótico de la planta por unidad de nitrógeno aplicada. El proceso metabólico puede ser la captación, diseminación, absorción, acumulación, reubicación (dentro de la planta) y el uso de nitrógeno absorbido por la planta.

40 Como se emplea en esta memoria, la frase "condiciones limitantes de nitrógeno" se refiere a condiciones de cultivo que incluyen un nivel (p. ej., concentración) de nitrógeno (p. ej., amonio o nitrato) aplicado que es inferior al nivel necesario para el metabolismo, el crecimiento, la reproducción y/o viabilidad normales de la planta.

45 Como se emplea en esta memoria, el término "aumentar" se refiere a al menos aproximadamente el 2 %, al menos aproximadamente el 3 %, al menos aproximadamente el 4 %, al menos aproximadamente el 5 %, al menos aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el 15 %, al menos aproximadamente el 20 %, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 80 %, de aumento en el contenido de aceite, el rendimiento, el ritmo de crecimiento, la biomasa, la vigor, la tolerancia al estrés abiótico y/o la eficiencia de uso de nitrógeno de una planta en comparación con una planta nativa [es decir, una planta no modificada con las biomoléculas (polinucleótidos o polipéptidos) de la invención, p. ej., una planta no transformada de la misma especie que se cultiva en las mismas condiciones de cultivo].

50 Como se emplea en esta memoria, la frase "polinucleótido exógeno" se refiere a una secuencia de ácido nucleico heteróloga que puede no expresarse de forma natural dentro de la planta o cuya sobreexpresión en la planta se desea. El polinucleótido exógeno se puede introducir en la planta de una manera estable o transitoria, para producir una molécula de ácido ribonucleico (ARN) y/o una molécula de polipéptido. Debe observarse que el polinucleótido exógeno puede comprender una secuencia de ácido nucleico que es idéntica o parcialmente homóloga a una secuencia de ácido nucleico endógena de la planta.

55

Según algunas realizaciones de la invención, el polinucleótido exógeno comprende una secuencia de ácido nucleico que es al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 81%, al menos aproximadamente el 82 %, al menos aproximadamente el 83 %, al menos aproximadamente el 84 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 86 %, al menos aproximadamente el 87 %, al menos aproximadamente el 88 %, al menos aproximadamente el 89 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 91 %, al menos aproximadamente el 92 %, al menos aproximadamente el 93 %, al menos aproximadamente el 93 %, al menos aproximadamente el 94 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 96 %, al menos aproximadamente el 97 %, al menos aproximadamente el 98 %, al menos aproximadamente el 99 %, p. ej., el 100% idéntica a la secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO:18, 1-16, 19-50, 101-378, 657-672, 674-706, 716-719, 724-741 y 755-763 con la condición de que la secuencia de ácido nucleico no sea como se expone en la SEQ ID NO:756 o 762.

La identidad (por ejemplo, porcentaje de homología) puede determinarse usando cualquier software de comparación de homología, incluyendo, por ejemplo, el software BlastN del National Center of Biotechnology Information (NCBI) tal como usando los parámetros por defecto.

Según algunas realizaciones de la invención, el polinucleótido es al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 81%, al menos aproximadamente el 82 %, al menos aproximadamente el 83 %, al menos aproximadamente el 84 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 86 %, al menos aproximadamente el 87 %, al menos aproximadamente el 88 %, al menos aproximadamente el 89 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 91 %, al menos aproximadamente el 92 %, al menos aproximadamente el 93 %, al menos aproximadamente el 93 %, al menos aproximadamente el 94 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 96 %, al menos aproximadamente el 97 %, al menos aproximadamente el 98 %, al menos aproximadamente el 99 %, p. ej., el 100% idéntico al polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO:18, 1-16, 19-50, 101-378, 657-672, 674-706, 716-719, 724-741 y 755-763 con la condición de que el polinucleótido exógeno no sea como se expone en la SEQ ID NO:756 o 762.

Según algunas realizaciones de la invención, el polinucleótido exógeno se expone mediante las SEQ ID NO:18, 1-16, 19-50, 101-378, 657-672, 674-706, 716-719, 724-741, 755, 757-761 o 763.

En realizaciones ejemplares, el polinucleótido exógeno no es el polinucleótido expuesto mediante la SEQ ID NO:807 u 808.

Como se emplea en esta memoria, el término "polinucleótido" se refiere a una secuencia de ácido nucleico monocatenario o bicatenario que se aísla y se proporciona en forma de una secuencia de ARN, una secuencia de polinucleótidos complementaria (ADNc), una secuencia de polinucleótidos genómica y/o secuencias de polinucleótidos compuestas (p. ej., una combinación de las anteriores).

El término "aislado" se refiere a al menos parcialmente separado del entorno natural, por ejemplo, de una célula vegetal.

Como se emplea en esta memoria, la frase "secuencia de polinucleótidos complementaria" se refiere a una secuencia, que resulta de la transcripción inversa de ARN mensajero usando una transcriptasa inversa o cualquier otra ADN polimerasa dependiente de ARN. Dicha secuencia puede amplificarse posteriormente *in vivo* o *in vitro* usando una ADN polimerasa dependiente de ADN.

Como se emplea en esta memoria, la frase "secuencia de polinucleótidos genómica" se refiere a una secuencia derivada (aislada) de un cromosoma y, por lo tanto, representa una parte contigua de un cromosoma.

Como se emplea en esta memoria, la frase "secuencia de polinucleótidos compuesta" se refiere a una secuencia, que es al menos parcialmente complementaria y al menos parcialmente genómica. Una secuencia compuesta puede incluir algunas secuencias exónicas requeridas para codificar el polipéptido de la presente invención, así como algunas secuencias intrónicas que se interponen entre ellas. Las secuencias intrónicas pueden ser de cualquier fuente, incluyendo otros genes, y típicamente incluirán secuencias señal de corte y empalme conservadas. Dichas secuencias intrónicas pueden incluir además elementos reguladores de la expresión que actúan en cis.

Según algunas realizaciones de la invención, el polinucleótido exógeno de la invención codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 81 %, al menos aproximadamente el 82 %, al menos aproximadamente el 83 %, al menos aproximadamente el 84 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 86 %, al menos aproximadamente el 87 %, al menos aproximadamente el 88 %, al menos aproximadamente el 89 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 91 %, al menos aproximadamente el 92 %, al menos aproximadamente el 93 %, al menos aproximadamente el 94 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 96 %, al menos aproximadamente el 97 %, al menos aproximadamente el 98 %, al menos aproximadamente el 99 %, o más, digamos el 100% homóloga a la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO:68, 51-66, 69-100, 379-656, 707-715, 720-723, 742-754 y 764-772 con la condición de que la secuencia de ácido nucleico no sea como se expone en la SEQ ID NO: 765 o 771.

La homología (p. ej., porcentaje de homología) puede determinarse usando cualquier software de comparación de homología, incluyendo, por ejemplo, el software BlastP o TBLASTN del National Center of Biotechnology Information (NCBI) tal como usando parámetros por defecto, cuando se parte de una secuencia de polipéptidos; o el algoritmo tBLASTX (disponible a través del NCBI) tal como mediante usando parámetros por defecto, que compara los productos de traducción conceptual de seis marcos de una secuencia de búsqueda de nucleótidos (ambas cadenas) frente a una base de datos de secuencias de proteínas.

Las secuencias homólogas incluyen secuencias tanto ortólogas como parálogas. El término "parólogo" se refiere a la duplicación de genes dentro del genoma de una especie que conduce a genes parálogos. El término "ortólogo" se refiere a genes homólogos en diferentes organismos debido a una relación ancestral.

Una opción para identificar ortólogos en especies de plantas monocotiledóneas es realizar una búsqueda recíproca en Blast. Esto se puede hacer mediante una primera búsqueda en Blast que complica comparar con Blast la secuencia de interés frente a cualquier base de datos de secuencias, tal como la base de datos del NCBI disponible públicamente que se puede encontrar en: Hypertext Transfer Protocol://World Wide Web (.) ncbi (.) nlm (.) nih (.) gov. Si se buscaran ortólogos en el arroz, la secuencia de interés se compararía mediante blast contra, por ejemplo, los 28.469 clones de ADNc de longitud completa de *Oryza sativa* Nipponbare disponibles en NCBI. Los resultados de la comparación en Blast pueden ser filtrados. Las secuencias de longitud completa de los resultados filtrados o los resultados no filtrados se comparan (segunda comparación con Blast) frente a las secuencias del organismo del que se deriva la secuencia de interés. Los resultados de la primera y segunda comparaciones con Blast se comparan a continuación. Se identifica un ortólogo cuando la secuencia que da como resultado la puntuación más alta (mejor resultado) en la primera comparación con Blast identifica en la segunda comparación con Blast la secuencia de consulta (la secuencia de interés original) como el mejor resultado. Usando la misma lógica, se descubre un parólogo (homólogo de un gen en el mismo organismo). En el caso de familias de secuencias grandes, se puede usar el programa ClustalW [Hypertext Transfer Protocol://World Wide Web (.) ebi (.) ac (.) uk/Tools/clustalw2/index (.) html], seguido de un método de unión de pares por árbol Neighbor-joining (Hypertext Transfer Protocol://en (.) wikipedia (.) org/wiki/Neighbor-joining) que ayuda a visualizar el agrupamiento.

En una realización ejemplar, el polinucleótido exógeno no codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 809-852.

Según algunas realizaciones de la invención, el polinucleótido exógeno codifica un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta mediante la SEQ ID NO: 68, 51-66, 69-100, 379-656, 707-715, 720-723, 742-754, 764, 766-770 o 772.

Las secuencias de ácido nucleico que codifican los polipéptidos de la presente invención pueden optimizarse para la expresión. Ejemplos no limitantes de secuencias de ácido nucleico optimizadas se proporcionan en las SEQ ID NO:663 (BDL-113), 675 (BDL-129), 676 (BDL-130), 680 (BDL-134), 683 (BDL-137), 684 (BDL-139) y 685 (BDL-141) que codifican un polipéptido optimizado que comprende las secuencias de aminoácidos expuestas mediante las SEQ ID NO:57, 69, 712, 74, 77, 78 y 79. Ejemplos de dichas modificaciones de secuencia incluyen, pero no se limitan a, un contenido de G/C alterado para acercarse más al que se encuentra típicamente en las especies vegetales de interés, y la eliminación de codones que se encuentran de forma atípica en las especies de plantas comúnmente denominada optimización de codones.

La frase "optimización de codones" se refiere a la selección de nucleótidos de ADN apropiados para uso dentro de un gen estructural o fragmento del mismo que se aproxima al uso de codones dentro de la planta de interés. Por lo tanto, un gen o una secuencia de ácido nucleico optimizado se refiere a un gen en el que la secuencia de nucleótidos de un gen nativo o de origen natural se ha modificado con el fin de utilizar codones preferidos estadísticamente o estadísticamente favorecidos dentro de la planta. La secuencia de nucleótidos típicamente se examina a nivel de ADN y la región codificante optimizada para la expresión en la especie vegetal se determina usando cualquier procedimiento adecuado, por ejemplo, como se describe en Sardana et al. (1996, Plant Cell Reports 15: 677-681). En este método, la desviación estándar del uso de codones, una medida del sesgo en el uso de codones, se puede calcular descubriendo en primer lugar la desviación proporcional al cuadrado del uso de cada codón del gen nativo con respecto a la de genes de plantas altamente expresados, seguido de un cálculo de la desviación cuadrada promedio. La fórmula usada es: $1 \text{ SDCU} = n = 1 \text{ N} [(X_n - Y_n) / Y_n]^2 / N$, donde X_n se refiere a la frecuencia de uso del codón n en genes vegetales altamente expresados, donde Y_n se refiere a la frecuencia de uso de codón n en el gen de interés y N se refiere al número total de codones en el gen de interés. Se compila una tabla de uso de codones de genes altamente expresados de plantas dicotiledóneas usando los datos de Murray et al. (1989, Nuc Acids Res. 17: 477-498).

Un método de optimización de la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con el uso de codón preferido para un tipo de célula vegetal particular se basa en el uso directo, sin realizar cálculos estadísticos adicionales, de tablas de optimización de codones tales como las proporcionadas en línea en la base de datos Codon Usage Database a través del banco de ADN del NIAS (National Institute of Agrobiological Sciences) en Japón (Hypertext Transfer Protocol://World Wide Web (.) kazusa (.) or (.) jp/codon/). La Codon Usage Database (base de datos de uso de codones) contiene tablas de uso de codones para varias especies diferentes, con cada tabla de uso de codones habiéndose determinado estadísticamente en función de los datos presentes en el Genbank.

Usando las tablas anteriores para determinar los codones más preferidos o más favorecidos para cada aminoácido en una especie particular (por ejemplo, arroz), se pueden optimizar los codones de una secuencia de nucleótidos de origen natural que codifica una proteína de interés para esa especie vegetal particular. Esto se efectúa reemplazando codones que pueden tener una baja incidencia estadística en el genoma de la especie particular con los codones correspondientes, con respecto a un aminoácido, que son estadísticamente más favorecidos. Sin embargo, se pueden seleccionar uno o más codones menos favorecidos para delecionar sitios de restricción existentes, para crear otros nuevos en uniones potencialmente útiles (extremos 5 'y 3' para añadir casetes de péptido señal o de terminación, sitios internos que podrían usarse para cortar y empalmar conjuntamente segmentos para producir una secuencia correcta de longitud completa), o para eliminar secuencias de nucleótidos que pueden afectar negativamente a la estabilidad o expresión del ARNm.

La secuencia de nucleótidos codificante de origen natural puede ya, antes de cualquier modificación, contener un número de codones que corresponden a un codón estadísticamente favorecido en una especie vegetal particular. Por lo tanto, la optimización de codones de la secuencia de nucleótidos nativa puede comprender determinar qué codones, dentro de la secuencia de nucleótidos nativa, no están estadísticamente favorecidos con respecto a una planta particular, y modificar estos codones según una tabla de uso de codones de la planta particular para producir un derivado con optimización de codones. Una secuencia de nucleótidos modificada puede optimizarse total o parcialmente para el uso de codones de plantas siempre que la proteína codificada por la secuencia de nucleótidos modificada se produzca a un nivel superior a la proteína codificada por el gen de origen natural o nativo correspondiente. La construcción de genes sintéticos alterando el uso de codones se describe, por ejemplo, en la solicitud de patente PCT 93/07278.

Por lo tanto, la invención abarca las secuencias de ácido nucleico descritas anteriormente; fragmentos de las mismas, secuencias hibridables con las mismas, secuencias homólogas a las mismas, secuencias que codifican polipéptidos similares con uso de codones diferente, secuencias alteradas caracterizadas por mutaciones, tales como delección, inserción o sustitución de uno o más nucleótidos, ya sean de origen natural o inducidos por el hombre, aleatoriamente o de manera dirigida.

La invención proporciona un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 81%, al menos aproximadamente el 82 %, al menos aproximadamente el 83 %, al menos aproximadamente el 84 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 86 %, al menos aproximadamente el 87 %, al menos aproximadamente el 88 %, al menos aproximadamente el 89 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 91 %, al menos aproximadamente el 92 %, al menos aproximadamente el 93 %, al menos aproximadamente el 93 %, al menos aproximadamente el 94 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 96 %, al menos aproximadamente el 97 %, al menos aproximadamente el 98 %, al menos aproximadamente el 99 %, p. ej., el 100% idéntico al polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO:18, 1-16, 19-50, 101-378, 657-672, 674-706, 716-719, 724-741 y 755-763 con la condición de que la secuencia de ácido nucleico no sea como se expone en la SEQ ID NO:756 o 762.

Según algunas realizaciones de la invención, el polinucleótido aislado comprende la secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO:18, 1-16, 19-50, 101-378, 657-672, 674-706, 716-719, 724-741, 755, 757-761 y 763.

Según algunas realizaciones de la invención, el polinucleótido aislado se expone mediante las SEQ ID NO:18, 1-16, 19-50, 101-378, 657-672, 674-706, 716-719, 724-741, 755, 757-761 o 763.

En realizaciones ejemplares, el polinucleótido aislado no es el polinucleótido expuesto mediante la SEQ ID NO:807 u 808.

La invención proporciona un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 81 %, al menos aproximadamente el 82 %, al menos aproximadamente el 83 %, al menos aproximadamente el 84 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 86 %, al menos aproximadamente el 87 %, al menos aproximadamente el 88 %, al menos aproximadamente el 89 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 91 %, al menos aproximadamente el 92 %, al menos aproximadamente el 93 %, al menos aproximadamente el 93 %, al menos aproximadamente el 94 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 96 %, al menos aproximadamente el 97 %, al menos aproximadamente el 98 %, al menos aproximadamente el 99 %, o más, digamos el 100% homóloga a la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO:68, 51-66, 69-100, 379-656, 707-715, 720-723, 742-754 y 764-772 con la condición de que la secuencia de ácido nucleico no sea como se expone en la SEQ ID NO: 765 o 771.

La invención proporciona un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO:68, 51-66, 69-100, 379-656, 707-715, 720-723, 742-754, 764, 766-770 y 772.

La invención proporciona un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 81 %, al menos aproximadamente el 82 %, al menos aproximadamente el 83 %, al menos aproximadamente el 84 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 86 %, al menos aproximadamente el 87 %, al menos aproximadamente el 88 %, al menos aproximadamente el 89 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 91 %, al menos aproximadamente el 92 %, al menos aproximadamente el 93 %, al menos aproximadamente el 94 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 96 %, al menos aproximadamente el 97 %, al menos aproximadamente el 98 %, al menos aproximadamente el 99 %, o más, digamos el 100% homóloga a la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO:68, 51-66, 69-100, 379-656, 707-715, 720-723, 742-754 y 764-772 con la condición de que la secuencia de ácido nucleico no sea como se expone en la SEQ ID NO: 765 o 771.

En una realización ejemplar, el polipéptido no es el polipéptido expuesto mediante la SEQ ID NO: 809-851 u 852.

Según algunas realizaciones de la invención, el polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO:68, 51-66, 69-100, 379-656, 707-715, 720-723, 742-754, 764, 766-770 y 772.

Según algunas realizaciones de la invención, el polipéptido se expone mediante la SEQ ID NO: 68, 51-66, 69-100, 379-656, 707-715, 720-723, 742-754, 764, 766-770 o 772.

La invención también abarca fragmentos de los polipéptidos descritos anteriormente, y polipéptidos que tienen mutaciones, tales como deleciones, inserciones o sustituciones de uno o más aminoácidos, ya sean de origen natural o inducidas por el hombre, ya sea aleatoriamente o de forma dirigida.

El término "planta" como se emplea en esta memoria abarca plantas enteras, ancestros y progenie de las plantas y partes de plantas, incluyendo semillas, brotes, tallos, raíces (incluyendo tubérculos), y células, tejidos y órganos vegetales. La planta puede estar en cualquier forma, incluyendo cultivos en suspensión, embriones, regiones meristemáticas, tejido calloso, hojas, gametofitos, esporofitos, polen y microsporas. Las plantas que son particularmente útiles en los métodos de la invención incluyen todas las plantas que pertenecen a la superfamilia Viridiplantae, en particular plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas incluyendo un forraje o leguminosa forrajera, planta ornamental, cultivo alimenticio, árbol o arbusto seleccionado de la lista que comprende *Acacia* spp., *Acer* spp., *Actinidia* spp., *Aesculus* spp., *Agathis australis*, *Albizia amara*, *Alsophila tricolor*, *Andropogon* spp., *Arachis* spp., *Areca catechu*, *Astelia fragrans*, *Astragalus cicer*, *Baikiaea plurijuga*, *Betula* spp., *Brassica* spp., *Bruguiera gymnorhiza*, *Burkea africana*, *Butea frondosa*, *Cadaba farinosa*, *Calliandra* spp., *Camellia sinensis*, *Canna indica*, *Capsicum* spp., *Cassia* spp., *Centroema pubescens*, *Chacoomeles* spp., *Cinnamomum cassia*, *Coffea arabica*, *Colopospermum mopane*, *Coronilla varia*, *Cotoneaster serotina*, *Crataegus* spp., *Cucumis* spp., *Cupressus* spp., *Cyathea dealbata*, *Cydonia oblonga*, *Cryptomeria japonica*, *Cymbopogon* spp., *Cynthea dealbata*, *Cydonia oblonga*, *Dalbergia monetaria*, *Davallia divaricata*, *Desmodium* spp., *Dicksonia squarosa*, *Dibeteropogon amplexens*, *Dioclea* spp., *Dolichos* spp., *Dorycnium rectum*, *Echinochloa pyramidalis*, *Ehaffia* spp., *Eleusine coracana*, *Eragrostis* spp., *Erythrina* spp., *Eucalyptus* spp., *Euclea schimperii*, *Eulalia villosa*, *Pagopyrum* spp., *Feijoa sellowiana*, *Fragaria* spp., *Flemingia* spp., *Freycinetia banksii*, *Geranium thunbergii*, *GinAgo biloba*, *Glycine javanica*, *Gliricidia* spp., *Gossypium hirsutum*, *Grevillea* spp., *Guibourtia coleosperma*, *Hedysarum* spp., *Hemaffhia altissima*, *Heteropogon contoffus*, *Hordeum vulgare*, *Hyperhemia rufa*, *Hypericum erectum*, *Hypeffhia dissolute*, *Indigo incamata*, *Iris* spp., *Leptarrhena pyrolifolia*, *Lepediza* spp., *Lettuca* spp., *Leucaena leucocephala*, *Loudetia simplex*, *Lotonus bainesii*, *Lotus* spp., *Macrotyloma axillare*, *Malus* spp., *Manihot esculenta*, *Medicago saliva*, *Metasequoia glyptostroboides*, *Musa sapientum*, *Nicotianum* spp., *Onobrychis* spp., *Ornithopus* spp., *Oryza* spp., *Peltophorum africanum*, *Pennisetum* spp., *Persea gratissima*, *Petunia* spp., *Phaseolus* spp., *Phoenix canariensis*, *Phormium cookianum*, *Photinia* spp., *Picea glauca*, *Pinus* spp., *Pisum sativum*, *Podocarpus totara*, *Pogonarthria fleckii*, *Pogonaffhia squarrosa*, *Populus* spp., *Prosopis cineraria*, *Pseudotsuga menziesii*, *Pterolobium stellatum*, *Pyrus communis*, *Quercus* spp., *Rhaphiolepis umbellata*, *Rhopalostylis sapida*, *Rhus natalensis*, *Ribes grossularia*, *Ribes* spp., *Robinia pseudoacacia*, *Rosa* spp., *Rubus* spp., *Salix* spp., *Schyzachyrium sanguineum*, *Sciadopitys veffillata*, *Sequoia sempervirens*, *Sequoiadendron giganteum*, *Sorghum bicolor*, *Spinacia* spp., *Sporobolus fimbriatus*, *Stiburus alopecuroides*, *Stylosanthes humilis*, *Tadehagi* spp., *Taxodium distichum*, *Themeda triandra*, *Trifolium* spp., *Triticum* spp., *Tsuga heterophylla*, *Vaccinium* spp., *Vicia* spp., *Vitis vinifera*, *Watsonia pyramidata*, *Zantedeschia aethiopica*, *Zea mays*, amaranto, alcachofa, espárragos, brócoli, coles de Bruselas, col, canola, zanahoria, coliflor, apio, acelga, lino, berza, lentejas, colza, okra, cebolla, patata, arroz, soja, paja, remolacha azucarera, caña de azúcar, girasol, tomate, té de calabaza, maíz, trigo, cebada, centeno, avena, cacahuete, arveja, lenteja y alfalfa, algodón, colza, canola, pimienta, girasol, tabaco, berenjena, eucalipto, un árbol, una planta ornamental, un hierba perenne y un cultivo forrajero. Como alternativa, pueden usarse algas y otras sustancias distintas de Viridiplantae para los métodos de la presente invención.

Según algunas realizaciones de la invención, la planta usada por el método de la invención es una planta de cultivo tal como arroz, maíz, trigo, cebada, cacahuete, patata, sésamo, olivo, aceite de palma, plátano, soja, girasol, canola, caña de azúcar, alfalfa, mijo, leguminosas (judía, guisante), lino, lupino, colza, tabaco, álamo y algodón.

La expresión del polinucleótido exógeno de la invención dentro de la planta puede efectuarse transformando una o

más células de la planta con el polinucleótido exógeno, seguido de la generación de una planta madura a partir de las células transformadas y cultivando la planta madura en condiciones adecuadas para expresar el polinucleótido exógeno dentro de la planta madura.

5 Según algunas realizaciones de la invención, la transformación se efectúa introduciendo en la célula vegetal una construcción de ácido nucleico que incluye el polinucleótido exógeno de algunas realizaciones de la invención y al menos un promotor para dirigir la transcripción del polinucleótido exógeno en una célula huésped (una célula vegetal). A continuación, se proporcionan más detalles de los enfoques de transformación adecuados.

10 Según algunas realizaciones de la invención, se proporciona una construcción de ácido nucleico que comprende el polinucleótido aislado de la invención, y un promotor para dirigir la transcripción de la secuencia de ácido nucleico en una célula huésped.

Como se emplea en esta memoria, el término "promotor" se refiere a una región de ADN que se encuentra cadena arriba del sitio de inicio transcripcional de un gen al que se une una ARN polimerasa para iniciar la transcripción de ARN. El promotor controla dónde (p. ej., qué parte de una planta) y/o cuándo (por ejemplo, en qué fase o condición en la vida de un organismo) se expresa el gen.

15 Cualquier secuencia promotora adecuada puede ser usada por la construcción de ácido nucleico de la presente invención. Preferiblemente, el promotor es un promotor constitutivo, un promotor específico de tejido o inducible por estrés abiótico.

20 Los promotores constitutivos adecuados incluyen, por ejemplo, el promotor 35S de CaMV (SEQ ID NO:777; Odell et al., Nature 313: 810-812, 1985); el promotor At6669 de Arabidopsis (SEQ ID NO:775; véase Publicación PCT No. WO04081173A2); Ubi 1 de maíz (Christensen et al., Plant Sol. Biol. 18: 675-689, 1992); actina de arroz (McElroy et al., Plant Cell 2: 163-171, 1990); pEMU (Last et al., Theor. Appl. Genet. 81: 581-588, 1991); 19S de CaMV (Nilsson et al., Physiol. Plant 100: 456-462, 1997); GOS2 (de Pater et al., Plant J Nov; 2(6): 837-44, 1992); ubiquitina (Christensen et al., Plant Mol. Biol. 18: 675-689, 1992); ciclofilina de arroz (Bucholz et al., Plant Mol Biol. 25(5): 837-43, 1994); histona H3 de maíz (Lepetit et al., Mol. Gen. Genet. 231: 276-285, 1992); Actina 2 (An et al., Plant J. 10(1): 107-121, 1996) y Súper MAS Sintético (Ni et al., The Plant Journal 7: 661-76, 1995). Otros promotores constitutivos incluyen los de las patentes de Estados Unidos No. 5.659.026; 5.608.149; 5.608.144; 5.604.121; 5.569.597; 5.466.785; 5.399.680; 5.268.463; y 5.608.142.

30 Los promotores específicos de tejido adecuados incluyen, pero no se limitan a, promotores específicos de la hoja [tales como los descritos, por ejemplo, por Yamamoto et al., Plant J. 12: 255-265, 1997; Kwon et al., Plant Physiol. 105: 357-67, 1994; Yamamoto et al., Plant Cell Physiol. 35: 773-778, 1994; Gotor et al., Plant J. 3: 509-18, 1993; Orozco et al., Plant Mol. Biol. 23: 1129-1138, 1993; y Matsuo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 9586-9590, 1993], promotores preferidos de semillas [p. ej., de genes específicos de semillas (Simon, et al., Plant Mol. Biol. 5: 191, 1985; Scofield, et al., J. Biol. Chem. 262: 12202, 1987; Baszczynski, et al., Plant Mol. Biol. 14: 633, 1990), albúmina de nuez de Brasil (Pearson' et al., Plant Mol. Biol. 18: 235-245, 1992), legumina (Ellis, et al. Plant Mol. Biol. 10: 203-214, 1988), Glutelina (arroz) (Takaiwa, et al., Mol. Gen. Genet. 208: 15-22, 1986; Takaiwa, et al., FEBS Letts. 221: 43-47, 1987), Zeína (Matzke et al Plant Mol Biol, 143). 323-32 1990), napA (Stalberg, et al, Planta 199: 515-519, 1996), SPA de trigo (Albanietal, Plant Cell, 9: 171- 184, 1997), oleosina de girasol (Cummins, et al., Plant Mol. Biol. 19: 873-876, 1992)], promotores específicos de endosperma [p. ej., LMW y HMW de trigo, glutenina-1 (Mol Gen Genet 216: 81-90, 1989; NAR 17: 461-2), gliadinas a, b y g de trigo (EMBO3: 1409-15, 1984), promotor ltrl de cebada, hordeína B1, C, D de cebada (Theor Appl Gen 98: 1253-62, 1999; Plant J 4: 343-55, 1993; Mol Gen Genet 250: 750- 60, 1996), DOF de cebada (Mena et al, The Plant Journal, 116(1): 53- 62, 1998), Biz2 (EP99106056.7), promotor sintético (Vicente-Carbajosa et al., Plant J. 13: 629-640, 1998), prolamina NRP33 de arroz, globulina G1b-1 de arroz (Wu et al, Plant Cell Physiology 39(8) 885- 889, 1998), alfa-globulina REB/OHP-1 de arroz (Nakase et al. Plant Mol. Biol. 33: 513-S22, 1997), ADP-glucosa PP de arroz (Trans Res 6: 157-68, 1997), familia del gen ESR de maíz (Plant J 12: 235-46, 1997), gamma- kafirina de sorgo (PMB 32: 1029-35, 1996)], promotores específicos de embriones [p. ej., OSH1 de arroz (Sato et al, Proc. Nati. Acad. Sci. USA, 93: 8117-8122), KNOX (Postma-Haarsma et al, Plant Mol. Biol. 39:257-71, 1999), oleosina de arroz (Wu et at, J. Biochem., 123: 386, 1998)], y promotores específicos de flores [p. ej., AtPRP4, caleno sintasa (chsA) (Van der Meer, et al., Plant Mol. Biol. 15, 95-109, 1990), LAT52 (Twel et al Mol. Gen Genet. 217:240-245; 1989), apétala-3].

50 Los promotores inducibles por estrés abiótico adecuados incluyen, pero no se limitan a, promotores inducibles por sales tales como RD29A (Yamaguchi-Shinozalei et al., Mol. Gen. Genet. 236:331-340, 1993); promotores inducibles por sequía tales como el promotor del gen rab17 de maíz (Pla et. al., Plant Mol. Biol. 21: 259-266, 1993), el promotor del gen rab28 de maíz (Busk et. al., Plant J. 11: 1285-1295, 1997) y el promotor del gen lvr2 de maíz (Pelleschi et. al., Plant Mol. Biol. 39: 373-380, 1999); promotores inducibles por calor tales como el promotor hsp80 inducible por calor de tomate (patente de Estados Unidos No. 5.187.267).

Como se ha mencionado anteriormente, y se describe adicionalmente en el ejemplo 6 de la sección de ejemplos que sigue, los inventores de la presente invención han descubierto nuevas secuencias promotoras (secuencias de ácido nucleico reguladoras) que pueden usarse para expresar un polinucleótido de interés en una planta.

Por lo tanto, según un aspecto de algunas realizaciones de la invención, se proporciona una construcción de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 779-792 y una secuencia de polinucleótido heterólogo, en donde la secuencia de ácido nucleico es capaz de regular la expresión del polinucleótido heterólogo en una célula huésped.

5 Según algunas realizaciones de la invención, el polinucleótido heterólogo está unido operativamente a la secuencia de ácido nucleico reguladora seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 779-792.

10 Según algunas realizaciones de la invención, la secuencia de ácido nucleico reguladora de la invención varía en longitud de aproximadamente 500 nucleótidos a aproximadamente 4000 nucleótidos e incluye una o más regiones de secuencia que son capaces de reconocer y unirse a la ARN polimerasa II y a otras proteínas (factores de transcripción que actúan en trans) implicadas en la transcripción.

15 Una secuencia de ácido nucleico codificante está "unida operativamente" a una secuencia reguladora si la secuencia reguladora es capaz de ejercer un efecto regulador sobre la secuencia codificante unida a la misma. Según algunas realizaciones de la invención, la secuencia reguladora está situada 1-500 pb cadena arriba del codón ATG de la secuencia de ácido nucleico codificante, aunque se apreciará que las secuencias reguladoras también pueden ejercer su efecto cuando están situadas en otra parte con respecto a la secuencia de ácido nucleico codificante (p. ej., dentro de un intrón).

20 Como se ilustra claramente en la sección de ejemplos que sigue, las novedosas secuencias de ácido nucleico reguladoras de la invención son capaces de regular la expresión de una secuencia de ácido nucleico codificante (p. ej., un gen indicador tal como GUS, luciferasa) unida operativamente a la misma (véase el ejemplo 6 de la sección de ejemplos que sigue).

Según algunas realizaciones de la invención, las secuencias de ácido nucleico reguladoras de la invención regulan la expresión del polinucleótido heterólogo de una manera específica de tejido.

Según algunas realizaciones de la invención, las secuencias de ácido nucleico reguladoras de la invención regulan la expresión del polinucleótido heterólogo de una manera específica de la fase del desarrollo.

25 Según algunas realizaciones de la invención, las secuencias de ácido nucleico reguladoras de la invención se modifican para crear variaciones en las secuencias de la molécula tales como para potenciar sus actividades de promoción, usando métodos conocidos en la técnica, tales como modificación de ADN basada en PCR o técnicas de mutagénesis de ADN estándar o sintetizando químicamente los polinucleótidos modificados.

30 Por consiguiente, las secuencias de ácido nucleico reguladoras expuestas en las SEQ ID NO:779-792 pueden truncarse o delecionarse y aún conservar la capacidad de dirigir la transcripción de una secuencia de ADN heteróloga unida operativamente. La longitud mínima de una región promotora puede determinarse eliminando sistemáticamente secuencias de los extremos 5' y 3' del polinucleótido aislado mediante técnicas estándar conocidas en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, la eliminación de fragmentos de enzimas de restricción o la digestión con nucleasas. En consecuencia, cualesquier fragmentos, partes o regiones de secuencia de las secuencias de polinucleótidos promotoras de la invención descritas pueden usarse como secuencias reguladoras. Se apreciará que las secuencias modificadas (mutadas, truncadas y similares) pueden adquirir diferentes propiedades transcripcionales tales como la dirección de diferentes patrones de expresión génica en comparación con el elemento sin modificar.

35 Opcionalmente, las secuencias expuestas en las SEQ ID NO:779-792 pueden modificarse, por ejemplo, para la expresión en una gama de sistemas de plantas. En otro enfoque, los promotores híbridos novedosos pueden diseñarse o concebirse mediante diversos métodos. Muchos promotores contienen secuencias cadena arriba que activan, potencian o definen la resistencia y/o la especificidad del promotor, tal como se describe, por ejemplo, por Atchison [Ann. Rev. Cell Biol. 4: 127 (1988)]. Los genes de ADN-T, por ejemplo, contienen cajas "TATA" que definen el sitio de inicio de la transcripción y otros elementos situados aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción modulan los niveles de transcripción [Gelvin In: Transgenic Plants (Kung, S.-D. and Us, R., Eds, San Diego: Academic Press, págs.49-87, (1988)]. Otro promotor quimérico combinó un trímero del activador de la octopina sintasa (OCS) con el activador más promotor de la mannopina sintasa (mas) y notificó un aumento en la expresión de un gen indicador [Min Ni et al. The Plant Journal 7: 661 (1995)]. Las secuencias reguladoras cadena arriba de las secuencias de polinucleótidos promotores de la invención pueden usarse para la construcción de dichos promotores quiméricos o híbridos. Los métodos para la construcción de promotores variantes incluyen, pero no se limitan a, combinar elementos de control de diferentes promotores o duplicar partes o regiones de un promotor (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos No. 5.110.732y5.097.025). Los expertos en la técnica están familiarizados con las condiciones y procedimientos específicos para la construcción, manipulación y aislamiento de macromoléculas (p. ej., moléculas de ADN, plásmidos, etc.), la generación de organismos recombinantes y el cribado y aislamiento de genes [véase, por ejemplo, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, (1989); Mailga et al., Methods in Plant Molecular Biology, Cold Spring Harbor Press, (1995); Birren et al., Genome Analysis: volumen 1, Analyzing DNA, (1997); volumen 2, Detecting Genes, (1998); volumen 3, Cloning Systems, (1999); y volumen 4, Mapping Genomes, (1999), Cold Spring Harbor, N.Y].

Según algunas realizaciones de la invención, el polinucleótido heterólogo que está regulado por la secuencia de ácido nucleico reguladora de la invención (p. ej., SEQ ID NO:779-791 o 792) comprende una secuencia de ácido nucleico que es al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 81%, al menos aproximadamente el 82 %, al menos aproximadamente el 83 %, al menos aproximadamente el 84 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 86 %, al menos aproximadamente el 87 %, al menos aproximadamente el 88 %, al menos aproximadamente el 89 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 91 %, al menos aproximadamente el 92 %, al menos aproximadamente el 93 %, al menos aproximadamente el 94 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 96 %, al menos aproximadamente el 97 %, al menos aproximadamente el 98 %, al menos aproximadamente el 99 %, p. ej., el 100% idéntica a la secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO:18, 1-16, 19-50, 101-378, 657-672, 674-706, 716-719, 724-741 y 755-763 con la condición de que la secuencia de ácido nucleico no sea como se expone en la SEQ ID NO:756 o 762.

Según algunas realizaciones de la invención, el polinucleótido heterólogo codifica una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 81 %, al menos aproximadamente el 82 %, al menos aproximadamente el 83 %, al menos aproximadamente el 84 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 86 %, al menos aproximadamente el 87 %, al menos aproximadamente el 88 %, al menos aproximadamente el 89 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 91 %, al menos aproximadamente el 92 %, al menos aproximadamente el 93 %, al menos aproximadamente el 94 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 96 %, al menos aproximadamente el 97 %, al menos aproximadamente el 98 %, al menos aproximadamente el 99 %, o más, digamos el 100 % homóloga a las SEQ ID NO::68, 51-66, 69-100, 379-656, 707-715, 720-723, 742-754, 764-771 o 772 con la condición de que la secuencia de ácido nucleico no sea como se expone en la SEQ ID NO: 765 o 771.

Según algunas realizaciones, el polinucleótido heterólogo no codifica la secuencia de aminoácidos expuesta mediante la SEQ ID NO: 809-851 u 852.

Según algunas realizaciones, el polinucleótido heterólogo no comprende la secuencia de ácido nucleico expuesta mediante la SEQ ID NO:807 u 808.

Por lo tanto, según algunas realizaciones de la invención, el método de aumento del contenido de aceite, el rendimiento, el ritmo de crecimiento, la biomasa, el vigor, la tolerancia al estrés abiótico y/o la eficiencia de uso de nitrógeno de una planta se efectúa expresando dentro de la planta una construcción de ácido nucleico de la invención que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO:779-792 y una secuencia de polinucleótidos heteróloga que comprende una secuencia de ácido nucleico al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 81%, al menos aproximadamente el 82 %, al menos aproximadamente el 83 %, al menos aproximadamente el 84 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 86 %, al menos aproximadamente el 87 %, al menos aproximadamente el 88 %, al menos aproximadamente el 89 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 91 %, al menos aproximadamente el 92 %, al menos aproximadamente el 93 %, al menos aproximadamente el 93 %, al menos aproximadamente el 94 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 96 %, al menos aproximadamente el 97 %, al menos aproximadamente el 98 %, al menos aproximadamente el 99 %, p. ej., el 100% idéntica a las SEQ ID NO:18, 1-16, 19-50, 101-378, 657-672, 674-706, 716-719, 724-741 y 755-763 con la condición de que la secuencia de ácido nucleico no sea la expuesta mediante la SEQ ID NO:756 o 762, en donde la secuencia de ácido nucleico es capaz de regular la expresión del polinucleótido heterólogo en una célula huésped.

Según algunas realizaciones de la invención, el método de aumento del contenido de aceite, el rendimiento, el ritmo de crecimiento, la biomasa, el vigor, la tolerancia al estrés abiótico y/o la eficiencia de uso de nitrógeno de una planta se efectúa expresando dentro de la planta una construcción de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO:779-792 y una secuencia de polinucleótidos heteróloga que codifica una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 81 %, al menos aproximadamente el 82 %, al menos aproximadamente el 83 %, al menos aproximadamente el 84 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 86 %, al menos aproximadamente el 87 %, al menos aproximadamente el 88 %, al menos aproximadamente el 89 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 91 %, al menos aproximadamente el 92 %, al menos aproximadamente el 93 %, al menos aproximadamente el 93 %, al menos aproximadamente el 94 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 96 %, al menos aproximadamente el 97 %, al menos aproximadamente el 98 %, al menos aproximadamente el 99 %, o más, digamos el 100 % homóloga a las SEQ ID NO::68, 51-66, 69-100, 379-656, 707-715, 720-723, 742-754, 764-771 o 772 con la condición de que la secuencia de ácido nucleico no sea como se expone en la SEQ ID NO: 765 o 771, en donde la secuencia de ácido nucleico es capaz de regular la expresión del polinucleótido heterólogo en una célula huésped.

La construcción de ácido nucleico de algunas realizaciones de la invención puede incluir además un marcador seleccionable y/o un origen de replicación apropiados. Según algunas realizaciones de la invención, la construcción de ácido nucleico utilizada es un vector lanzadera, que puede propagarse tanto en E. coli (en donde la construcción comprende un marcador seleccionable y un origen de replicación apropiados) y ser compatible con la propagación en las células. La construcción según la presente invención puede ser, por ejemplo, un plásmido, un bacémido, un

fagémido, un cósmido, un fago, un virus o un cromosoma artificial.

La construcción de ácido nucleico de algunas realizaciones de la invención puede utilizarse para transformar las células vegetales de manera estable o transitoria. En la transformación estable, el polinucleótido exógeno se integra en el genoma de la planta y, por tanto, representa un rasgo hereditario y estable. En la transformación transitoria, el polinucleótido exógeno es expresado por la célula transformada pero no se integra en el genoma y, por tanto, representa un rasgo transitorio.

Existen diversos métodos de introducción de genes extraños en plantas tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas (Potrykus, I. Annu. Rev. Plant. Physiol., Plant. Mol. Biol. (1991) 42: 205-225; Shimamoto et al., Nature (1989) 338: 274-276).

Los métodos principales para causar la integración estable de ADN exógeno en ADN genómico de plantas incluyen dos enfoques principales:

(i) transferencia de genes mediada por *Agrobacterium*: Klee et al. (1987) Annu. Rev. Plant Physiol. 38:467-486; Klee y Rogers en *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Vol. 6, Molecular Biology of Plant Nuclear Genes, eds. Schell, J., and Vasil, L. K., Academic Publishers, San Diego, Calif. (1989) p. 2-25; Gatenby, en *Plant Biotechnology*, eds. Kung, S. and Arntzen, C. J., Butterworth Publishers, Boston, Mass. (1989) p. 93-112.

(ii) captación directa de ADN: Paszkowski et al., en *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Vol. 6, Molecular Biology of Plant Nuclear Genes eds. Schell, J., and Vasil, L. K., Academic Publishers, San Diego, Calif. (1989) p. 52-68; incluyendo métodos de captación directa de ADN en protoplastos, Toriyama, K. et al. (1988) *Bio/Technology* 6: 1072-1074. Captación de ADN inducida por electrochoque breve de células vegetales: Zhang et al. *Plant Cell Rep.* (1988) 7:379-384. Fromm et al. *Nature* (1986) 319: 791-793. Inyección de ADN en células o tejidos vegetales mediante bombardeo con partículas, Klein et al. *Bio/Technology* (1988) 6: 559-563; McCabe et al. *Bio/Technology* (1988) 6: 923-926; Sanford, *Physiol. Plant.* (1990) 79:206-209; mediante el uso de sistemas con micropipeta: Neuhaus et al., *Theor. Appl. Genet.* (1987) 75:30-36; Neuhaus y Spangenberg, *Physiol. Plant.* (1990) 79:213-217; transformación con filamentos de carburo de silicio o fibra de vidrio de cultivos de células, de tejidos de embriones o de callos, patente de Estados Unidos No. 5.464.765o mediante incubación directa de ADN con polen en germinación, DeWet et al. en *Experimental Manipulation of Ovule Tissue*, eds. Chapman, G. P. and Mantell, S. H. and Daniels, W. Longman, London, (1985) p. 197-209; yOhta, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1986) 83: 715-719.

El sistema de *Agrobacterium* incluye el uso de vectores plasmídicos que contienen segmentos de ADN definidos que están integrados en el ADN genómico de la planta. Los métodos de inoculación del tejido vegetal varían dependiendo de la especie de la planta y del sistema de suministro de *Agrobacterium*. Un enfoque muy usado es el procedimiento con disco foliar que puede realizarse con cualquier explante tisular que proporcione una buena fuente para iniciar la diferenciación de toda la planta. Véase, p. ej., Horsch et al. en *Plant Molecular Biology Manual A5*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (1988) p. 1-9. Un enfoque complementario emplea el sistema de suministro de *Agrobacterium* en combinación con infiltración al vacío. El sistema de *Agrobacterium* es especialmente viable en la creación de planta dicotiledóneas transgénicas.

Existen diversos métodos de transferencia directa de ADN en las células vegetales. En la electroporación, los protoplastos se exponen brevemente a un campo eléctrico intenso. En la microinyección, el ADN se inyecta mecánicamente directamente al interior de las células usando micropipetas muy pequeñas. En el bombardeo con micropartículas, el ADN se adsorbe en microproyectiles, tales como cristales de sulfato de manganeso o partículas de tungsteno, y los microproyectiles se aceleran físicamente en el interior de las células o tejidos vegetales.

Después de la transformación estable se realiza la propagación de la planta. El método más habitual para realizar la propagación de la planta es por semillas. Sin embargo, la regeneración mediante propagación por semillas, tiene el defecto de que, debido a la heterocigosidad, hay una falta de uniformidad en el cultivo, dado que las semillas se producen por plantas según variaciones genéticas regidas por las leyes de Mendel. Básicamente, cada semilla es genéticamente diferente y cada una de ellas crecerá con sus propios rasgos específicos. Por lo tanto, se prefiere que la planta transformada se produzca de modo que la planta regenerada tenga los mismos rasgos y características que los de la planta transgénica parental. Por lo tanto, se prefiere que la planta transformada se regenere mediante micropropagación, lo que proporciona una reproducción uniforme y rápida de las plantas transformadas.

La micropropagación es un proceso de cultivo de nuevas generaciones de plantas a partir de un solo trozo de tejido que se ha extraído de una planta o variedad de cultivo parental seleccionada. Este proceso permite la reproducción masiva de las plantas que tienen el tejido preferido que expresa la proteína de fusión. Las plantas de nueva generación que se producen son genéticamente idénticas a, y tienen todas las características de, la planta original. La micropropagación permite la producción masiva de material vegetal de calidad en un corto periodo de tiempo y ofrece una rápida multiplicación de las variedades de cultivo seleccionadas en la conservación de las características de la planta transformada o transgénica original. Las ventajas de la clonación de plantas son la velocidad de la multiplicación de la planta y la calidad y uniformidad de las plantas producidas.

La micropropagación es un procedimiento de fases múltiples que requiere la alteración del medio de cultivo o de las

condiciones de cultivo entre las fases. Por lo tanto, el proceso de micropropagación implica cuatro fases básicas: fase uno, cultivo tisular inicial; fase dos, multiplicación del cultivo tisular; fase tres, diferenciación y formación de la planta; y fase cuatro, cultivo y fortalecimiento en invernadero. Durante la fase uno de cultivo tisular inicial, el cultivo tisular se establece y se verifica que está libre de contaminantes. Durante la fase dos, el cultivo tisular inicial se multiplica hasta producir un número suficiente de muestras tisulares para alcanzar los objetivos de producción. Durante la fase tres, las muestras tisulares cultivadas en la fase dos se dividen y se desarrollan en plántulas individuales. En la fase cuatro, las plántulas transformadas se transfieren a un invernadero para fortalecerse, donde la tolerancia de las plantas a la luz se aumenta gradualmente de tal manera que puedan crecer en un entorno natural.

5

10

Según algunas realizaciones de la invención, las plantas transgénicas se generan por transformación transitoria de células foliares, células meristemáticas o de toda la planta.

La transformación transitoria puede efectuarse mediante cualquiera de los métodos de transferencia directa de ADN descritos anteriormente o mediante infección vírica usando virus de plantas modificados.

15

20

Los virus que se ha demostrado que son útiles para la transformación de huéspedes vegetales incluyen CaMV, virus del mosaico del Tabaco (TMV), virus del mosaico del bromo (BMV) y Virus del Mosaico Común de la Judía (BV o BCMV). La transformación de plantas usando virus de plantas se describe en la Patente de Estados Unidos No. 4.855.237 (virus del mosaico amarillo de la judía; BGV), EP-A 67.553 (TMV), Solicitud Publicada Japonesa No. 63-14693 (TMV), EPA 194.809 (BV), EPA 278.667 (BV); y Gluzman, Y. et al., *Communications in Molecular Biology: Viral Vectors*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, págs. 172-189 (1988). En el documento WO 87/06261 se describen partículas de Pseudovirus para su uso en la expresión de ADN exógeno en muchos hospedadores, incluyendo plantas.

25

Según algunas realizaciones de la invención, el virus usado para las transformaciones transitorias es un virus avirulento y por lo tanto incapaz de causar graves síntomas tales como ritmo de crecimiento reducido, mosaico, manchas anulares, enrollamiento foliar, amarillamiento, formación de vetas, formación de pústulas, formación de tumores y picaduras. Un virus avirulento adecuado puede ser un virus avirulento de origen natural o un virus artificialmente atenuado. La atenuación de virus puede efectuarse usando métodos bien conocidos en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a, calentamiento subletal, tratamiento químico o mediante técnicas de mutagénesis dirigida, tales como las descritas, por ejemplo, por Kurihara y Watanabe (*Molecular Plant Pathology* 4:259-269, 2003), Galon et al. (1992), Atreya et al. (1992) y Huet et al. (1994).

30

35

Pueden obtenerse cepas de virus adecuadas procedentes de fuentes disponibles tales como, por ejemplo, la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) o por aislamiento de plantas infectadas. El aislamiento de virus a partir de tejidos vegetales infectados puede efectuarse por técnicas bien conocidas en la técnica, tales como las descritas, por ejemplo, por Foster y Tatlor, Eds. "Plant Virology Protocols: From Virus Isolation to Transgenic Resistance (Methods in Molecular Biology (Humana Pr), Vol 81)", Humana Press, 1998. En resumen, los tejidos de una planta infectada, que se piensa que contienen una alta concentración de un virus adecuado, preferiblemente hojas y pétalos de flores jóvenes, se cultivan en una solución tampón (p. ej., solución de tampón fosfato) para producir una savia infectada con virus que puede usarse en inoculaciones posteriores.

40

La construcción de virus de ARN de plantas para la introducción y expresión de secuencias de polinucleótidos exógenos no virales en plantas, se demuestra mediante las referencias anteriores, así como mediante Dawson, W. O. et al., *Virology* (1989) 172: 285-292; Takamatsu et al. *EMBO J.* (1987) 6: 307-311; French et al. *Science* (1986) 231: 1294-1297; Takamatsu et al. *FEBS Letters* (1990) 269:73-76; y patente de Estados Unidos No. 5.316.931.

45

50

Cuando el virus es un virus de ADN, pueden realizarse modificaciones adecuadas en el propio virus. Como alternativa, el virus puede clonarse primero en un plásmido bacteriano para facilitar la construcción del vector viral deseado con el ADN exógeno. A continuación, el virus puede extraerse del plásmido. Si el virus es un virus de ADN, al ADN viral se le puede unir un origen de replicación bacteriano, que, a continuación, es replicado por las bacterias. La transcripción y traducción de este ADN producirá la proteína de recubrimiento que encapsidará el ADN viral. Si el virus es un virus de ARN, el virus se clona generalmente como un ADNc y se inserta en un plásmido. A continuación, el plásmido se usa para fabricar todas las construcciones. El virus de ARN se produce a continuación transcribiendo la secuencia viral del plásmido y traduciendo los genes virales para producir una o más proteínas de recubrimiento que encapsidan el ARN viral.

55

En una realización, se proporciona un polinucleótido viral de planta en el que se ha insertado la secuencia codificante de la proteína de recubrimiento nativa que se ha delecionado de un polinucleótido viral, una secuencia codificante de la proteína de recubrimiento viral de una planta no nativa y un promotor no nativo, preferiblemente el promotor subgenómico de la secuencia codificante de la proteína de recubrimiento no nativa, capaz de expresión en la planta huésped, empaquetar el polinucleótido viral de la planta recombinante y garantizar una infección sistémica del huésped mediante el polinucleótido viral de la planta recombinante. Como alternativa, el gen de la proteína de recubrimiento puede inactivarse por inserción de la secuencia de polinucleótidos no nativa en su interior, de modo que se produce una proteína. El polinucleótido viral de la planta recombinante puede contener uno o más promotores subgenómicos no nativos adicionales. Cada promotor subgenómico no nativo es capaz de transcribir o

expresar genes adyacentes o secuencias de polinucleótidos en la planta huésped e incapaz de recombinarse entre sí ni con promotores subgenómicos nativos. Las secuencias de polinucleótidos (exógenas) no nativas pueden insertarse adyacentes al promotor subgenómico viral de la planta nativa o a los promotores subgenómicos virales de la planta nativa y no nativa si se incluye más de una secuencia de polinucleótidos. Las secuencias de polinucleótidos no nativas se transcriben o expresan en la planta huésped bajo el control del promotor subgenómico para producir los productos deseados.

En una segunda realización, al igual que en la primera realización, se proporciona un polinucleótido viral de planta recombinante, salvo que la secuencia codificante de la proteína de recubrimiento nativa se coloca adyacente a uno de los promotores subgenómicos de la proteína de recubrimiento no nativa en lugar de a una secuencia codificante de la proteína de recubrimiento no nativa.

En una tercera realización, se proporciona un polinucleótido viral de planta recombinante en el que el gen de la proteína de recubrimiento nativa es adyacente a su promotor subgenómico y uno o más promotores subgenómicos no nativos se han insertado en el polinucleótido viral. Los promotores subgenómicos no nativos insertados son capaces de transcribir o expresar genes adyacentes en una planta huésped e incapaces de recombinarse entre sí ni con promotores subgenómicos nativos. Las secuencias de polinucleótidos no nativas pueden insertarse adyacentes a los promotores virales de plantas subgenómicos no nativos de tal manera que las secuencias se transcriben o expresan en la planta huésped bajo el control de los promotores subgenómicos para producir el producto deseado.

En una cuarta realización, al igual que en la tercera realización, se proporciona un polinucleótido viral de planta recombinante, salvo que la secuencia codificante de la proteína de recubrimiento nativa se sustituye por una secuencia codificante de la proteína de recubrimiento no nativa.

Los vectores virales están encapsidados por las proteínas de recubrimiento codificadas por el polinucleótido viral de planta recombinante para producir un virus de planta recombinante. El polinucleótido viral de planta recombinante o virus de planta recombinante se usa para infectar plantas huésped apropiadas. El polinucleótido viral de planta recombinante puede replicarse en el huésped, propagarse sistémicamente en el huésped y transcribir o expresar uno o más genes ajenos (polinucleótido exógeno) en el huésped para producir la proteína deseada.

Técnicas para la inoculación de virus en plantas pueden encontrarse en Foster and Taylor, eds. "Plant Virology Protocols: From Virus Isolation to Transgenic Resistance (Methods in Molecular Biology (Humana Pr), Vol 81)", Humana Press, 1998; Maramorosh and Koprowski, eds. "Methods in Virology" 7 vols, Academic Press, Nueva York 1967-1984; Hill, S.A. "Methods in Plant Virology", Blackwell, Oxford, 1984; Walkey, D.G.A. "Applied Plant Virology", Wiley, Nueva York, 1985; y Kado and Agrawa, eds. "Principles and Techniques in Plant Virology", Van Nostrand-Reinhold, Nueva York.

Además de lo anterior, el polinucleótido de la presente invención también puede introducirse en un genoma de cloroplasto mediante lo cual se posibilita la expresión en el cloroplasto.

Se conoce una técnica para introducir secuencias de polinucleótidos exógenas en el genoma de los cloroplastos. Esta técnica implica los siguientes procedimientos. En primer lugar, las células vegetales se tratan químicamente para reducir el número de cloroplastos por célula a aproximadamente uno. A continuación, se introduce el polinucleótido exógeno mediante bombardeo de partículas en las células con el objetivo de introducir al menos una molécula de polinucleótido exógeno en el cloroplasto. El polinucleótido exógeno se selecciona de modo que sea integrable en el genoma del cloroplasto mediante recombinación homóloga que es fácilmente efectuada por enzimas intrínsecas al cloroplasto. Con este fin, el polinucleótido exógeno incluye, además de un gen de interés, al menos un tramo polinucleotídico que se deriva del genoma del cloroplasto. Además, el polinucleótido exógeno incluye un marcador seleccionable, que desempeña procedimientos de selección secuenciales para confirmar que todas, o sustancialmente todas, las copias de los genomas del cloroplasto, después de dicha selección, incluirán el polinucleótido exógeno. Detalles adicionales con respecto a esta técnica se encuentran en las Patentes de Estados Unidos No. 4.945.050; y 5.693.507 que se incorporan en la presente memoria como referencia. Un polipéptido puede, por lo tanto, producirse mediante el sistema de expresión de proteínas del cloroplasto y llegar a integrarse en la membrana interna del cloroplasto.

Dado que los procesos que aumentan el contenido de aceite, el rendimiento, el ritmo de crecimiento, la biomasa, el vigor, la tolerancia al estrés abiótico y/o la eficiencia de uso de nitrógeno de una planta pueden implicar múltiples genes que actúan aditivamente o en sinergia (véase, por ejemplo, en Queda et al., Plant Physiol. 130: 951-063, 2002), la presente invención también prevé expresar una pluralidad de polinucleótidos exógenos en una sola planta huésped para conseguir, de este modo, un efecto superior sobre el contenido de aceite, el rendimiento, el ritmo de crecimiento, la biomasa, el vigor, la tolerancia al estrés abiótico y/o la eficiencia de uso de nitrógeno.

La expresión de una pluralidad de polinucleótidos exógenos en una sola planta huésped puede efectuarse cointroduciendo múltiples construcciones de ácido nucleico, incluyendo cada una de ellas, un polinucleótido exógeno diferente, en una sola célula vegetal. La célula transformada puede regenerarse a continuación en una planta madura usando los métodos descritos anteriormente en la presente memoria.

Como alternativa, la expresión de una pluralidad de polinucleótidos exógenos en una sola planta huésped puede

efectuarse cointroduciendo en una sola célula vegetal una sola construcción de ácido nucleico que incluya una pluralidad de polinucleótidos exógenos diferentes. Dicha construcción puede diseñarse con una única secuencia promotora que puede transcribir un ARN mensajero policistrónico que incluyen todas las diferentes secuencias de polinucleótidos exógenas. Para permitir la cotraducción de los diferentes polipéptidos codificados por el ARN mensajero policistrónico, las secuencias de polinucleótidos pueden estar interconectadas mediante una secuencia de sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) que facilita la traducción de las secuencias de polinucleótidos situadas aguas abajo de la secuencia IRES. En este caso, una molécula de ARN policistrónico transcrita que codifica los diferentes polipéptidos descritos anteriormente se traducirá desde tanto el extremo 5' protegido y como las dos secuencias IRES internas de la molécula de ARN policistrónico para producir de este modo en la célula todos los polipéptidos diferentes. Como alternativa, la construcción puede incluir varias secuencias promotoras, cada una de ellas unida a una secuencia de polinucleótidos exógena diferente.

La célula vegetal transformada con la construcción que incluyen una pluralidad de polinucleótidos exógenos diferentes puede regenerarse a una planta madura, usando los métodos descritos anteriormente en la presente memoria.

Como alternativa, la expresión de una pluralidad de polinucleótidos exógenos en una sola planta huésped puede efectuarse introduciendo diferentes construcciones de ácido nucleico, que incluyen diferentes polinucleótidos exógenos, en una pluralidad de células vegetales. A continuación, las plantas transformadas regeneradas pueden cruzarse y la progenie resultante puede seleccionarse con respecto a rasgos superiores de tolerancia al estrés abiótico, crecimiento, biomasa, rendimiento, vigor y/o eficiencia de uso de nitrógeno, usando técnicas convencionales de cultivo de plantas.

Como se ha mencionado anteriormente, y se describe adicionalmente en el ejemplo 9 de la sección de ejemplos que sigue, los inventores de la presente invención han descubierto que la regulación negativa del nivel de expresión del producto del gen BDL127 (p. ej., los polinucleótidos expuestos mediante la SEQ ID NO:17 o 673; o el polipéptido expuesto mediante la SEQ ID NO:67) y/o de homólogos de los mismos se puede usar para aumentar el rendimiento (p. ej., rendimiento de semillas), el contenido de aceite, la biomasa, el ritmo de crecimiento, el vigor, la TEAB y/o la EUN en una planta.

En algunos casos, la sobreexpresión del polinucleótido exógeno dentro de la planta puede dar como resultado el silenciamiento del polinucleótido endógeno (que es homólogo del polinucleótido exógeno), probablemente a través de mecanismos de interferencia o de cosupresión de ARN. Para ensayar el efecto de la regulación negativa del o los polinucleótidos de la invención sobre el rasgo deseado de la planta (p. ej., rendimiento de planta, contenido de aceite, biomasa, vigor, TEAB o EUN), se pueden usar diversos métodos y agentes de regulación negativa.

La regulación negativa (silenciamiento génico) del producto de transcripción o de traducción de un gen endógeno tal como BDL127 puede conseguirse mediante métodos que son bien conocidos en la técnica, p. ej., cosupresión, supresión antisentido, interferencia de ARN y moléculas de polinucleótido de ribozima, cambiando la estructura del promotor, eliminación o creación de sitios de unión del factor de transcripción o expresión bajo diferentes promotores. Las directrices para efectuarlos se proporcionan a continuación.

Cosupresión (supresión sentido) - La inhibición del gen endógeno se puede conseguir por cosupresión, usando una molécula de ARN (o un vector de expresión que codifica la misma) que está en la orientación sentido con respecto a la dirección de transcripción del gen endógeno. El polinucleótido usado para la cosupresión puede corresponder a toda o a parte de la secuencia codificante del polipéptido endógeno y/o a toda o parte de la región no traducida 5' y/o 3' del transcrito endógeno; también puede ser un ARN no poliadenilado; un ARN que carece de una estructura protectora en 5'; o un ARN que contiene un intrón que no puede someterse a corte y empalme. En algunas realizaciones, el polinucleótido usado para la cosupresión está diseñado para eliminar el codón de inicio del polinucleótido endógeno de modo que no se traducirá ningún producto de proteína. Sin embargo, como con la supresión antisentido, la eficacia supresora mejora a medida que aumenta la especificidad de la hibridación, p. ej., a medida que se alarga la secuencia introducida, y/o aumenta la similitud de secuencia entre la secuencia introducida y el gen endógeno. Para más detalles, véase las patentes de Estados Unidos No. 20050172364 y No. 5.231.020 que se incorporan en la presente memoria como referencia en su totalidad.

Según algunas realizaciones de la invención, el polinucleótido exógeno comprende una secuencia de ácido nucleico intraducible, p. ej., una secuencia que comprende uno o más codones de terminación pre-maduros, o mutaciones sin sentido, tal como se describe en la patente de Estados Unidos 5.583.021.

Según algunas realizaciones de la invención, la regulación negativa del gen endógeno se realiza usando un vector de expresión de amplicón que comprende una secuencia derivada de virus de planta que contiene todo o parte del gen diana pero generalmente no todos los genes del virus nativo. Las secuencias virales presentes en el producto de transcripción del vector de expresión permiten que el producto de transcripción dirija su propia replicación. Los transcritos producidos por el amplicón pueden ser sentido o antisentido con respecto a la secuencia diana [véase, por ejemplo, Angell y Baulcombe, (1997) EMBO J. 16: 3675-3684; Angell y Baulcombe, (1999) Plant J. 20: 357-362, y la patente de Estados Unidos No. 6.646.805, cada una de las cuales se incorpora en la presente memoria como referencia].

Según algunas realizaciones de la invención, el polinucleótido exógeno comprende una secuencia de ácido nucleico intraducible, p. ej., una secuencia que comprende uno o más codones de terminación pre-maduros, o mutaciones sin sentido, tal como se describe en la patente de Estados Unidos 5.583.021.

5 **Supresión antisentido** - La supresión antisentido puede realizarse usando un polinucleótido antisentido o un vector de expresión que está diseñado para expresar una molécula de ARN complementaria a todo o parte del ARN mensajero (ARNm) que codifica el polipéptido endógeno y/o a toda o parte de la región no traducida 5' y/o 3' del gen endógeno. La sobreexpresión de la molécula de ARN antisentido puede dar como resultado una expresión reducida del gen nativo (endógeno). El polinucleótido antisentido puede ser completamente complementario a la secuencia diana (es decir, 100 % idéntico al complemento de la secuencia diana) o parcialmente complementario a la
10 secuencia diana (es decir, menos del 100 % idéntico, p. ej., menos del 90 %, menos que 80 % idéntico al complemento de la secuencia diana). La supresión antisentido puede usarse para inhibir la expresión de proteínas múltiples en la misma planta (véase, p.ej., la patente de Estados Unidos No. 5.942.657). Además, pueden usarse partes de los nucleótidos antisentido para interrumpir la expresión del gen diana. Generalmente, pueden usarse secuencias de al menos aproximadamente 50 nucleótidos, al menos aproximadamente 100 nucleótidos, al menos
15 aproximadamente 200 nucleótidos, al menos aproximadamente 300, al menos aproximadamente 400, al menos aproximadamente 450, al menos aproximadamente 500, al menos aproximadamente 550 o más. Los métodos de uso de la supresión antisentido para inhibir la expresión de genes endógenos en plantas se describen, por ejemplo, en Liu, et al., (2002) Plant Physiol. 129: 1732-1743 y la patente de Estados Unidos No. 5.759.829 y 5.942.657, cada uno de los cuales se incorpora en la presente memoria como referencia. La eficacia de la supresión antisentido
20 puede aumentarse incluyendo una región poli-dT en el casete de expresión en una posición 3' con respecto a la secuencia antisentido y 5' respecto a la señal de poliadenilación [véase, la publicación de patente de Estados Unidos No. 20020048814, incorporada en la presente memoria como referencia].

25 **Interferencia de ARN** - La interferencia de ARN puede conseguirse usando un polinucleótido que puede hibridar consigo mismo y formar un ARN bicatenario que tiene una estructura de tallo-bucle (también denominada estructura en horquilla) o usando dos polinucleótidos que forman un ARN bicatenario.

Para la interferencia de ARN en horquilla (ARNh), el vector de expresión está diseñado para expresar una molécula de ARN que hibrida consigo misma para formar una estructura en horquilla que comprende una región de bucle monocatenaria y un tallo con bases emparejadas.

30 En algunas realizaciones de la invención, la región del tallo con bases emparejadas de la molécula de ARNh determina la especificidad de la interferencia de ARN. En esta configuración, la secuencia sentido de la región del tallo con bases emparejadas puede corresponder a todo o parte del ARNm endógeno a regular negativamente, o a una parte de una secuencia promotora que controla la expresión del gen endógeno a inhibir; y la secuencia antisentido de la región del tallo con bases emparejadas es total o parcialmente complementaria a la secuencia sentido. Dichas moléculas de ARNh son altamente eficaces para inhibir la expresión de genes endógenos, de una
35 manera que es heredada por generaciones posteriores de plantas [véase, p. ej., Chuang y Meyerowitz, (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 4985-4990; Stoutjesdijk, et al., (2002) Plant Physiol. 129: 1723-1731; y Waterhouse y Helliwell, (2003) Nat. Rev. Genet. 4: 29-38; Chuang y Meyerowitz, (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 4985-4990; Pandolfini et al., BMC Biotechnology 3: 7; Panstruga, et al., (2003) Mol. Biol. Rep. 30: 135-140; y publicación de patente de Estados Unidos No. 2003/0175965; cada uno de los cuales se incorpora como referencia].

40 Según algunas realizaciones de la invención, la secuencia sentido del tallo con bases emparejadas es de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 2.500 nucleótidos de longitud, p. ej., de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 500 nucleótidos, p. ej., de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 300 nucleótidos, p. ej., de aproximadamente 20 nucleótidos a aproximadamente 100 nucleótidos, p. ej., o de aproximadamente 25 nucleótidos a aproximadamente 100 nucleótidos.

45 Según algunas realizaciones de la invención, la secuencia antisentido del tallo con bases emparejadas puede tener una longitud que es más corta, igual o mayor que la longitud de la secuencia sentido correspondiente.

Según algunas realizaciones de la invención, la parte de bucle del ARNh puede ser de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 500 nucleótidos de longitud, por ejemplo, de aproximadamente 15 nucleótidos a
50 aproximadamente 100 nucleótidos, de aproximadamente 20 nucleótidos a aproximadamente 300 nucleótidos o de aproximadamente 25 nucleótidos a aproximadamente 400 nucleótidos de longitud.

Según algunas realizaciones de la invención, la parte de bucle del ARNh puede incluir un intrón (iARNh), que es capaz de someterse a corte y empalme en la célula huésped. El uso de un intrón minimiza el tamaño del bucle en la molécula de ARN en horquilla después del corte y empalme y, por lo tanto, aumenta la eficacia de la interferencia [véase, por ejemplo, Smith, et al., (2000) Nature 407: 319-320; Wesley, et al., (2001) Plant J. 27: 581-590; Wang y Waterhouse, (2001) Curr. Opin. Plant Biol. 5: 146-150; Helliwell y Waterhouse, (2003) Methods 30: 289-295; Brummell, et al. (2003) Plant J. 33: 793-800; y publicación de patente de Estados Unidos No. 2003/0180945; WO 98/53083; WO 99/32619; WO 98/36083; WO 99/53050; US 20040214330; US 20030180945; patente de Estados Unidos No. 5.034.323; patente de Estados Unidos No. 6.452.067; patente de Estados Unidos No. 6.777.588; patente de Estados Unidos No. 6.573.099 y patente de Estados Unidos No. 6.326.527; cada uno de los cuales se incorpora

en la presente memoria como referencia].

En algunas realizaciones de la invención, la región de bucle del ARN en horquilla determina la especificidad de la interferencia de ARN respecto a su ARN endógeno diana. En esta configuración, la secuencia de bucle corresponde a todo o parte del ARN mensajero endógeno del gen diana. Véase, por ejemplo, WO 02/00904; Mette, et al., (2000) EMBO J 19: 5194-5201; Matzke, et al., (2001) Curr. Opin. Genet. Devel. 11: 221-227; Scheid, et al., (2002) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 99: 13659-13662; Aufsatz, et al., (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. 99(4): 16499-16506; Sijen, et al., Curr. Biol. (2001) 11: 436-440), cada uno de los cuales se incorpora en la presente memoria como referencia.

Para la interferencia de ARN bicatenario (ARNbc), las moléculas de ARN sentido y antisentido se pueden expresar en la misma célula a partir de un único vector de expresión (que comprende secuencias de ambas cadenas) o a partir de dos vectores de expresión (comprendiendo cada uno la secuencia de una de las cadenas). Los métodos para usar la interferencia de ARNbc para inhibir la expresión de genes vegetales endógenos se describen en Waterhouse, et al., (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 13959-13964; y WO 99/49029, WO 99/53050, WO 99/61631, y WO 00/49035; cada uno de los cuales se incorpora en la presente memoria como referencia.

Según algunas realizaciones de la invención, la interferencia de ARN se efectúa usando un vector de expresión diseñado para expresar una molécula de ARN que se modela en un gen de micro ARN endógeno (miARN). Los microARN (miARN) son agentes reguladores que consisten en aproximadamente 22 ribonucleótidos y altamente eficientes para inhibir la expresión de genes endógenos [Javier, et al., (2003) Nature 425: 257-263]. El gen de miARN codifica un ARN que forma una estructura en horquilla que contiene una secuencia de 22 nucleótidos que es complementaria al gen diana endógeno.

Ribozima - las moléculas de ARN catalíticas, ribozimas, están diseñadas para escindir transcritos de ARNm particulares, evitando de este modo la expresión de sus polipéptidos codificados. Las ribozimas escinden ARNm en secuencias de reconocimiento específicas de sitio. Por ejemplo, las "ribozimas de cabeza de martillo" (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 5.254.678) escinden ARNm en ubicaciones dictadas por regiones flanqueantes que forman pares de bases complementarios con el ARNm diana. El único requisito es que el ARN diana contenga una secuencia de nucleótidos 5'-UG-3'. Las secuencias de ribozimas de cabeza de martillo se pueden incrustar en un ARN estable tal como un ARN de transferencia (ARNt) para aumentar la eficacia de escisión *in vivo* [Perriman et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92(13): 6175-6179; de Feyter y Gaudron Methods in Molecular Biology, Vol. 74, Capítulo 43, "Expressing Ribozymes in Plants", Editado por Turner, P. C, Humana Press Inc., Totowa, N.J.; patente de Estados Unidos No. 6.423.885]. Las endorribonucleasas de ARN tales como las encontradas en *Tetrahymena thermophila* son también ribozimas útiles (patente de Estados Unidos No. 4.987.071).

Las líneas de plantas transformadas con cualquiera de las moléculas reguladoras negativamente descritas anteriormente se criban para identificar las que muestran la mayor inhibición del polinucleótido o polipéptido de interés endógeno y, de este modo, el aumento del rasgo de las plantas deseado (p. ej., rendimiento, contenido de aceite, ritmo de crecimiento, biomasa, vigor, EUN y/o TEAB).

Por lo tanto, la invención abarca plantas que expresan de forma exógena el o los polinucleótidos, las construcciones de ácido nucleico y/o el o los polipéptidos de la invención. Una vez expresado dentro de la célula vegetal o la planta completa, el nivel del polipéptido codificado por el polinucleótido exógeno puede determinarse mediante métodos bien conocidos en la técnica tales como ensayos de actividad, transferencias de Western usando anticuerpos capaces de unirse específicamente al polipéptido, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayos (RIA), inmunohistoquímica, inmunocitoquímica, inmunofluorescencia y similares.

El nivel de una molécula de ARN de interés en la planta [p. ej., el ARN transcrito a partir del polinucleótido exógeno de la invención o el ARN endógeno que está dirigido por la molécula reguladora negativamente de la invención] puede determinarse usando métodos bien conocidos en la técnica tal como análisis de transferencia de Northern, análisis de reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) (incluyendo RT-PCR cuantitativa, semicuantitativa o en tiempo real) e hibridación *in situ* de ARN.

El homólogo endógeno del polinucleótido o polipéptido exógeno de la invención, o un fragmento del homólogo endógeno (p. ej., intrones o regiones sin traducir) en la planta puede usarse como un marcador para selección asistida por marcador (MAS), en la que se usa un marcador para la selección indirecta de un determinante o determinantes genéticos de un rasgo de interés (p. ej., biomasa, ritmo de crecimiento, contenido de aceite, rendimiento, tolerancia al estrés abiótico y/o eficiencia de uso de nitrógeno). Estos genes (secuencia de ADN o ARN) pueden contener o estar ligados a sitios polimórficos o marcadores genéticos en el genoma, tales como polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), microsátelites y polimorfismo de nucleótido único (SNP), huella genética de ADN (DFP), polimorfismo de longitud de fragmento amplificada (AFLP), polimorfismo de nivel de expresión, polimorfismo del polipéptido codificado y cualquier otro polimorfismo en la secuencia de ADN o ARN.

Los ejemplos de selecciones asistidas por marcador incluyen, pero no se limitan a, seleccionar un rasgo morfológico (p. ej., un gen que afecta a la forma, coloración, esterilidad masculina o resistencia tal como la presencia o ausencia de arista, coloración de la vaina foliar, altura, color del grano, aroma de arroz); selección para un rasgo bioquímico (p. ej., un gen que codifica una proteína que se puede extraer y observar, por ejemplo, isozimas y proteínas de

almacenamiento); selección para un rasgo biológico (p. ej., razas de patógenos o biotipos de insectos basados en el patógeno del huésped, o la interacción del parásito con el huésped se puede usar como un marcador, dado que la constitución genética de un organismo puede afectar a su susceptibilidad a patógenos o parásitos).

5 Los polinucleótidos y polipéptidos descritos anteriormente en la presente memoria pueden usarse en una amplia gama de plantas económicas, de manera segura y rentable.

Las líneas de plantas que expresan de forma exógena el polinucleótido o el polipéptido de la invención se criban para identificar aquellas que muestran el mayor aumento del rasgo de la planta deseado.

10 El efecto del transgén (el polinucleótido exógeno que codifica el polipéptido de la invención) o la molécula de regulación negativa (p.ej., molécula de interferencia de ARN) sobre la tolerancia al estrés abiótico se puede determinar usando métodos conocidos.

Tolerancia al estrés abiótico - Plantas transformadas (es decir, que expresan el transgén) y no transformadas (de tipo silvestre) se exponen a una condición de estrés abiótico, tal como privación de agua, temperatura subóptima (baja temperatura, alta temperatura), déficit de nutrientes, exceso de nutrientes, una condición de estrés salino, estrés osmótico, toxicidad por metales pesados, anaerobiosis, contaminación atmosférica e irradiación por UV.

15 **Ensayo de tolerancia a la salinidad** - Se espera que las plantas transgénicas con tolerancia a altas concentraciones de sal presenten mejor germinación, vigor o crecimiento de las semillas en condiciones con alto contenido en sal. El estrés salino puede efectuarse de muchas maneras, tales como, por ejemplo, regando las plantas con una solución hiperosmótica, cultivando las plantas hidropónicamente en una solución de cultivo hiperosmótica (p. ej., solución de Hoagland) o cultivando las plantas en un medio de cultivo hiperosmótico [p. ej., medio Murashige-Skoog (medio MS) al 50 %]. Dado que las diferentes plantas varían considerablemente en cuanto a su tolerancia con respecto a la salinidad, la concentración salina en el agua de riego, en la solución de cultivo o en el medio de cultivo, pueden ajustarse según las características específicas de la variedad de cultivo o variedad específica de una planta, para causar un efecto leve o moderado sobre la fisiología y/o morfología de las plantas (para una orientación sobre la concentración apropiada véase, Bernstein y Kafkafi, Root Growth Under Salinity Stress In: Plant Roots, The Hidden Half 3rd ed. Waisel Y, Eshel A and Kafkafi U. (editores) Marcel Dekker Inc., Nueva York, 2002, y referencias en su interior).

30 Por ejemplo, puede realizarse un ensayo de tolerancia a la salinidad regando plantas en diferentes fases de desarrollo con concentraciones en aumento de cloruro de sodio (por ejemplo, NaCl 50 mM, 100 mM, 200 mM, 400 mM) aplicadas desde abajo y desde arriba para garantizar la dispersión homogénea de la sal. Después de la exposición a la condición de estrés, las plantas se monitorizan frecuentemente hasta que aparecen efectos fisiológicos y/o morfológicos sustanciales en las plantas de tipo silvestre. Por lo tanto, el aspecto fenotípico externo, el grado de marchitamiento y el éxito global en alcanzar la madurez y producir descendencia se comparan entre las plantas de control y las transgénicas. Los parámetros cuantitativos de tolerancia medidos incluyen, pero no se limitan a, humedad promedio y peso seco, el peso de las semillas producidas, el tamaño promedio de la semilla y el número de semillas producidas por planta. Las plantas transformadas que no exhiben efectos fisiológicos y/o morfológicos sustanciales, o que exhiben mayor biomasa en comparación con las plantas de tipo silvestre, se identifican como plantas tolerantes al estrés abiótico.

40 **Ensayo de tolerancia osmótica** - Se realizan ensayos de estrés osmótico (que incluyen análisis de cloruro de sodio y manitol) para determinar si un fenotipo de estrés osmótico era específico del cloruro de sodio o si era un fenotipo relacionado con el estrés osmótico general. Las plantas que son tolerantes al estrés osmótico pueden tener más tolerancia a la sequía y/o la congelación. Para experimentos de germinación con estrés salino y osmótico, el medio se suplementa, por ejemplo, con NaCl 50 mM, 100 mM, 200 mM o NaCl 100 mM, 200 mM, manitol 400 mM.

45 **Ensayo de tolerancia a la sequía/ensayo osmótico** - La tolerancia a la sequía se realiza para identificar los genes que confieren una mejor supervivencia de la planta después de la privación aguda de agua. Para analizar si las plantas transgénicas son más tolerantes a la sequía, se realiza un estrés osmótico producido por la presencia de sorbitol o polietilenglicol (PEG 8000) en el medio. Las plantas de control y transgénicas se hacen germinar y se cultivan en placas de agar para plantas durante 10 días, después de lo cual se transfieren a placas que contienen 1,5 % de PEG8000 o 500 mM de sorbitol. Las plantas se cultivan durante aproximadamente 10 días adicionales. El tratamiento causa un retraso en el crecimiento, a continuación, se comparan tanto las plantas de control como las transgénicas, midiendo el peso de la planta (fresco y seco), el rendimiento y los ritmos de crecimiento.

55 Por el contrario, se realizan exploraciones de sequía basadas en suelo con plantas que sobreexpresan los polinucleótidos detallados anteriormente. Las semillas de plantas de control de Arabidopsis, o de otras plantas transgénicas que sobreexpresan el polipéptido de la invención germinan y se transfieren a macetas. El estrés por sequía se obtiene después de parar de regar, acompañado por la colocación de las macetas sobre papel absorbente para potenciar la tasa de secado del suelo. Las plantas transgénicas y de control se comparan entre sí cuando la mayoría de las plantas de control desarrollan marchitamiento severo. Las plantas vuelven a regarse después de obtener una fracción significativa de plantas de control que presentan un marchitamiento severo. Las plantas se clasifican comparando los controles para cada uno de dos criterios: tolerancia a las condiciones de sequía y

recuperación (supervivencia) después de volver a regar.

Tolerancia al estrés por frío - Para analizar el estrés por frío, plantas maduras (25 días de edad) se transfirieron a cámaras a 4 °C durante 1 o 2 semanas, con luz constitutiva. Después las plantas se vuelven a llevar al invernadero. Dos semanas después, se comparan los daños del periodo de enfriamiento, resultantes del retraso del crecimiento y otros fenotipos, entre las plantas de control y las transgénicas, midiendo el peso de la planta (húmedo y seco), y comparando los ritmos de crecimiento medidos como tiempo de floración, tamaño de la planta, rendimiento y similares.

Tolerancia al estrés por calor - La tolerancia al estrés por calor se consigue exponiendo las plantas a temperaturas por encima de 34 °C durante un periodo de tiempo determinado. La tolerancia de la planta se examina después de transferir las plantas de nuevo a 22 °C para su recuperación y evaluación después de 5 días con respecto a controles internos (plantas no transgénicas) o plantas no expuestas ni a estrés por frío ni a estrés por calor.

Ensayos de germinación - Los ensayos de germinación comparan el porcentaje de semillas de plantas transgénicas que podrían completar el proceso de germinación con el porcentaje de semillas de plantas de control que se tratan de la misma manera. Se consideran condiciones normales, por ejemplo, incubaciones a 22 °C en ciclos diarios de 22 horas de luz, 2 horas de oscuridad. La evaluación de la germinación y el vigor de las plántulas se lleva a cabo entre 4 y 14 días después de la siembra. El medio basal es medio MS al 50 % (Murashige y Skoog, 1962 Plant Physiology 15, 473-497).

La germinación se verifica también en condiciones desfavorables, tales como frío (incubando a temperaturas inferiores a 10 °C en lugar de 22 °C) o usando soluciones de inhibición de semillas que contienen altas concentraciones de un osmolito tal como sorbitol (a concentraciones de 50 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM, 500 mM y hasta 1000 mM) o aplicando concentraciones crecientes de sal (NaCl 50 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM, 500 mM).

El efecto del transgén (el polinucleótido exógeno que codifica el polipéptido de la invención) o la molécula de regulación negativa (p.ej., molécula de interferencia de ARN) sobre la eficiencia de uso de nitrógeno se puede determinar usando métodos conocidos.

Ensayo de eficiencia de uso de nitrógeno usando plántulas - En resumen, las plantas transgénicas que se cultivan durante 7-10 días en 0,5 x MS [Murashige-Skoog] suplementado con un agente de selección se transfieren a dos condiciones de fertilización con nitrógeno: medio MS en el que la concentración de nitrógeno combinada (NH_4NO_3 y KNO_3) fue 0,75 mM (deficiencia de nitrógeno). Habitualmente, 20 plantas seleccionadas al azar de cada evento de un gen se transfieren a los medios. Las plantas se dejan crecer por 10 días adicionales. Al final de los 10 días, las plantas se retiran de la placa y se pesan inmediatamente (peso fresco) y a continuación se secan durante 24 y se vuelven a pesar (peso seco para análisis estadísticos posteriores). Las plantas transgénicas se comparan con plantas de control cultivadas en paralelo en las mismas condiciones. Las plantas transgénicas simuladas usadas como control pueden ser aquellas plantas transgénicas que expresan el gen indicador uidA (GUS) bajo el mismo promotor o plantas transgénicas que albergan sólo el mismo promotor pero que carecen de cualquier gen indicador.

Concentración de proteína en el grano - El contenido de proteína en el grano (g de proteína en el grano m^{-2}) se estima como el producto de la masa de grano N (g de grano N m^{-2}) multiplicado por la relación de conversión N/proteína de k-5,13 (Mosse 1990, anteriormente). La concentración de proteína en el grano se estima como la proporción de contenido de proteína en el grano por unidad de masa del grano (g proteína en el grano kg^{-1} grano).

El efecto del transgén (el polinucleótido exógeno que codifica el polipéptido de la invención) o la molécula de regulación negativa (p.ej., molécula de interferencia de ARN) sobre el vigor de la planta, el ritmo de crecimiento, la biomasa, el rendimiento y/o el contenido de aceite se puede determinar usando métodos conocidos.

Vigor de la planta - El vigor de la planta puede calcularse mediante el aumento de los parámetros de crecimiento tales como el área foliar, la longitud de la fibra, el diámetro de la roseta, el peso fresco de la planta y similares, por tiempo.

Ritmo de crecimiento - El ritmo de crecimiento puede medirse usando el análisis digital de plantas en crecimiento. Por ejemplo, las imágenes de plantas que crecen en invernadero sobre la base de la parcela se pueden capturar cada 3 días y el área de la roseta se puede calcular mediante análisis digital. El crecimiento del área de la roseta se calcula usando la diferencia del área de la roseta entre los días de muestreo dividida por la diferencia en días entre las muestras.

La evaluación del ritmo de crecimiento puede realizarse midiendo la biomasa producida, el área de la roseta, el tamaño de la hoja o la longitud de la raíz por tiempo (puede medirse en cm^2 por día de área foliar).

El área de crecimiento relativo puede calcularse usando la fórmula I.

Fórmula I:

$$\text{Ritmo de crecimiento relativo del área} = (\Delta \text{Área} / \Delta t) \times (1 / \text{Área } t_0)$$

Δt es el actual día de imagen analizado al que se le resta el día inicial ($t-t_0$).

Por lo tanto, el ritmo de crecimiento relativo del área está en unidades de 1/día y el ritmo de crecimiento en longitud está en unidades de 1/día.

5 **Rendimiento de semillas**- la evaluación del rendimiento de semillas por planta se puede realizar midiendo la cuantía (peso o tamaño) o la cantidad (es decir, número) de semillas secas producidas y cosechadas a partir de 8-16 plantas y divididas por el número de plantas.

10 Por ejemplo, las semillas totales de 8-16 plantas se pueden recoger, pesar usando, p. ej., una balanza analítica y el peso total se puede dividir por el número de plantas. El rendimiento de semillas por área de cultivo puede calcularse de la misma manera, teniendo en cuenta el área de cultivo otorgada a una sola planta. Se podría conseguir aumentar el rendimiento de semillas por área de cultivo aumentando el rendimiento de semillas por planta, y/o aumentando el número de plantas capaces de crecer en un área determinada.

15 Además, el rendimiento de semillas se puede determinar mediante el peso de 1000 semillas. El peso de 1000 semillas se puede determinar de la siguiente manera: las semillas se dispersan en una bandeja de vidrio y se toma una fotografía. Cada muestra se pesa y, a continuación, usando el análisis digital, se calcula el número de semillas en cada muestra.

El peso de 1000 semillas se puede calcular usando la fórmula II:

Fórmula II:

$$\text{Peso de 1000 semillas} = \text{número de semillas en la muestra} / \text{peso de la muestra} \times 1000$$

El índice de cosecha se puede calcular usando la fórmula III

Fórmula III:

20 Índice de cosecha = rendimiento de semillas promedio por planta/peso seco promedio

25 **Longitud de la fibra** - la longitud de la fibra se puede medir con fibrografía. El sistema de fibrografía se usó para calcular la longitud en términos de la longitud "media de la mitad superior". La media de la mitad superior (UHM) es la longitud promedio de la mitad más larga de la distribución de la fibra. El fibrograma mide la longitud en longitudes de tramo en un punto porcentual dado (Hypertext Transfer Protocol://World Wide Web (.) cottoninc (.) com/ClassificationofCotton/?Pg=4#Length).

30 **Contenido de aceite** - El contenido de aceite de una planta se puede determinar mediante la extracción del aceite de la semilla o la parte vegetativa de la planta. En resumen, los lípidos (aceite) se pueden eliminar de la planta (p. ej., semilla) moliendo el tejido vegetal en presencia de disolventes específicos (p. ej., hexano o éter de petróleo) y extrayendo el aceite en un extractor continuo. El análisis del contenido de aceite indirecto se puede llevar a cabo usando diversos métodos conocidos tales como Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), que mide la energía de resonancia absorbida por átomos de hidrógeno en el estado líquido de la muestra [Véase, por ejemplo, Conway TF. y Earle FR., 1963, Journal of the American Oil Chemists' Society; Springer Berlin / Heidelberg, ISSN: 0003-021X (Imprimir) 1558-9331 (En línea)]; la Espectroscopía de Infrarrojo Cercano (IC), que utiliza la absorción de energía infrarroja cercana (1100-2500 nm) por la muestra; y un método descrito en el documento WO/2001/023884, que se basa en extraer un disolvente de aceite, evaporar el disolvente en una corriente de gas que forma partículas de aceite y dirigir una luz a la corriente de gas y partículas de aceite que forman una luz reflejada detectable.

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

Cualquiera de las plantas transgénicas descritas anteriormente en la presente memoria o partes de las mismas se pueden procesar para producir una preparación de pienso, harina, proteínas o aceite, tal como para animales rumiantes.

45 Las plantas transgénicas descritas anteriormente en la presente memoria, que exhiben un contenido de aceite aumentado, pueden usarse para producir aceite vegetal (extrayendo el aceite de la planta).

El aceite vegetal (que incluye el aceite de la semilla y/o el aceite de la parte vegetativa) producido según el método de la invención se puede combinar con una variedad de otros ingredientes. Los ingredientes específicos incluidos en un producto se determinan según el uso previsto. Los productos ejemplares incluyen pienso para animales, materia

- prima para modificación química, plástico biodegradable, producto alimenticio mezclado, aceite comestible, biocombustible, aceite de cocina, lubricante, biodiesel, aperitivo, cosméticos y materia prima del proceso de fermentación. Los productos ejemplares que se incorporarán al aceite vegetal incluyen alimentos para animales, productos alimenticios humanos como aperitivos extruidos, panes, como agente aglutinante de alimentos, alimentos acuícolas, mezclas fermentables, suplementos alimenticios, bebidas deportivas, barritas alimenticias nutricionales, suplementos multivitamínicos, bebidas dietéticas y cereales.
- 5 Según algunas realizaciones de la invención, el aceite comprende un aceite de semilla.
- Según algunas realizaciones de la invención, el aceite comprende un aceite de parte vegetativa.
- Según algunas realizaciones de la invención, la célula vegetal forma una parte de una planta.
- 10 Como se usa en esta memoria, el término "aproximadamente" se refiere a $\pm 10\%$.
- Los términos "comprende", "que comprende", "incluye", "que incluye", "que tiene" y sus conjugados significan "que incluyen pero no se limitan a".
- El término "que consiste en" significa "que incluye y se limita a".
- 15 El término "consiste esencialmente en" significa que la composición, el método o la estructura pueden incluir ingredientes, etapas y/o partes adicionales, pero sólo si los ingredientes, etapas y/o partes adicionales no alteran materialmente las características básicas y novedosas de la composición, método o estructura reivindicada.
- Como se usa en esta memoria, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, la expresión "un compuesto" o "al menos un compuesto" puede incluir una pluralidad de compuestos, incluyendo mezclas de los mismos.
- 20 En toda esta solicitud, se pueden presentar diversas realizaciones de esta invención en un formato de intervalo. Debe entenderse que la descripción en formato de intervalo es simplemente por conveniencia y brevedad y no debe interpretarse como una limitación inflexible del alcance de la invención. Por consiguiente, debe considerarse que la descripción de un intervalo ha descrito específicamente todos los posibles subintervalos así como los valores numéricos individuales dentro de ese intervalo. Por ejemplo, debe considerarse que la descripción de un intervalo como de 1 a 6 ha descrito específicamente subintervalos tales como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6, etc., así como números individuales dentro de ese intervalo, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Esto se aplica independientemente de la amplitud del intervalo.
- 25 Siempre que se indique un intervalo numérico en esta memoria, se pretende que incluya cualquier número citado (fraccional o número entero) dentro del intervalo indicado. Las frases "que varía/varía entre" un primer número indicado y un segundo número indicado y "que varía/varía entre" un primer número indicado "y" un segundo número indicado se usan indistintamente y pretenden incluir los primer y segundo números indicados y todos los números fraccionarios y enteros entre ellos.
- 30 Como se usa en esta memoria, el término "método" se refiere a maneras, medios, técnicas y procedimientos para llevar a cabo una tarea determinada incluyendo, pero sin limitarse a, maneras, medios, técnicas y procedimientos conocidos, o fácilmente desarrollados a partir de maneras, medios, técnicas y procedimientos conocidos por parte de profesionales de las artes química, farmacológica, biológica, bioquímica y médica.
- 35 Se aprecia que ciertas características de la invención, que, por claridad, se describen en el contexto de realizaciones independientes, también pueden proporcionarse en combinación en una única realización. Por el contrario, varias características de la invención, que, por brevedad, se describen en el contexto de una sola realización, también se pueden proporcionar por separado o en cualquier subcombinación adecuada o como es adecuado en cualquier otra realización descrita de la invención. Ciertas características descritas en el contexto de diversas realizaciones no deben considerarse características esenciales de esas realizaciones, a menos que la realización sea inoperante sin esos elementos.
- 40 Diversas realizaciones y aspectos de la presente invención tal como se perfilaron anteriormente y como se reivindica en la sección de reivindicaciones a continuación encuentran apoyo experimental en los siguientes ejemplos.
- 45 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y/o científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece la invención. Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento pueden usarse en la puesta en práctica o el ensayo de las realizaciones de la invención, métodos y/o materiales ejemplares se describen a continuación. En caso de conflicto, la memoria descriptiva de patente, incluidas las definiciones, regirá. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser necesariamente limitantes.
- 50

Ejemplos

Ahora, se hace referencia a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores ilustran algunas realizaciones de la invención de un modo no limitante.

Generalmente, la nomenclatura usada en la presente memoria y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención, incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Dichas técnicas se explican detalladamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías como se exponen en las patentes de Estados Unidos No. 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volúmenes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Current Protocols in Immunology" Volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8ª edición), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., Nueva York (1980); inmunoensayos disponibles se describen ampliamente en la bibliografía de patentes y científica, véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos No. 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 and 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., and Higgins S. J., Eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); todos los cuales se incorporan por referencia como si estuvieran completamente expuestos en la presente memoria. Otras referencias generales se proporcionan a lo largo de este documento. Se cree que los procedimientos en el mismo son bien conocidos en la técnica y se proporcionan para la comodidad del lector. Toda la información contenida en este documento se incorpora en la presente memoria como referencia.

Ejemplo 1

Identificación de genes y predicción del papel de los genes usando herramientas bioinformáticas

Los inventores de la presente invención han identificado polinucleótidos que pueden aumentar el rendimiento de la planta, el rendimiento de semillas, el rendimiento de aceite, el contenido de aceite, la biomasa, el ritmo de crecimiento, la tolerancia al estrés abiótico, la eficiencia de uso de nitrógeno y/o el vigor de una planta, de la siguiente manera.

Los conjuntos de datos de secuencias de nucleótidos usados aquí fueron de bases de datos disponibles públicamente o de secuencias obtenidas usando la tecnología Solexa (p. ej., cebada y sorgo). Se introdujeron datos de secuencias de 100 especies de plantas diferentes en una única base de datos integral. También se incorporó otra información sobre expresión génica, anotación de proteínas, enzimas y rutas. Las principales bases de datos usadas incluyen:

Genomas

Genoma de Arabidopsis [genotipo TAIR, versión 6 (Hypertext Transfer Protocol://World Wide Web (.). arabidopsis (.). org/)];

Genoma de arroz [IRGSP versión 4.0 (Hypertext Transfer Protocol://rgp (.). dna (.). affrc (.). go (.). jp/IRGSP/)];

Álamo [Populus trichocarpa versión 1.1 de JGI (versión de ensamblaje v1.0) (Hypertext Transfer Protocol://World Wide Web (.). genome (.). jgi-psf (.). org/)];

Brachypodium [JGI 4x ensamblaje, Hypertext Transfer Protocol://World Wide Web (.). brachpodium (.). org/];

Soja [DOE-JGI SCP, versión Glyma0 (Hypertext Transfer Protocol://World Wide Web (.). phytozome (.). net/)];

Uva [Consorcio público franco-italiano para la caracterización del genoma de la vid Genoma de la vid (Hypertext Transfer Protocol:// World Wide Web (.). genoscope (.). cns (.). fr/)];

Semilla de ricino [TIGR/J Craig Venter Institute 4x ensamblaje [(Hypertext Transfer Protocol:// msc (.). jvci (.). org/r_communis)];

Sorgo [DOE-JGI SCP, versión Sbi1 [Hypertext Transfer Protocol://World Wide Web (.). phytozome (.). net/)];

Genoma de Maíz parcialmente ensamblado [Hypertext Transfer Protocol://maizesequence (.). org/];

Las secuencias expresadas de EST y ARNm se extrajeron de las siguientes bases de datos:

Versiones de GenBank 154, 157, 160, 161, 164, 165, 166 y 168 (Hypertext Transfer Protocol://World Wide Web (.). ncbi (.). nlm (.). nih (.). gov/dbEST/);

RefSeq (Hypertext Transfer Protocol://World Wide Web (. ncbi (. nlm (. nih (. gov/RefSeq/);

TAIR (Hypertext Transfer Protocol://World Wide Web (. arabidopsis (. org/);

Bases de datos de proteínas y rutas

Uniprot [Hypertext Transfer Protocol://World Wide Web (. uniprot (. org/].

5 AraCyc [Hypertext Transfer Protocol://World Wide Web (. arabidopsis (. org/biocyc/index (. jsp].

ENZYME [Hypertext Transfer Protocol://expasy (. org/enzyme/].

Los conjuntos de datos de micromatrices se descargaron de:

GEO (Hypertext Transfer Protocol://World Wide Web.ncbi.nlm.nih.gov/geo/) TAIR (Hypertext Transfer Protocol://World Wide Web.arabidopsis.org/).

10 Datos de micromatrices patentados de Evogene (véase el documento WO2008/122980 de Evogeney el ejemplo 3 a continuación.

Información de QTL y SNP

Gramene [Hypertext Transfer Protocol://World Wide Web (. gramene (. org/qtl/].

Panzea [Hypertext Transfer Protocol://World Wide Web (. panzea (. org/index (. html/].

15 **Ensamblaje de bases de datos-** se realizó para construir una base de datos amplia, rica, fiable, anotada y fácil de analizar que comprendía datos de dominio público de secuencias de ARNm genómico, EST y ADN, de diversos cultivos así como datos de expresión de genes, anotación de proteínas y rutas, QTL, y otra información relevante.

20 El ensamblaje de bases de datos comprendía una aplicación de herramientas de refinamiento de genes, estructuración, anotación y análisis que permitía construir una base de datos a medida para cada proyecto de descubrimiento génico. Las herramientas del refinamiento y estructuración de genes permiten detectar, de manera fiable, variantes de corte y empalme y transcritos antisentido, generando el entendimiento de los posibles diversos resultados fenotípicos de un solo gen. Las capacidades de la plataforma "LEADS" de Compugen LTD para analizar el genoma humano han sido confirmadas y aceptadas por la comunidad científica [véase p. ej., "Widespread Antisense Transcription", Yelin, et al. (2003) Nature Biotechnology 21, 379-85; "Splicing of Alu Sequences", Lev-Maor, et al. (2003) Science 300 (5623), 1288-91; "Computational analysis of alternative splicing using EST tissue information", Xie H et al. Genomics 2002], y también han demostrado se las más eficientes en genómica de plantas.

25 **Agrupamiento de EST y ensamblaje de genes-** Para agrupar y ensamblar genes de organismos con datos disponibles de secuencia del genoma (arabidopsis, arroz, ricino, uva, brachypodium, álamo, soja, sorgo), se empleó la versión genómica LEADS (GANG). Esta herramienta permite la agrupación más precisa de secuencias de EST y de ARNm en el genoma, y predice la estructura del gen, así como los eventos de corte y empalme alternativos y la transcripción antisentido.

30 Para los organismos que no tienen datos completos disponibles sobre la secuencia del genoma, se aplicó el software de agrupamiento "LEADS expresado".

Anotación de genes- los genes y las proteínas previstos se anotaron de la siguiente manera:

35 Se realizó una búsqueda con Blast [Hypertext Transfer Protocol://blast (. ncbi (. nlm (. nih (. gov /Blast (. cgi] contra todas las secuencias UniProt de plantas [Hypertext Transfer Protocol://World Wide Web (. uniprot (. org/]. Se analizaron los marcos de lectura abiertos de cada transcripción supuesta y se seleccionó el ORF más largo con un número mayor de homólogos como la proteína predicha del transcrito. Las proteínas predichas fueron analizadas por InterPro [Hypertext Transfer Protocol:// World Wide Web (. ebi (. ac (. uk/interpro/].

40 Se usó Blast contra las proteínas de las bases de datos AraCyc y ENZYME para mapear los transcritos predichos para las rutas AraCyc.

Las proteínas predichas de diferentes especies se compararon usando el algoritmo blast [Hypertext Transfer Protocol://World Wide Web (. ncbi (. nlm (. nih (. gov /Blast (. cgi] para validar la precisión de la secuencia proteica predicha, y para la detección eficiente de ortólogos.

45 **Perfiles de expresión génica-** Se aprovecharon varias fuentes de datos para el perfil de expresión génica, que combinó los datos de micromatrices y el perfil de expresión digital (véase a continuación). Según el perfil de expresión génica, se realizó un análisis de correlación para identificar genes que están co-regulados en diferentes fases del desarrollo y condiciones ambientales y que están asociados con diferentes fenotipos.

50 Los conjuntos de datos de micromatrices disponibles públicamente se descargaron de los sitios TAIR y NCBI GEO, se renormalizaron y se integraron en la base de datos. El perfil de expresión es uno de los datos de recursos más

importantes para identificar genes importantes para el rendimiento.

Se recopiló un resumen de perfil de expresión digital para cada grupo según todas las palabras clave incluidas en los registros de secuencias que comprendían el grupo. La expresión digital, también conocida como transferencia de Northern electrónica, es una herramienta que muestra un perfil de expresión virtual basado en las secuencias EST que forman el grupo génico. La herramienta puede proporcionar el perfil de expresión de un grupo en cuanto a la anatomía de la planta (p. Ej., el tejido/órganos en los que se expresa el gen), fase de desarrollo (las fases de desarrollo en las que puede encontrarse un gen) y perfil de tratamiento (que proporciona las condiciones fisiológicas en las que se expresa un gen, tales como sequía, frío, infección por patógenos, etc.). Dada una distribución al azar de las EST en los diferentes grupos, la expresión digital proporciona un valor de probabilidad que describe la probabilidad de que un grupo que tiene un total de N EST contenga X EST de una determinada colección de bibliotecas. Para efectuar los cálculos de probabilidad se tiene en cuenta: a) el número de EST en el grupo, b) el número de un EST de las bibliotecas implicadas y relacionadas, c) el número total de EST disponibles que representan las especies. Por lo tanto, los grupos con valores de baja probabilidad están enormemente enriquecidos con EST del grupo de bibliotecas de interés indicando una expresión especializada.

Recientemente, la precisión de este sistema fue demostrada por Portnoy et al., 2009 (Analysis Of The Melon Fruit Transcriptome Based On 454 Pyrosequencing) en: Plant & Animal Genomes XVII Conference, San Diego, CA. El análisis transcriptómico, basado en la abundancia relativa de EST en los datos, se realizó mediante pirosecuenciación 454 de ADNc que representa el ARNm del fruto de melón. Se secuenciaron catorce muestras de ADNc bicatenario obtenidas a partir de dos genotipos, dos tejidos de fruto (carne y corteza) y cuatro fases del desarrollo. La pirosecuenciación GS FLX (Roche/454 Life Sciences) de muestras de ADNc no normalizadas y purificadas produjo 1.150.657 marcas de secuencia expresada que se ensamblaron en 67.477 unigenes (32.357 elementos aislados y 35.120 cóntigos.). El análisis de los datos obtenidos contra la base de datos de Cucurbit Genomics [Hypertext Transfer Protocol://World Wide Web (.icugi (.org)] confirmó la precisión de la secuencia y el ensamblaje. Los patrones de expresión de genes seleccionados encajaban bien con sus datos de qRT-PCR.

Los conceptos de ortología y paralogía se han aplicado recientemente a las caracterizaciones y clasificaciones funcionales en la escala de las comparaciones del genoma completo. Los ortólogos y parálogos constituyen dos tipos principales de homólogos: los primeros evolucionaron desde un ancestro común por especialización, y los últimos se relacionaron mediante eventos de duplicación. Se supone que es probable que los parálogos que surgen de los antiguos eventos de duplicación hayan divergido en su función, mientras que es más probable que los verdaderos ortólogos conserven una función idéntica durante el tiempo evolutivo.

Para identificar supuestos ortólogos de los genes que afectan al rendimiento de la planta, el rendimiento de aceite, el contenido de aceite, el rendimiento de semillas, el ritmo de crecimiento, el vigor, la biomasa, la tolerancia al estrés abiótico y/o la eficiencia de uso de nitrógeno, todas las secuencias se alinearon usando BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, herramienta básica de búsqueda de alineamiento local). Las secuencias suficientemente similares fueron agrupadas provisionalmente. Estos supuestos ortólogos se organizaron adicionalmente bajo un filograma - un diagrama de ramificación (árbol) que se supone que es una representación de las relaciones evolutivas entre los taxones biológicos. Los supuestos grupos ortólogos fueron analizados en cuanto a su acuerdo con el filograma y en los casos de desacuerdos estos grupos ortólogos se rompieron en consecuencia. Los datos de expresión se analizaron y las bibliotecas EST se clasificaron usando un vocabulario fijo de términos personalizados tales como fases del desarrollo (p. ej., genes que muestran un perfil de expresión similar a lo largo del desarrollo con regulación positiva en una fase específica, tal como en la fase de llenado de semillas) y/u órgano de la planta (p. ej., genes que muestran un perfil de expresión similar en sus órganos con regulación positiva en órganos específicos, tales como la semilla). Las anotaciones de todas las EST agrupadas en un gen se analizaron estadísticamente comparando su frecuencia en el grupo frente a su abundancia en la base de datos, permitiendo la construcción de un perfil de expresión numérico y gráfico de ese gen, que se denomina "expresión digital". La razón de usar estos dos métodos complementarios con los métodos de estudios de asociación fenotípica de QTL, SNP y la correlación de expresión fenotípica se basa en la suposición de que es probable que los ortólogos verdaderos conserven una función idéntica a lo largo del tiempo evolutivo. Estos métodos proporcionan diferentes conjuntos de indicaciones sobre las similitudes de funciones entre dos genes homólogos, similitudes en el nivel de la secuencia, aminoácidos idénticos en los dominios de proteínas y similitud en los perfiles de expresión.

En general, se identificaron 50 genes que tenían un gran impacto en el rendimiento de la planta, el rendimiento de semillas, el rendimiento de aceite, el contenido de aceite, la biomasa, el ritmo de crecimiento, el vigor, la tolerancia al estrés abiótico (TEAB) y/o eficiencia de uso de nitrógeno (EUN) cuando se expresan en una planta. Los genes identificados, sus secuencias de polinucleótidos y de polipéptidos seleccionadas, así como sus secuencias actualizadas de acuerdo con la base de datos de Genbank se proporcionan en la tabla 1, a continuación, en esta memoria.

Tabla 1

Polinucleótidos identificados que afectan al rendimiento de la planta, el rendimiento de semillas, el rendimiento de aceite, el contenido de aceite, la biomasa, el ritmo de crecimiento, el vigor, la tolerancia al estrés abiótico y/o la eficiencia de uso de nitrógeno de una planta

Nombre del gen	Nombre del grupo	Organismo	SEQ ID NO del polinucleótido:	SEQ ID NO del polipéptido:
BDL100	rice p;b157.2 BI812936	arroz	1	51
BDL100			1	723
BDL106	canola gb161 DY020650	canola	2	52
BDL106			724	52
BDL108	canola gb161 CD818601	canola	3	53
BDL108			725	742
BDL108			726	743
BDL110	canola gb161 CD814521	canola	4	54
BDL110			727	744
BDL110			728	745
BDL111	canola gb161 CN829852	canola	5	55
BDL111			729	746
BDL111			730	747
BDL112	arabidopsis gb165 AT3G23510	arabidopsis	6	56
BDL113	arabidopsis gb165 AT2G45310	arabidopsis	7	57
BDL114	arabidopsis gb165 AT5G27820	arabidopsis	8	58
BDL115	arabidopsis gb165 AT4G11090	arabidopsis	9	59
BDL116	arabidopsis gb165 AT4G24175	arabidopsis	10	60
BDL119	arabidopsis gb165 AT3G47965	arabidopsis	11	61
BDL119			731	748
BDL120	arabidopsis gb165 AT3G03230	arabidopsis	12	62
BDL120			732	749
BDL122	arabidopsis gb165 AT3G49000	arabidopsis	13	63
BDL123	arabidopsis gb165 AT2G21860	arabidopsis	14	64
BDL124	arabidopsis gb165 AT5G51590	arabidopsis	15	65
BDL124			733	750
BDL125	arabidopsis gb165 AT3G16180	arabidopsis	16	66
BDL125			734	751
BDL127	arabidopsis gb165 AT3G44940	arabidopsis	17	67
BDL128	arabidopsis gb165 AT1G60770	arabidopsis	18	68
BDL129	arabidopsis gb165 AT4G08690	arabidopsis	19	69

ES 2 674 256 T3

BDL129			735	69
BDL130	arabidopsis gb165 AT3G03870	arabidopsis	20	70
BDL130			736	752
BDL131	arabidopsis gb165 AT4G27450	arabidopsis	21	71
BDL131			737	71
BDL132	arabidopsis gb165 AT4G23730	arabidopsis	22	72
BDL133	arabidopsis gb165 AT3G06150	arabidopsis	23	73
BDL134	arabidopsis gb165 AT3G28420	arabidopsis	24	74
BDL134			738	753
BDL135	arabidopsis gb165 AT3G18600	arabidopsis	25	75
BDL136	arabidopsis gb165 AT3G22990	arabidopsis	26	76
BDL137	arabidopsis gb165 AT5 G14530	arabidopsis	27	77
BDL139	arabidopsis gb165 AT1G29800	arabidopsis	28	78
BDL141	arabidopsis gb165 AT1G29980	arabidopsis	29	79
BDL142	arabidopsis gb165 AT2G39110	arabidopsis	30	80
BDL142			30	754
BDL143	arabidopsis gb165 AT1G62810	arabidopsis	31	81
BDL143			739	81
BDL144	arabidopsis gb165 AT3G14890	arabidopsis	32	82
BDL145	arabidopsis gb165 AT1G24470	arabidopsis	33	83
BDL145			740	83
BDL146	arabidopsis pb165 AT3G09310	arabidopsis	34	84
BDL146			741	84
BDL148	arabidopsis gb165 AT4G35785	arabidopsis	35	85
BDL42	arabidopsis gb165 AT5G13170	arabidopsis	36	86
BDL46	arabidopsis gb165 AT2G13690	arabidopsis	37	87
BDL46			719	87
BDL51	arabidopsis gb165 AT5G64260	arabidopsis	38	88
BDL52	tomato gb164 BG127438	tomate	39	89
BDL52			716	89
BDL54	arabidopsis gb165 AT2G41090	arabidopsis	40	90
BDL56	arabidopsis gb165 AT2G32990	arabidopsis	41	91
BDL59	arabidopsis gb165 AT5G07110	arabidopsis	42	92
BDL59			717	92
BDL60	arabidopsis gb165 AT2G45200	arabidopsis	43	93

BDL65	arabidopsis gb165 AT4G20360	arabidopsis	44	94
BDL67	arabidopsis gb165 AT1G73600	arabidopsis	45	95
BDL68	arabidopsis gb165 AT2G17280	arabidopsis	46	96
BDL78	arabidopsis gb165 AT3G26520	arabidopsis	47	97
BDL78			718	720
BDL82	arabidopsis gb165 AT1G21790	arabidopsis	48	98
BDL89	rice gb157.2 AA749665	arroz	49	99
BDL89			49	721
BDL95	rice gb157.2 AU062876	arroz	50	100
BDL95			50	722

Tabla 1: Se proporcionan los genes identificados, sus anotaciones, organismos y los identificadores de secuencia de polinucleótidos y polipéptidos. Obsérvese que las SEQ ID NO:716-719 y 724-741 son variantes de los polinucleótidos identificados y las SEQ ID NO:720-723 y 742-754 son variantes de los polipéptidos identificados.

Ejemplo 2

Identificación de secuencias homólogas que aumentan el rendimiento de semillas, el rendimiento de aceite, el ritmo de crecimiento, el contenido de aceite, la biomasa, el vigor, la teab y/o la uen de una planta

5 La búsqueda e identificación de genes homólogos implica el cribado de información de secuencia disponible, por ejemplo, en bases de datos públicas como la Base de Datos de ADN de Japón (DDBJ), Genbank y la Base de Datos de Secuencias de Ácidos Nucleicos (EMBL) del Laboratorio Europeo de Biología Molecular o sus versiones o la base de datos MIPS. Se han desarrollado varios algoritmos de búsqueda diferentes, que incluyen, entre otros, el conjunto de programas denominados programas BLAST. Hay cinco implementaciones de BLAST, tres diseñadas para búsquedas de secuencias de nucleótidos (BLASTN, BLASTX y TBLASTX) y dos diseñadas para búsquedas de secuencias de proteínas (BLASTP y TBLASTN) (Coulson, Trends in Biotechnology: 76-80, 1994; Birren et al., Genome Analysis, I: 543, 1997). Dichos métodos implican alineamiento y comparación de secuencias. El algoritmo BLAST calcula el porcentaje de identidad de secuencia y realiza un análisis estadístico de la similitud entre las dos secuencias. El software para realizar el análisis BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica. Otros softwares o algoritmos de este tipo son GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA. GAP usa el algoritmo de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 48: 443-453, 1970) para encontrar el alineamiento de dos secuencias completas que maximiza el número de coincidencias y minimiza el número de huecos.

10 Los genes homólogos pueden pertenecer a la misma familia de genes. El análisis de una familia de genes se puede llevar a cabo usando un análisis de similitud de secuencia. Para realizar este análisis, se pueden usar programas estándar para alineamientos múltiples, p. ej. Clustal W. Se puede usar un árbol de "unión al vecino" de las proteínas homólogas a los genes en esta invención para proporcionar una visión general de las relaciones estructurales y ancestrales. La identidad de secuencia se puede calcular usando un programa de alineamiento tal como se ha descrito anteriormente. Se espera que otras plantas porten un gen funcional similar (ortólogo) o una familia de genes similares y esos genes proporcionarán el mismo fenotipo preferido que los genes presentados aquí. Ventajosamente, estos miembros de la familia pueden ser útiles en los métodos de la invención. Se incluyen ejemplos de otras plantas aquí, pero sin estar limitados a, cebada (*Hordeum vulgare*), arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*), maíz (*Zea mays*), algodón (*Gossypium*), colza (*Brassica napus*), arroz (*Oryza sativa*), caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), sorgo (*Sorghum bicolor*), soja (*Glycine max*), girasol (*Helianthus annuus*), tomate (*Lycopersicon esculentum*) y trigo (*Triticum aestivum*).

15 Los análisis mencionados anteriormente para la homología de secuencia pueden llevarse a cabo en una secuencia de longitud completa, pero también pueden basarse en una comparación de ciertas regiones tales como dominios conservados. La identificación de dichos dominios también estaría dentro del ámbito del experto en la técnica e implicaría, por ejemplo, un formato legible por ordenador de los ácidos nucleicos de la presente invención, el uso de programas informáticos de alineamiento y el uso de información de dominio público sobre dominios de proteínas, motivos conservados y cajas. Esta información está disponible en la base de datos PRODOM (Hypertext Transfer Protocol://World Wide Web (.) biochem (.) ucl (.) ac (.) uk/bsm/dbbrowser/protocol/prodomqry (.) html), PIR (Hypertext Transfer Protocol://pir (.) Georgetown (.) edu/) o Pfam (Hypertext Transfer Protocol:// World Wide Web (.) sanger (.) ac (.) uk/Software/Pfam/). Los programas de análisis de secuencia diseñados para la búsqueda de motivos pueden usarse para la identificación de fragmentos, regiones y dominios conservados como se ha mencionado

anteriormente. Los programas informáticos preferidos incluyen, pero no se limitan a, MEME, SIGNALSCAN y GENESCAN.

5 Un experto en la técnica puede usar las secuencias homólogas proporcionadas en la presente memoria para encontrar secuencias similares en otras especies y otros organismos. Los homólogos de una proteína abarcan péptidos, oligopéptidos, polipéptidos, proteínas y enzimas que tienen sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos con respecto a la proteína no modificada en cuestión y que tienen actividad biológica y funcional similar a la proteína no modificada de la que se derivan. Para producir dichos homólogos, los aminoácidos de la proteína pueden sustituirse por otros aminoácidos que tengan propiedades similares (cambios conservativos, tales como hidrofobia, hidrofilia, antigenicidad, propensión a formar o romper estructuras α -helicoidales o estructuras de lámina beta). Las tablas de sustitución conservativa son bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo

10 Creighton (1984) Proteins. W.H. Freeman and Company). Los homólogos de un ácido nucleico abarcan ácidos nucleicos que tienen sustituciones, deleciones y/o inserciones de nucleótidos con respecto al ácido nucleico no modificado en cuestión y que tienen actividad biológica y funcional similar a la del ácido nucleico no modificado del que se derivan.

15 Los genes identificados en las bases de datos de secuencias de dominio público como que comparten una alta homología de secuencia con los genes de arabisidopsis identificados en la presente memoria se resumen en la tabla 2 a continuación. Se espera que esos genes aumenten el rendimiento de la planta, el rendimiento de semillas, el rendimiento de aceite, el contenido de aceite, el ritmo de crecimiento, la biomasa, el vigor, la TEAB y/o la EUN de una planta de las bases de datos usando el software BLAST (BLASTP y TBLASTN) y se proporcionan en la tabla 2, a continuación en esta memoria.

Tabla 2

Polinucleótidos y polipéptidos homólogos

SEQ ID NO del polinuc.:	Nombre del grupo	Organismo	SEQ ID NO del polipép.:	Homología con la SEQ ID NO:	% de identidad	Algoritmo
101	brachypodium gb169 BE4156 18	brachypodium	379	51	88,81	blastp
102	maize gb169.2 AI600710	maíz	380	51	90,11	blastp
103	maize gb169.2 AI615263	maíz	381	51	91,09	blastp
104	sorghum gb161.crp AI987481	sorgo	382	51	81,43	blastp
105	sugarcane gb157.3 CA081111	caña de azúcar	383	51	86,03	blastp
106	switchgrass gb167 FE601953	pasto varilla	384	51	90,99	blastp
107	wheat gb164 BE490052	trigo	385	51	89,72	blastp
108	b_rapa gb162 EX108797	b rapa	386	52	80	tblastn
109	b_rapa gb162 EX138742	b rapa	387	52	92,86	blastp
110	canola gb161 CD8214 78	canola	388	52	80	tblastn
111	radish gb164 EV569061	rábano	389	52	83,1	tblastn
112	antirrhinum gpb166 AJ558675	antirrhinum	390	53	80,77	blastp
113	apple gb157.3 CN580529	manzana	391	53	80,22	blastp
114	arabidopsis gb165 AT5G15750	arabidopsis	392	53	88,46	blastp
115	b_rapa gb162 CX270798	b rapa	393	53	93,41	blastp
116	b_rapa gb162 DY009670	b rapa	394	53	99,45	blastp
117	bean gb167 CA897445	alubia	395	53	84,07	blastp
118	cacao gb167 CU485233	cacao	396	53	84,07	blastp
119	canola gb161 EE456125	canola	397	53	91,21	blastp

ES 2 674 256 T3

120	centaurea gb166 EH737065	centaurea	398	53	80,22	blastp
121	citrus gb166 CB304606	cítrico	399	53	82,97	blastp
122	cotton gb164 BQ409188	algodón	400	53	86,26	blastp
123	cowpea gb166 FF400239	alubia carilla	401	53	82,97	blastp
124	cynara gb167 GE592319	alcachofa	402	53	81,32	blastp
125	dandelion gb161 DY824742	diente de león	403	53	81,87	tblastn
126	grape gb160 CA813426	uva	404	53	84,07	blastp
127	ipomoea gb157.2 CJ749317	campanilla morada	405	53	83,06	blastp
128	kiwi gb166 FG473358	kiwi	406	53	82,42	blastp
129	lettuce gb157.2 DW152666	lechuga	407	53	80,77	blastp
130	melon gb165 EB714755	melón	408	53	80,22	tblastn
131	radish gb164 EV526240	rábano	409	53	95,63	blastp
132	radish gb164 EV537766	rábano	410	53	95,63	blastp
133	soybean gb168 BE202985	soja	411	53	83,52	blastp
134	soybean gb168 BM139685	soja	412	53	83,52	blastp
135	sunflower gb162 CD851096	girasol	413	53	82,97	blastp
136	thellungiella gb167 BY81024	thellungiella	414	53	91,21	tblastn
137	triphysaria gb164 BM356672	triphysaria	415	53	81,87	blastp
138	arabidopsis gb165 AT1G2176 0	arabidopsis	416	54	92,38	blastp
139	b_oleracea gb161 AM059122	b_oleracea	417	54	99,39	blastp
140	b_rapa gb162 DN965363	b_rapa	418	54	86,06	blastp
141	cotton gb164 CO083170	algodón	419	54	80,06	tblastn
142	peanut gb167 ES716655	cacahuete	420	54	80,06	blastp
143	radish gb164 EV546747	rábano	421	54	99,39	blastp
144	soybean gb168 AI967832	soja	422	54	80,66	blastp
145	sovbean gh168 AW395758	soja	423	54	80,97	blastp
146	arabidopsis gb165 AT3G2353 0	arabidopsis	424	56	96,89	blastp
147	arabidopsis gb165 AT1G0200 0	arabidopsis	425	57	82,31	blastp
148	arabidopsis gb165 AT2G4531 5	arabidopsis	426	57	86,5	tblastn
149	arabidopsis gb165 AT4G0011 0	arabidopsis	427	57	83,07	blastp
150	b_rapa gb162 CV544806	b_rapa	428	57	82,42	blastp
151	canola gb161 CD830303	canola	429	57	82,65	blastp
152	citrus gb166 CK740093	cítrico	430	57	83,98	blastp
153	soybean gb168 AW704756	soja	431	57	80,78	blastp
154	soybean gb168 CB540306	soja	432	57	81,69	blastp

ES 2 674 256 T3

155	tomato gb164 BG126144	tomate	433	57	81,01	tblastn
156	b_rapa gb162 CV432750	b_rapa	434	58	95,61	blastp
157	b_rapa gb162 ES933357	b_rapa	435	58	93,86	blastp
158	canola gb161 CN730767	canola	436	58	94,74	blastp
159	canola gb161 CX193104	canola	437	58	92,98	blastp
160	canola gb161 EE472289	canola	438	58	94,74	blastp
161	canola gb161 EV217368	canola	439	58	94,74	blastp
162	cassava gb164 DV446328	mandioca	440	58	82,61	blastp
163	citrus gb166 CX667844	cítrico	441	58	81,58	blastp
164	papava gb165 EX265359	papaya	442	58	81,58	blastp
165	radish gpb164 EW733783	rábano	443	58	95,61	blastp
166	radish gb164 FD535333	rábano	444	58	94,74	blastp
167	canola gb161 CD820476	canola	445	59	83,1	blastp
168	arabidopsis gb165 AT1G3125 8	arabidopsis	446	61	97,73	blastp
169	arabidopsis gb165 AT3G0324 0	arabidopsis	447	62	81,44	blastp
170	canola gb161 CD818131	canola	448	62	81,68	blastp
171	radish gb164 EX894603	rábano	449	66	89,23	blastp
172	canola gb161 CD814119	canola	450	68	86,35	blastp
173	canola gb161 CD816209	canola	451	68	85,19	blastp
174	b_rapa gb162 ES934568	b_rapa	452	69	87,04	tblastn
175	radish gb164 EV538975	rábano	453	69	84,39	blastp
176	apple gb157.3 AU223507	manzana	454	71	81,18	blastp
177	apple gb157.3 CN579496	manzana	455	71	82,35	blastp
178	b_oleracea gb161 AM385211	b_oleracea	456	71	97,2	blastp
179	b_oleracea gb161 AM386119	b_oleracea	457	71	83,6	blastp
180	b_rapa gb162 CX273145	b_rapa	458	71	95,6	blastp
181	b_rapa gp162 EX022604	b_rapa	459	71	96	blastp
182	bean gb 167 FE686571	alubia	460	71	80,31	blastp
183	cacao gb167 EH057755	cacao	461	71	83,07	blastp
184	canola gb161 CD834729	canola	462	71	95,6	blastp
185	canola gb161 CX192269	canola	463	71	97,2	blastp
186	canola gb161 H74607	canola	464	71	95,6	blastp
187	cassava gb164 DV443366	mandioca	465	71	82,35	blastp
188	citrus gb166 BQ625207	cítrico	466	71	81,57	blastp
189	cotton gb164 AI054775	algodón	467	71	82,75	blastp

ES 2 674 256 T3

190	cowpea gb166 FC457888	alubia carilla	468	71	80,71	blastp
191	cvnara gb167 GE589236	alcachofa	469	71	80,4	tblastn
192	dandelion gb161 DY816357	diente de león	470	71	81,64	blastp
193	grape gb160 BM436371	uva	471	71	80,39	blastp
194	lettuce gb157.2 DW046017	lechuga	472	71	81,57	blastp
195	lettuce gb157.2 DW076019	lechuga	473	71	81,96	blastp
196	lettuce gb157.2 DW110290	lechuga	474	71	81,57	blastp
197	lettuce gb157.2 DW153964	lechuga	475	71	82,35	blastp
198	lotus gb157.2 CN825209	loto	476	71	81,89	blastp
199	melon gb165 AM715906	melón	477	71	81,89	blastp
200	papava gb165 EX227683	papaya	478	71	83,46	blastp
201	peach gb157.2 BU039450	melocotón	479	71	81,18	blastp
202	peanut gb167 CX127963	cacahuete	480	71	80,48	tblastn
203	poplar gb157.2 BI068247	álamo	481	71	80,78	blastp
204	prunus gb167 BU039450	prunus	482	71	81,18	blastp
205	radish gb164 EV567811	rábano	483	71	92,8	tblastn
206	radish gb164 EV568452	rábano	484	71	96,8	blastp
207	radish gb164 EV572670	rábano	485	71	82,4	blastp
208	safflower gb162 EL387585	cártamo	486	71	80,31	blastp
209	soybean gb168 AF272360	soja	487	71	83,07	blastp
210	soybean gb168 AL370910	soja	488	71	82,68	blastp
211	soybean gb168 BE661209	soja	489	71	80	tblastn
212	strawberry gb164 CO817556	fresa	490	71	81,18	blastp
213	sunflower gb162 DY915187	girasol	491	71	82	tblastn
214	sunflower gb162 DY939330	girasol	492	71	82	tblastn
215	walnuts gb166 CB303475	nueces	493	71	82,28	blastp
216	walnuts gb166 CB303477	nueces	494	71	80,8	tblastn
217	b_rapa gb162 EX017049	b_rapa	495	72	89,87	blastp
218	canola gb161 CD831601	canola	496	72	82,28	tblastn
219	radish gb164 EV547036	rábano	497	72	89,87	blastp
220	canola gb161 CX189942	canola	498	76	89,59	blastp
221	canola gb161 H74865	canola	499	77	87,26	blastp
222	castorbean gb160 EG664225	ricino	500	77	80,91	tblastn
223	cotton gb164 BG442642	algodón	501	77	81,82	tblastn
224	grape gb160 CB916567	uva	502	77	80,24	blastp

ES 2 674 256 T3

225	poplar gb157.2 BU816880	álamo	503	77	80,61	tblastn
226	radish gb164 EV537923	rábano	504	77	86,61	blastp
227	soybean gb168 AW776674	soja	505	77	80,29	blastp
228	thellungiella gb167 DN77378 0	thellungiella	506	77	94,26	tblastn
229	b_juncea gb164 EVGN00166 916743135	b_juncea	507	79	88,75	blastp
230	b_rapa gb162 CX268133	b_rapa	508	79	90,95	blastp
231	radish gb164 EV573167	rábano	509	79	89,73	tblastn
232	radish gb164 EW724071	rábano	510	83	86,58	blastp
233	b_rapa gb162 EE517848	b_rapa	511	85	80,4	blastp
234	canola gb161 CD824985	canola	512	86	80,54	blastp
235	b_oleracea gb161 AM057266	b_oleracea	513	88	90,82	blastp
236	b_rapa gb162 BG543561	b_rapa	514	88	87,87	blastp
237	canola gb161 CD820232	canola	515	88	88,2	blastp
238	canola gb161 W999252	canola	516	88	87,87	blastp
239	potato gb157.2 BG351102	patata	517	89	89,86	blastp
240	potato gb157.2 BI435634	patata	518	89	90,65	blastp
241	radish gb164 EY917873	rábano	519	92	87,1	blastp
242	antirrhinum gb166 AJ797267	antirrhinum	520	93	80,08	blastp
243	apple gb157.3 CN489681	manzana	521	93	88,28	blastp
244	apricot gb157.2 CV051536	albaricoque	522	93	88,33	blastp
245	aquilegia gb157.3 DT735665	aquilegia	523	93	82,85	blastp
246	b_oleracea gb161 ES939061	b_oleracea	524	93	82,85	blastp
247	b_rapa gb162 EX075010	b_rapa	525	93	92,08	blastp
248	basilicum gb157.3 DY334833	basilicum	526	93	86,67	tblastn
249	bean gb167 CV530444	alubia	527	93	84,94	blastp
250	cacao gb167 CU490565	cacao	528	93	89,96	blastp
251	canola gb161 CD813794	canola	529	93	92,92	blastp
252	canola gb161 CD826913	canola	530	93	94,56	blastp
253	canola gb161 CN737313	canola	531	93	92,92	blastp
254	cichorium gb166 EH687081	cichorium	532	93	82,01	tblastn
255	citrus gb166 CF506133	cítrico	533	93	89,54	blastp
256	cotton gb164 AI730510	algodón	534	93	85,77	blastp
257	cotton gb164 BF268340	algodón	535	93	82,57	blastp
258	cowpea gb166 FF384748	alubia carilla	536	93	85,77	blastp
259	dandelion gb161 DY819170	diente de león	537	93	81,17	tblastn

ES 2 674 256 T3

260	eucalyptus gb166 CT983920	eucalipto	538	93	87,08	blastp
261	grape gb160 CD798978	uva	539	93	88,28	blastp
262	lettuce gb157.2 DW062039	lechuga	540	93	82,85	blastp
263	melon gb165 AM742165	melón	541	93	83,68	blastp
264	poplar gb1572 CF234347	álamo	542	93	85,89	blastp
265	poplar gb157.2 CV241881	álamo	543	93	87,65	blastp
266	potato gb157.2 BG595485	patata	544	93	85,89	blastp
267	prunus gb167 AJ631796	prunus	545	93	88,33	blastp
268	radish gb164 EV567266	rábano	546	93	92,92	blastp
269	radish gb164 EY912132	rábano	547	93	92,08	blastp
270	safflower gb162 EL405854	cártamo	548	93	82,01	tblastn
271	soybean gb168 BQ157726	soja	549	93	87,45	blastp
272	soybean gb168 CD399194	soja	550	93	86,72	blastp
273	spurge gb161 DV128393	euforbio	551	93	88,7	blastp
274	sunflower gb162 DY918314	girasol	552	93	80,83	tblastn
275	thellungiea gb167 BY82093 5	thellungiella	553	93	97,07	tblastn
276	tobacco gb162 EB445856	tabaco	554	93	84,71	blastp
277	tomato gb164 BG128536	tomate	555	93	86,31	blastp
278	triphysaria gb164 EY139231	triphysaria	556	93	83,4	blastp
279	apple gb157.3 CN489235	manzana	557	94	83,95	blastp
280	apple gb157.3 CN490414	manzana	558	94	83,78	blastp
281	aquilegia gb157.3 DR925212	aquilegia	559	94	83,64	blastp
282	bean gb1 67 CA905538	alubia	560	94	83,06	blastp
283	bean gb167 CB542107	alubia	561	94	83,27	blastp
284	canola gb161 CD816386	canola	562	94	87,18	blastp
285	canola gb161 CX187647	canola	563	94	89,98	blastp
286	citrus gb166 BE213456	cítrico	564	94	83,44	blastp
287	clover gb162 BB936594	clavo	565	94	81,48	blastp
288	cotton gb164 BG440364	algodón	566	94	80,82	blastp
289	cowpea gb166 FC460131	alubia carilla	567	94	83,12	blastp
290	cowpea gb166 FF541811	alubia carilla	568	94	83,74	blastp
291	grape gb160 BG273758	uva	569	94	80,29	blastp
292	grape gb160 BQ792941	uva	570	94	81,17	blastp
293	lettuce gb157.2 DW051431	lechuga	571	94	81,82	blastp
294	lettuce gb157.2 DW112484	lechuga	572	94	81,82	blastp

ES 2 674 256 T3

295	medicago gb157.2 AW68858	medicago	573	94	81,54	tblastn
296	poplar gb157.2 BI072710	álamo	574	94	82,51	blastp
297	poplar gb157.2 BU824581	álamo	575	94	82,79	tblastn
298	potato gb157.2 AW907286	patata	576	94	81,54	tblastn
299	potato gb157.2 BE921734	patata	577	94	82,3	blastp
300	radish gb164 EX747018	rábano	578	94	80,88	blastp
301	soybean gb168 AL387670	soja	579	94	82,4	blastp
302	soybean gb168 BG239139	soja	580	94	82,3	blastp
303	soybean gb168 BG839432	soja	581	94	83,37	blastp
304	sunflower gb162 CD84 7955	girasol	582	94	82,1	blastp
305	sunflower gb162 CX944572	girasol	583	94	81,57	blastp
306	tobacco gb162 GFXTOBTEF TUX1	tabaco	584	94	80,75	blastp
307	tomato gb164 BG124614	tomate	585	94	80,53	blastp
308	tomato gb164 BG125985	tomate	586	94	81,99	blastp
309	canola gb161 CD827895	canola	587	95	92,49	blastp
310	canola gb161 CX188753	canola	588	95	92,69	blastp
311	b_ rapa gb162 L35822	b_ rapa	589	96	88,19	blastp
312	canola gb161 CD813792	canola	590	96	88,93	blastp
313	radish gb164 EV526073	rábano	591	96	88,19	blastp
314	radish gb164 EW729491	rábano	592	96	88,19	blastp
315	arabidopsis gb165 AT2G3683	arabidopsis	593	97	85,38	blastp
316	b_ juncea gb164 EVGN00082 509070705	b_ juncea	594	97	90,51	blastp
317	b_ juncea gb164 EVGN00089 315240635	b_ juncea	595	97	92,09	blastp
318	b_ juncea gb164 EVGN00116 217230337	b_ juncea	596	97	90,51	blastp
319	b_ juncea gb164 EVGN00256 308610946	b_ juncea	597	97	92,09	tblastn
320	b_ juncea gb164 EVGN00465 908341698	b_ juncea	598	97	84,58	blastp
321	b_ juncea gb164 EVGN01252 008670772	b_ juncea	599	97	83,79	blastp
322	b_ oleracea gb161 AM385528	b_ oleracea	600	97	91,3	blastp
323	b_ oleracea gb161 BOU92651	b_ oleracea	601	97	84,19	blastp
324	b_ rapa gb162 BG545002	b_ rapa	602	97	84,58	blastp
325	b_ rapa gb162 BQ791222	b_ rapa	603	97	86,17	blastp
326	b_ rapa gb162 L37468	b rapa	604	97	91,3	blastp

ES 2 674 256 T3

327	canola gb161 AF118381	canola	605	97	84,19	blastp
328	canola gb161 CD815565	canola	606	97	91,3	blastp
329	canola gb161 CD824493	canola	607	97	84,58	blastp
330	canola gb161 CD841035	canola	608	97	91,3	blastp
331	canola gb161 CN729037	canola	609	97	84,58	blastp
332	canola gb161 CX187880	canola	610	97	90,91	blastp
333	radish gb164 D84669	rábano	611	97	90,91	blastp
334	radish gb164 EV549107	rábano	612	97	91,3	blastp
335	radish gb164 EV569856	rábano	613	97	84,58	blastp
336	radish gb164 EX748154	rábano	614	97	83,79	blastp
337	thellungiella gb167 EE683447	thellungiella	615	97	91,7	blastp
338	canola gb161 H74506	canola	616	98	88,54	blastp
339	radish gb164 EW716884	rábano	617	98	88,19	blastp
340	barley gb157.3 AL450752	cebada	618	99	82,46	blastp
341	brachypodium gb169 BE3990 53	brachypodium	619	99	85,96	blastp
342	cenchrus gb166 EB653861	cenchrus	620	99	86,84	blastp
343	fescue gb161 DT683655	festuca	621	99	80,7	blastp
344	leymus gb166 CD809085	leymus	622	99	84,21	blastp
345	lovegrass gb167 DN480336	pasto llorón	623	99	86,84	blastp
346	lovegrass gb167 DN480721	pasto llorón	624	99	83,33	tblastn
347	lovegrass gb167 EH184046	pasto llorón	625	99	85,96	blastp
348	maize gb169.2 AI586696	maíz	626	99	84,21	blastp
349	maize gb 169.2 AI619158	maíz	627	99	85,22	blastp
350	maize gb 169.2 AI619355	maíz	628	99	84,21	blastp
351	maize gb169.2 AI783324	maíz	629	99	85,96	blastp
352	maize gb169.2 DQ244850	maíz	630	99	84,21	blastp
353	maize gb169.2 FK957562	maíz	631	99	83,33	tblastn
354	maize gb169.2 X86553	maíz	632	99	85,96	blastp
355	millet gb161 CD725537	mijo	633	99	85,96	blastp
356	pseudoroegneria gb167 FF35 9011	pseudoroegneria	634	99	84,21	blastp
357	rice gb157.3 C26798	arroz	635	99	83,33	blastp
358	sorghum bg161.crp AI621929	sorgo	636	99	87,72	blastp
359	sorghum gb161.crp AI666179	sorgo	637	99	85,96	blastp
360	sorghum gb161.crp CD22229 3	sorgo	638	99	81,58	blastp
361	sugarcane gb157.3 BQ478960	caña de azúcar	639	99	86,84	blastp

ES 2 674 256 T3

362	sugarcane gb157.3 BQ537227	caña de azúcar	640	99	85,96	blastp
363	sugarcane gb157.3 CA074008	caña de azúcar	641	99	85,96	blastp
364	sugarcane gb157.3 CA112912	caña de azúcar	642	99	81,74	blastp
365	switchgrass gb167 DN150202	pasto varilla	643	99	86,84	blastp
366	switchgrass gb167 FE615220	pasto varilla	644	99	86,84	blastp
367	switchgrass gb167 FL725679	pasto varilla	645	99	85,96	blastp
368	switchgrass gb167 FL732781	pasto varilla	646	99	86,84	blastp
369	switchgrass gb167 FL846775	pasto varilla	647	99	85,34	blastp
370	switchgrass gb167 FL899116	pasto varilla	648	99	85,96	blastp
371	switchgrass gb167 FL979422	pasto varilla	649	99	85,96	blastp
372	wheat gb1 64 BE398366	trigo	650	99	84,21	blastp
373	wheat gb1 64 BE399053	trigo	651	99	84,21	blastp
374	barley gb157.3 BF623452	cebada	652	100	85,25	tblastn
375	maize gb169.2 AW267619	maíz	653	100	80,58	tblastn
376	pseudoroegneria gb167 FF35 2828	pseudoroegneria	654	100	84,89	blastp
377	sorghum gb161.crp AW43824	sorgo	655	100	86,43	blastp
378	wheat gb164 BQ905354	trigo	656	100	85,97	tblastn
755	amborella gb166 CD482678	amborella	764	97	81,03	blastp
756	castorbean gb160 AJ605571	ricino	765	97	80,24	blastp
757	cotton gb164 AI055329	algodón	766	97	83,79	blastp
758	cotton gb164 AI731742	algodón	767	97	83,79	blastp
759	liriodendron gb166 CK74443 0	tulípero	768	97	81,42	blastp
760	papaya gb165 EX246150	papaya	769	97	81,82	blastp
761	periwinkle gb164 EG554262	vincapervinca	770	97	80,24	blastp
762	spurge gb161 AW990927	euforbio	771	97	80,63	blastp
763	tobacco gb162 CV018899	tabaco	772	97	80,24	blastp
773	canola gb161 DW999739	canola	774	747	82,78	blastp

Tabla 2: Se proporcionan polinucleótidos y polipéptidos que son homólogos a los polinucleótidos o polipéptidos identificados de la tabla 1. Obsérvese que las siguientes secuencias polipeptídicas son 100 % idénticas: la SEQ ID NO:201 es idéntica a la SEQ ID NO:204; La SEQ ID NO:409 es idéntica a la SEQ ID NO:410; la SEQ ID NO:411 es idéntica a la SEQ ID NO:412; la SEQ ID NO:456 es idéntica a la SEQ ID NO:463; la SEQ ID NO:458 es idéntica a la SEQ ID NO:462; la SEQ ID NO:472 es idéntica a la SEQ ID NO:474; la SEQ ID NO:479 es idéntica a la SEQ ID NO:482; la SEQ ID NO:514 es idéntica a la SEQ ID NO:516; la SEQ ID NO:522 es idéntica a la SEQ ID NO:545; la SEQ ID NO:600 es idéntica a la SEQ ID NO:604, 606 y 608; la SEQ ID NO:602 es idéntica a la SEQ ID NO:607 y 609; la SEQ ID NO:610 es idéntica a la SEQ ID NO:611; la SEQ ID NO:620 es idéntica a la SEQ ID NO:643; la SEQ ID NO:622 es idéntica a la SEQ ID NO:630, 634, 650 y 65; la SEQ ID NO:629 es idéntica a la SEQ ID NO:632; la SEQ ID NO:637 es idéntica a la SEQ ID NO:640 y 641; la SEQ ID NO: 644 es idéntica a la SEQ ID NO:646; la SEQ ID NO:648 es idéntica a la SEQ ID NO:649; la SEQ ID NO:650 es idéntica a SEQ ID NO:651; la SEQ ID NO:624 es idéntica a la SEQ ID NO:625.

Ejemplo 3**Producción de transcriptoma de arabidopsis y análisis de correlación de alto rendimiento usando micromatriz de oligonucleótidos del genoma completo de arabidopsis de 44k**

5 Para producir un análisis de correlación de alto rendimiento, los inventores de la presente invención utilizaron una micromatriz de oligonucleótidos de Arabidopsis thaliana, producida por Agilent Technologies [Hypertext Transfer Protocol://World Wide Web (.) chem. (.) agilent (.) com/Scripts/PDS (.) asp?IPage=50879]. La matriz de oligonucleótidos representa aproximadamente 40.000 genes y transcripciones de *A. thaliana* diseñados basándose en datos de la base de datos TIGR ATH1 v.5 y bases de datos de Arabidopsis MPSS (Universidad de Delaware).
10 Para definir las correlaciones entre los niveles de expresión de ARN y los componentes del rendimiento o los parámetros relacionados con el vigor, se analizaron diversas características de la planta de 15 ecotipos diferentes de Arabidopsis. Entre ellos, nueve ecotipos que abarcan la varianza observada se seleccionaron para el análisis de expresión de ARN. La correlación entre los niveles de ARN y los parámetros caracterizados se analizó mediante la prueba de correlación de Pearson [Hypertext Transfer Protocol://World Wide Web (.) davidmlane (.) com/hyperstat/A34739 (.) html].

15 Procedimientos experimentales

Extracción de ARN- se tomaron muestras de cinco tejidos en diferentes fases del desarrollo, incluyendo raíz, hoja, flor en antesis, semilla a los 5 días después de la floración (DAF) y semilla a 12 DAF, que representaban diferentes características de la planta, y se extrajo el ARN usando reactivo TRIzol de Invitrogen [Hypertext Transfer Protocol://World Wide Web (.) invitrogen (.) com/content (.) cfm? Pageid=469]. Por conveniencia, cada tipo de tejido de información de expresión de micromatriz ha recibido una ID de conjunto tal como se resume en la tabla 3 a continuación.

Tabla 3**Conjuntos experimentales de transcripción de Arabidopsis**

Conjunto de expresión	ID del conjunto
Raíz	A
Hoja	B
Flor	C
Semilla 5 DAF	D
Semilla 12 DAF	E

Tabla 3. Se proporcionan los conjuntos experimentales de transcripción de Arabidopsis (A-E). DAF = días después de la floración.

25 Se tomaron aproximadamente 30-50 mg de tejido de las muestras. Los tejidos pesados se trituraron utilizando mazo y mortero en nitrógeno líquido y se resuspendieron en 500 µl de Reactivo TRIzol. Al lisado homogeneizado, se le añadieron 100 µl de cloroformo seguido de precipitación usando isopropanol y dos lavados con etanol al 75 %. El ARN se eluyó en 30 µl de agua libre de ARNasa. Las muestras de ARN se limpiaron usando el protocolo de limpieza del minikit RNeasy de Qiagen según el protocolo del fabricante.

30 **Evaluación de los componentes de rendimiento y los parámetros relacionados con el vigor-** se usaron ocho de los nueve ecotipos de Arabidopsis en cada uno de los 5 bloques repetitivos (denominados A, B, C, D y E), conteniendo cada uno 20 plantas por parcela cultivadas en condiciones de invernadero de control 22 °C, se añadió fertilizante 20:20:20 (relaciones en peso) N:P:K [nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K)]. Durante este tiempo, los datos fueron recopilados, documentados y analizados. Se recopilaron datos adicionales a través de la fase de
35 plántulas de plantas cultivadas en cultivo tisular en placas de agar transparentes de cultivo vertical. La mayoría de los parámetros elegidos se analizaron mediante imágenes digitales.

Imagenología digital en cultivo tisular- Se usó un sistema de adquisición de imágenes en laboratorio, que consiste en una cámara réflex digital (Canon EOS 300D) conectada con una lente de 55 mm de distancia focal (serie Canon EF-S), montada en un dispositivo de reproducción (Kaiser RS), que incluía 4 unidades de iluminación (4 bombillas de iluminación de 150 vatios) y ubicado en un cuarto oscuro, para capturar imágenes de plántulas sembradas en
40 placas cuadradas de agar.

Imagenología digital en invernadero- El proceso de captura de imágenes se repitió cada 3-4 días desde el día 7 hasta el día 30. La misma cámara conectada con una lente de 24 mm de distancia focal (serie Canon EF), colocada

en un soporte de hierro hecho a medida, se usó para capturar imágenes de plantas más grandes sembradas en cubas blancas en un invernadero de entorno controlado. Las cubas blancas eran de forma cuadrada con medidas de 36 x 26,2 cm y 7,5 cm de profundidad. Durante el proceso de captura, las cubas se colocaron debajo del soporte de hierro, evitando la luz solar directa y la proyección de sombras. Este proceso se repitió cada 3-4 días durante hasta 30 días.

Se usó un sistema de análisis de imágenes, que consiste en una computadora de escritorio personal (procesador Intel P4 a 3,0 GHz) y un programa de dominio público - ImageJ 1.37, programa de procesamiento de imágenes basado en Java, desarrollado en los Institutos Nacionales de Salud de EE. UU., disponible gratuitamente en Internet en Hypertext Transfer Protocol://rsbweb (.) nih (.) gov/. Las imágenes se capturaron con una resolución de 6 megapíxeles (3072 x 2048 píxeles) y se almacenaron en un formato de compresión baja JPEG (estandar Joint Photographic Experts Group). A continuación, los datos analizados se guardaron en archivos de texto y se procesaron usando el software de análisis estadístico JMP (instituto SAS).

Análisis foliar- Usando el análisis digital, se calcularon los datos de las hojas, incluidos el número de hojas, el área, el perímetro, la longitud y la anchura. El día 30, se seleccionaron 3-4 plantas representativas de cada parcela de bloques A, B y C. Las plantas se disecaron, cada hoja se separó y se introdujo entre dos bandejas de vidrio, se tomó una foto de cada planta y los diversos parámetros (tales como el área total de la hoja, la longitud laminar, etc.) se calcularon a partir de las imágenes (figuras 1a-d). La circularidad del cuerpo de la hoja se calculó como la anchura laminar dividida por la longitud laminar.

Análisis radicular- Durante 17 días, los diferentes ecotipos se cultivaron en placas de agar transparentes. Las placas se fotografiaron cada 2 días a partir del día 7 en la sala de fotografía y se documentó el desarrollo de las raíces (figuras 2a-b). El ritmo de crecimiento se calculó de acuerdo con la fórmula I como se ha descrito anteriormente [Ritmo de crecimiento relativo del área = $(\Delta \text{Área} / \Delta t) * (1 / \text{Área } t_0)$].

Análisis del ritmo de crecimiento vegetativo- El ritmo de crecimiento se calculó dividiendo el área añadida (Δ Área) por el número de días para cada intervalo (Δt). El análisis finalizó con la aparición de plantas solapantes. El ritmo de crecimiento se calculó según la fórmula IV.

Fórmula IV:

$$\text{Ritmo de crecimiento} = \Delta \text{Área} / \Delta t$$

Para la comparación entre ecotipos, el ritmo calculado se normalizó usando la fase de desarrollo de la planta, representada por el número de hojas verdaderas. En los casos en que las plantas con 8 hojas se habían muestreado dos veces (por ejemplo, el día 10 y el día 13), solo se eligió la muestra más grande y se añadió a la comparación por Anova.

Análisis de semillas en silicuas- El día 70, se recogieron 15-17 silicuas de cada parcela en los bloques D y E. Las silicuas elegidas eran de color marrón claro, pero aún intactas. Las silicuas se abrieron en la sala de fotografía y las semillas se dispersaron en una bandeja de vidrio, se tomó una imagen digital de alta resolución para cada parcela. Usando las imágenes, se determinó el número de semillas por silicua.

Peso promedio de las semillas- Al final del experimento, se recogieron todas las semillas de las parcelas de los bloques A-C. Se midió un peso promedio de 0,02 gramos de cada muestra, las semillas se dispersaron en una bandeja de vidrio y se tomó una fotografía. Usando el análisis digital, se calculó el número de semillas en cada muestra.

Porcentaje de aceite en las semillas- Al final del experimento, se recogieron todas las semillas de las parcelas de los bloques A-C. Las semillas Columbia de 3 parcelas se mezclaron trituradas y se montaron a continuación en la cámara de extracción. Se usaron 210 ml de n-Hexano (No. de cat. 080951 Biolab Ltd.) como disolvente. La extracción se realizó durante 30 horas a una temperatura media de 50 °C. Una vez que la extracción ha terminado, el n-Hexano se evaporó usando el evaporador a 35 °C y condiciones de vacío. El proceso se repitió dos veces. La información obtenida del extractor Soxhlet (Soxhlet, F. Die gewichtsanalytische Bestimmung des Milchfettes, Polytechnisches J. (Dingler's) 1879, 232, 461) se usó para crear una curva de calibración para la RMN de baja resonancia. El contenido de aceite de todas las muestras de semillas se determinó usando la RMN de baja resonancia (MARAN Ultra de Oxford Instruments) y su paquete de software MultiQuant.

Análisis de longitud de las silicuas- El día 50 desde la siembra, se tomaron muestras de 30 silicuas de diferentes plantas en cada parcela en el bloque A. Las silicuas seleccionadas eran de color amarillo verdoso y se recogieron de las partes inferiores del tallo de una planta cultivada. Se tomó una fotografía digital para determinar la longitud de la silicua.

Peso seco y rendimiento de semillas- El día 80 desde la siembra, las plantas de los bloques A-C se cosecharon y se dejaron secar a 30 °C en una cámara de secado. La biomasa y el peso de la semilla de cada parcela se separaron, se midieron y se dividieron por el número de plantas. Peso seco = peso total de la parte vegetativa por encima del suelo (excluidas las raíces) después de secar a 30 °C en una cámara de secado; Rendimiento de

semillas por planta = peso total de semillas por planta (g).

Rendimiento de aceite- El rendimiento de aceite se calculó usando la fórmula V.

Fórmula V:

Rendimiento de aceite de semillas = rendimiento de semillas por planta (g) x % de aceite en la semilla

5 **Índice de cosecha-** El índice de cosecha se calculó usando la fórmula III como se ha descrito anteriormente [Índice de cosecha = Rendimiento de semilla promedio por planta/Peso seco promedio].

Resultados experimentales

Nueve ecotipos diferentes de *Arabidopsis* se cultivaron y caracterizaron para 18 parámetros (nombrados como vectores). Los parámetros de los datos se resumen en la tabla 4 a continuación.

Tabla 4

Parámetros correlacionados de *Arabidopsis* (vectores)

10

Parámetro correlacionado con	ID de correlación
Longitud de la raíz el día 13 (cm)	1
Longitud de la raíz el día 7 (cm)	2
Crecimiento relativo de la raíz (cm/día) día 13	3
Peso fresco por planta (g) en la fase de subida a flor	4
Materia seca por planta (g)	5
Ritmo de crecimiento vegetativo (cm ² / día) hasta 8 hojas verdaderas	6
Circularidad del cuerpo de la hoja	7
Anchura de la lámina (cm)	8
Longitud de la lámina (cm)	9
Área foliar total por planta (cm)	10
Peso de 1000 semillas (g)	11
% de aceite por semilla	12
Semillas por silicua	13
Longitud de la silicua (cm)	14
Rendimiento de semillas por planta (g)	15
Rendimiento de aceite por planta (mg)	16
Índice de cosecha	17
Anchura/longitud de la hoja	18

Tabla 4. Se proporcionan los parámetros correlacionados de *Arabidopsis* (ID de correlación No. 1-18).

Los valores caracterizados se resumen en las tablas 5 y 6 a continuación.

Tabla 5

Parámetros medidos de ecotipos de Arabidopsis

Ecotipo	Rendimiento de semillas por planta (g)	Rendimiento de aceite por planta (mg)	% de aceite por semilla	Peso de 1000 semillas (g)	Materia seca por planta (g)	Índice de cosecha	Área foliar total por planta (cm)	Semillas por silicua	Longitud de la silicua (cm)
An-1	0,34	118,63	34,42	0,0203	0,64	0,53	46,86	45,44	1,06
Col-0	0,44	138,73	31,19	0,0230	1,27	0,35	109,89	53,47	1,26
Ct-1	0,59	224,06	38,05	0,0252	1,05	0,56	58,36	58,47	1,31
Cvi (N8580)	0,42	116,26	27,76	0,0344	1,28	0,33	56,80	35,27	1,47
Gr-6	0,61	218,27	35,49	0,0202	1,69	0,37	114,66	48,56	1,24
Kondara	0,43	142,11	32,91	0,0263	1,34	0,32	110,82	37,00	1,09
Ler-1	0,36	114,15	31,56	0,0205	0,81	0,45	88,49	39,38	1,18
Mt-0	0,62	190,06	30,79	0,0226	1,21	0,51	121,79	40,53	1,18
Shakdara	0,55	187,62	34,02	0,0235	1,35	0,41	93,04	25,53	1,00

Tabla 5. Se proporcionan los parámetros medidos en ecotipos de Arabidopsis: Rendimiento de semillas por planta (cm); rendimiento de aceite por planta (mg); % de aceite por semilla; peso de 1000 semillas (g); materia seca por planta (g); índice de cosecha; área foliar total por planta (cm); semillas por silicua; longitud de la silicua (cm).

Tabla 6

Parámetros medidos adicionales de ecotipos de Arabidopsis

Ecotipo	Crec. veg.	Crecimiento relativo de la raíz	Longitud de la raíz el día 7	Longitud de la raíz el día 13	Peso fresco por planta	Longitud de la lámina	Anchura de la lámina	Anchura/longitud de la hoja	Circularidad del cuerpo de la hoja
An-1	0,313	0,631	0,937	4,419	1,510	2,767	1,385	0,353	0,509
Col-0	0,378	0,664	1,759	8,530	3,607	3,544	1,697	0,288	0,481
Ct-1	0,484	1,176	0,701	5,621	1,935	3,274	1,460	0,316	0,450
Cvi (N858 0)	0,474	1,089	0,728	4,834	2,082	3,785	1,374	0,258	0,370
Gr-6	0,425	0,907	0,991	5,957	3,556	3,690	1,828	0,356	0,501
Kondara	0,645	0,774	1,163	6,372	4,338	4,597	1,650	0,273	0,376
Ler-1	0,430	0,606	1,284	5,649	3,467	3,877	1,510	0,305	0,394
Mt-0	0,384	0,701	1,414	7,060	3,479	3,717	1,817	0,335	0,491
Shakdara	0,471	0,782	1,251	7,041	3,710	4,149	1,668	0,307	0,409

Tabla 6. Se proporcionan los parámetros medidos en ecotipos de Arabidopsis: Crec. Veg. = Ritmo de crecimiento vegetativo (cm²/día) hasta 8 hojas verdaderas; crecimiento relativo de la raíz = crecimiento relativo de la raíz (cm/ía; longitud de la raíz el día 7 (cm); longitud de la raíz el día 13 (cm); peso fresco por planta (g) en la fase de subida a flor; longitud de la lámina = longitud de la lámina (cm); anchura de la lámina = anchura de la lámina (cm); anchura/longitud de la hoja; circularidad del cuerpo de la hoja.

Las tablas 7-9, a continuación, proporcionan los genes seleccionados, los parámetros caracterizados (que se usan como eje x para la correlación) y el transcriptoma tisular correlacionado junto con el valor de correlación (R, calculado usando la correlación de Pearson).

Tabla 7

Genes seleccionados de Arabidopsis y su correlación con el rendimiento (rendimiento de semillas, rendimiento de aceite, contenido de aceite), la biomasa, el ritmo de crecimiento y/o componentes de vigor entre diferentes conjuntos de transcriptomas

Nombre del gen	Nombre del grupo	Conj. exp.	Vec. de corr.	R	Conj. exp.	Vec. de corr.	R	Conj. exp.	Vec. de corr.	R	Conj. exp.	Vec. de corr.	R
BDL112	AT3G23510	B	7	0,84	D	17	0,90	D	8	-0,88	D	10	-0,94
BDL113	AT2G45310	B	8	0,85	D	13	0,91	D	14	0,91	B	10	0,83
BDL114	AT5G27820	B	16	0,92	D	6	0,88	B	15	0,94			
BDL115	AT4G11090	C	8	0,85	A	8	0,81	C	10	0,90	B	10	0,92
BDL116	AT4G24175	B	16	0,92	B	15	0,91						
BDL119	AT3G47965	D	16	0,93	D	15	0,93						
BDL120	AT3G03230	D	16	0,95	D	3	0,89	D	15	0,96			
BDL122	AT3G49000	D	17	0,96	D	8	-0,92	D	10	-0,96	E	6	0,83
BDL123	AT2G21860	A	16	0,82	D	13	0,92	D	14	0,94	A	15	0,86
BDL124	AT5G51590	D	12	0,93	C	16	0,93	A	1	-0,85	D	2	-0,91
BDL125	AT3G16180	D	16	-0,91	D	15	-0,93						
BDL128	AT1G60770	D	5	-0,86	D	17	0,82	D	8	-0,91	E	14	0,88
BDL130	AT3G03870	C	9	-0,82	D	13	0,85	D	14	0,94	C	6	0,85
BDL131	AT4G27450	A	1	0,92	A	2	0,91						
BDL132	AT4G23730	D	13	0,90	C	14	0,94	D	14	0,91	C	3	0,81
BDL133	AT3G06150	D	13	0,86	C	14	0,90	D	14	0,92			
BDL134	AT3G28420	D	13	0,92	D	14	0,91	E	3	0,81	E	11	0,80
BDL135	AT3G18600	D	12	0,96	D	16	0,87	D	3	0,93	D	2	-0,81

ES 2 674 256 T3

BDL136	AT3G22 990	D	12	0,90	C	16	0,83	D	16	0,81	D	3	0,89
BDL137	AT5G14 530	B	12	0,83	D	12	0,83	B	16	0,83	D	16	0,81
BDL139	AT1G29 800	C	13	0,87	B	13	0,85						
BDL141	AT1G29 980	D	18	0,90	C	16	0,81	B	16	0,81	A	3	0,83
BDL142	AT2G39 110	C	16	0,82	D	16	0,83	B	3	0,86	D	3	0,90
BDL143	AT1G62 810	A	13	0,94	D	13	0,82						
BDL144	AT3G14 890	C	16	0,81									
BDL145	AT1G24 470	C	13	0,89	B	13	0,82	D	14	0,80			
BDL146	AT3G09 310	C	14	0,85	C	3	0,81	B	3	0,92	A	3	0,91
BDL148	AT4G35 785	D	17	0,91	D	10	-0,93	D	4	-0,89	B	3	0,82
BDL42	AT5G13 170	B	11	0,88									
BDL51	AT5G64 260	E	9	-0,81	A	8	-0,82	D	13	-0,83	B	14	0,82
BDL54	AT2G41 090	A	6	0,82	B	3	-0,86						
BDL60	AT2G45 200	C	7	-0,88									
BDL65	AT4G20 360	B	7	-0,81	B	18	-0,88	B	12	-0,82	D	11	0,89
BDL78	AT3G26 520	D	13	0,84									
BDL149	AT5G15 750	B	14	0,83									
BDL149	AT5G15 750	A	14	0,95	B	3	0,89						

Tabla 7. Se proporcionan genes seleccionados de Arabidopsis y su correlación con el rendimiento (rendimiento de semillas, rendimiento de aceite, contenido de aceite), la biomasa, el ritmo de crecimiento y/o componentes de vigor entre diferentes conjuntos de transcriptomas. Vec. de corr. = vector de correlación; Conj. exp. = conjunto experimental.

Tabla 8

Genes seleccionados de Arabidopsis y su correlación con el rendimiento (rendimiento de semillas, rendimiento de aceite, contenido de aceite), la biomasa, el ritmo de crecimiento y/o componentes de vigor entre diferentes conjuntos de transcriptomas

Nombre del gen	Nombre del grupo	Conj. exp.	Vec. de corr.	R	Conj. exp.	Vec. de corr.	R	Conj. exp.	Vec. de corr.	R	Conj. exp.	Vec. de corr.	R
BDL112	AT3G23510	D	4	-0,84									
BDL113	AT2G45310												
BDL114	AT5G27820												
BDL115	AT4G11090	A	10	0,82	D	10	0,80	C	4	0,93	B	4	0,96
BDL116	AT4G24175												
BDL119	AT3G47965												
BDL120	AT3G03230												
BDL122	AT3G49000	D	4	-0,84	A	11	0,88						
BDL123	AT2G21860												
BDL124	AT5G51590	C	15	0,91									
BDL125	AT3G16180												
BDL128	AT1G60770	D	10	-0,84	A	1	-0,94	D	1	-0,86	A	2	-0,83
BDL130	AT3G03870												
BDL131	AT4G27450												
BDL132	AT4G23730												
BDL133	AT3G06150												
BDL134	AT3G28420												
BDL135	AT3G18600												
BDL136	AT3G22990												
BDL137	ATSG14530	C	3	0,89	D	3	0,89						
BDL139	AT1G29800												
BDL141	AT1G29980	C	15	0,84	B	15	0,85						
BDL142	AT2G39110												
BDL143	AT1G62810												
BDL144	AT3G14890												
BDL145	AT1G24470												
BDL146	AT3G09310	A	2	-0,81	C	11	0,83	D	11	0,81			
BDL148	AT4G35785	E	1	0,88									

BDL42	AT5G13 170												
BDL51	AT5G64 260	D	14	-0,88	E	6	-0,82	B	11	0,87			
BDL54	AT2G41 090												
BDL60	AT2G45 200												
BDL65	AT4G20 360												
BDL78	AT3G26 520												
BDL149	AT5G15 750												
BDL149	AT5G15 750	D	4	-0,84									

Tabla 8. Se proporcionan genes seleccionados de Arabidopsis y su correlación con el rendimiento (rendimiento de semillas, rendimiento de aceite, contenido de aceite), la biomasa, el ritmo de crecimiento y/o componentes de vigor entre diferentes conjuntos de transcriptomas. Vec. de corr. = vector de correlación; Conj. exp. = conjunto experimental.

Tabla 9

Genes seleccionados de Arabidopsis y su correlación con el rendimiento (rendimiento de semillas, rendimiento de aceite, contenido de aceite), la biomasa, el ritmo de crecimiento y/o componentes de vigor entre diferentes conjuntos de transcriptomas

Nombre del gen	Nombre del grupo	Conj. exp.	Vec. de corr.	R
BDL112	AT3G23510			
BDL113	AT2G45310			
BDL114	AT5G27820			
BDL115	AT4G11090	A	4	0,86
BDL116	AT4G24175			
BDL119	AT3G47965			
BDL120	AT3G03230			
BDL122	AT3G49000			
BDL123	AT2G21860			
BDL124	AT5G51590			
BDL125	AT3G16180			
BDL128	AT1G60770			
BDL130	AT3G03870			
BDL131	AT4G27450			
BDL132	AT4G23730			
BDL133	AT3G06150			
BDL134	AT3G28420			
BDL135	AT3G18600			
BDL136	AT3G22990			

BDL137	AT5G14530			
BDL139	AT1G29800			
BDL141	AT1G29980			
BDL142	AT2G39110			
BDL143	AT1G62810			
BDL144	AT3G14890			
BDL145	AT1G24470			
BDL146	AT3G09310			
BDL148	AT4G35785			
BDL42	AT5G13170			
BDL51	AT5G64260			
BDL54	AT2G41090			
BDL60	AT2G45200			
BDL65	AT4G20360			
BDL78	AT3G26520			
BDL149	AT5G15750			
BDL149	AT5G15750			

Tabla 9. Se proporcionan genes seleccionados de Arabidopsis y su correlación con el rendimiento (rendimiento de semillas, rendimiento de aceite, contenido de aceite), la biomasa, el ritmo de crecimiento y/o componentes de vigor entre diferentes conjuntos de transcriptomas. Vec. de corr. = vector de correlación; Conj. exp. = conjunto experimental.

Las tablas 10 y 11, a continuación, proporcionan datos sobre los homólogos de genes seleccionados, los parámetros caracterizados (que se usan como eje x para la correlación) y el transcriptoma tisular correlacionado junto con el valor de correlación (R, calculado usando la correlación de Pearson).

Tabla 10

Homólogos de genes seleccionados de Arabidopsis y su correlación con el rendimiento (rendimiento de semillas, rendimiento de aceite, contenido de aceite), la biomasa, el ritmo de crecimiento y/o componentes de vigor entre diferentes conjuntos de transcriptomas

Nombre del gen	Nombre del grupo	Conj. exp.	Vec. de corr.	R	Conj. exp.	Vec. de corr.	R	Conj. exp.	Vec. de corr.	R	Conj. exp.	Vec. de corr.	R
BDL110_H0	AT1G21760	D	17	0,97	D	8	-0,81	B	16	0,82	D	10	-0,91
BDL113_H0	AT1G02000	B	13	-0,81									
BDL113_H1	AT2G45315	E	1	0,92									
BDL113_H2	AT4G00110	B	18	-0,84	E	14	0,87	E	11	0,87			
BDL120_H0	AT3G03240	D	16	0,89	C	4	-0,84	D	15	0,88			

BDL78_H0	AT2G36830	B	12	-0,92	C	2	-0,87						
----------	-----------	---	----	-------	---	---	-------	--	--	--	--	--	--

Tabla 10. Se proporcionan homólogos de genes seleccionados de Arabidopsis y su correlación con el rendimiento (rendimiento de semillas, rendimiento de aceite, contenido de aceite), la biomasa, el ritmo de crecimiento y/o componentes de vigor entre diferentes conjuntos de transcriptomas. Vec. de corr. = vector de correlación; Conj. exp. = conjunto experimental.

Tabla 11

Homólogos de genes seleccionados de Arabidopsis y su correlación con el rendimiento (rendimiento de semillas, rendimiento de aceite, contenido de aceite), la biomasa, el ritmo de crecimiento y/o componentes de vigor entre diferentes conjuntos de transcriptomas

5

Nombre del gen	Nombre del grupo	Conj. exp.	Vec. de corr.	R	Conj. exp.	Vec. de corr.	R	Conj. exp.	Vec. de corr.	R	Conj. exp.	Vec. de corr.	R
BDL110_H0	AT1G21760	D	4	-0,85	B	3	0,81	A	3	0,92	B	15	0,87
BDL113_H0	AT1G02000												
BDL113_H1	AT2G45315												
BDL113_H2	AT4G00110												
BDL120_H0	AT3G03240												
BDL78_H0	AT2G36830												

Tabla 11. Se proporcionan homólogos de genes seleccionados de Arabidopsis y su correlación con el rendimiento (rendimiento de semillas, rendimiento de aceite, contenido de aceite), la biomasa, el ritmo de crecimiento y/o componentes de vigor entre diferentes conjuntos de transcriptomas. Vec. de corr. = vector de correlación; Conj. exp. = conjunto experimental.

Ejemplo 4

Clonación de genes y generación de vectores binarios para la expresión en plantas

10

Para validar su papel en la mejora del contenido de aceite, el rendimiento de la planta, el rendimiento de semillas, la biomasa, el ritmo de crecimiento, la TEAB, la EUN y/o el vigor, los genes seleccionados se sobreexpresaron en plantas, de la siguiente manera.

Estrategia de clonación

15

20

25

Los genes enumerados en el ejemplo 1 anteriormente en esta memoria se clonaron en vectores binarios para la generación de plantas transgénicas. Para la clonación, se identificó por primera vez el marco de lectura abierta (ORF) de longitud completa. En el caso de los grupos de ORF-EST y en algunos casos ya publicados, se analizaron las secuencias de ARNm para identificar el marco de lectura abierto completo comparando los resultados de varios algoritmos de traducción con proteínas conocidas de otras especies vegetales. Para clonar los ADNc de longitud completa, se realizó la transcripción inversa (RT) seguida de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; RT-PCR) en el ARN total extraído de hojas, flores, silicuas u otros tejidos vegetales, cultivados en condiciones normales. El ARN total se extrajo como se describe en el ejemplo 2 anterior. La producción de ADNc y la amplificación por PCR se realizó usando protocolos estándar descritos en otra parte (Sambrook J., E.F. Fritsch, y T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual., 2ª Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York.) que son bien conocidos por los expertos en la técnica. Los productos de PCR se purificaron usando el kit de purificación de PCR (Qiagen). En caso de que no se haya encontrado la secuencia codificante completa, se usó el kit RACE de Ambion (RACE = `_R_apid_A_ccess to _c_DNA_E_nds`) para acceder al transcrito completo de ADNc del gen a partir de las muestras de ARN descritas anteriormente. El procedimiento RACE se realizó para los genes BDL-108 (SEQ ID NO:726), BDL-110 (SEQ ID NO:728) y BDL-111 (SEQ ID NO:730) usando las secuencias de cebadores enumeradas

en la tabla 12, a continuación. Los productos de RACE se clonaron en vectores de número de copias elevados, seguido por secuenciación. La información del procedimiento RACE se usó para la clonación del ORF de longitud completa de los genes correspondientes.

Tabla 12

Cebadores de RACE usados para secuenciación de los genes de la invención identificados

5

Nombre del gen	Cebadores usados para amplificación	Plásmido de número de copias elevado usados para la clonación de productos de RACE
BDL108_Race -	Dir: BDL108_ Externo_Race (SEQ ID NO:853): GCTATACAACATGGGAGTTATACC	Topo TA
BDL108_Race	Dir: BDL108_ Interno_Race (SEQ ID NO:854): CTATCGACAGTGCTGGTACA	
BDL108_Race	Inv:3' Cebador Externo Race (SEQ ID NO:855): GCGAGCACAGAATTAATACGACT	
BDL108_Race	Inv:3' Cebador interno Race (SEQ ID NO:856): CGCGGATCCGAATTAATACGACTCACTATAGG	
BDL110_Race -	Dir: BDL110_ Externo_Race (SEQ ID NO:857): TGCAGTCTAAATACGATGGATCA	Topo TA
BDL110_Race	Dir: BDL110_ Interno_Race (SEQ ID NO:858): GAGTAGGAACACTTACATTCTGA	
BDL110_Race	Inv:3' Cebador Externo Race (SEQ ID NO:859): GCGAGCACAGAATTAATACGACT	
BDL110_Race	Inv:3' Cebador interno Race (SEQ ID NO:860): CGCGGATCCGAATTAATACGACTCACTATAGG	
BDL111_Race	Dir: BDL111_ Externo_Race (SEQ ID NO:861): TCTCAAGAAGCTCTTCGTGGA	Topo TA
BDL111_Race	Dir: BDL111_ Interno_Race (SEQ ID NO:862): GAGGAAGAATCTGAGCCGAT	
BDL111_Race	Inv:3' Cebador Externo Race (SEQ ID NO:863): GCGAGCACAGAATTAATACGACT	
BDL111_Race	Inv:3' Cebador interno Race (SEQ ID NO:864): CGCGGATCCGAATTAATACGACTCACTATAGG	

Tabla 12. Se proporcionan los cebadores de PCR usados para secuenciación RACE. Dir = cebador directo; Inv = cebador inverso;

Cuando se clonó ADN genómico, como en el caso del gen BDL119, el gen se amplificó por PCR directa en ADN genómico extraído de tejido foliar usando el kit DNAeasy (Qiagen No. de cat. 69104).

10

Habitualmente, se sintetizaron 2 conjuntos de cebadores para la amplificación de cada gen de un ADNc o una secuencia genómica; un conjunto externo de cebadores y un conjunto interno (cebadores de PCR anidados). Cuando fue necesario (p. ej., cuando la primera reacción de PCR no dio como resultado un producto satisfactorio para la secuenciación), se usó un cebador adicional (o dos) de los cebadores de PCR anidados. La tabla 13 a continuación proporciona los cebadores usados para la clonación de genes seleccionados.

Tabla 13

Los cebadores de PCR usados para clonar los genes de la invención

Nombre del gen	Enzimas de restricción usadas para la clonación	Cebadores usados para amplificación
BDL42	Sall, Xbal	Dir Anidado: BDL42_NF_Sall (SEQ ID NO:865)
		AATGTCGACAGAAAATGGGAGTCATGATCAA
		Dir Externo: BDL42_EF_Sall (SEQ ID NO:866)
		AATGTCGACTGCTATAGAAAATGGGAGTCATG
		Inv Anidado: BDL42_NR_Xbal (SEQ ID NO:867)
		TATCTAGATCATCAAACGGTTTCAGGACGAG
		Inv Externo: BDL42_ER_Xbal (SEQ ID NO:868)
		TATCTAGATGACACTTCAAACGGTTTCAG
BDL46	Sall, SmaI	Dir Anidado: BDL46_NF_Sall (SEQ ID NO:869)
		ACGGTCGACACTTGATGACAATGGGCGAC
		Inv Anidado: BDL46_NR_SmaI (SEQ ID NO:870)
		TCCCGGGTTATTACCTACAAGTAGATGATTCTACACC
BDL51	XbaI, SacI	Dir: BDL51_F_XbaI (SEQ ID NO:871)
		AATCTAGATCTCAATGGCTTCTAATTACCG
		Inv Anidado: BDL51_NR_SacI (SEQ ID NO:872)
		AGAGCTCGTGTCTTACTCACATCCCTTGG
		Inv Externo: BDL51_ER_SacI (SEQ ID NO:873)
TGAGCTCTGCCACGTGTCTTACTCACATC		
BDL52	Sall, XbaI	Dir: BDL52_F_Sall (SEQ ID NO:874)
		AATGTCGACCTATAATGGCTGGAATGTGTTG
		Inv Anidado: BDL52_NR_XbaI (SEQ ID NO:875)
		TATCTAGATTACCATACTGTTATAGATTTTTTCTC
		Inv Externo: BDL52_ER_XbaI (SEQ ID NO:876)
		TATCTAGACATCAACAAAGGCAGCTAAATC
BDL54	Sall, XbaI	Dir Anidado: BDL54_NF_Sall (SEQ ID NO:877)
		AATGTCGACAAACAATGGCGAATAAGTTCAC
		Inv Anidado: BDL54_NR_XbaI (SEQ ID NO:878)
		TATCTAGATCATCAAGAAAACAACGCTTCCG
BDL56	Sall, XbaI	Dir Anidado: BDL56_NF_Sall (SEQ ID NO:879)
		AGCGTCGACCAAATATGACTGTGATGAATCACC
		Dir Externo: BDL56_EF_Sall (SEQ ID NO:880)
		ATAGTCGACAAAGAGATCTTCACAAATATGACTG

ES 2 674 256 T3

Nombre del gen	Enzimas de restricción usadas para la clonación	Cebadores usados para amplificación
		Inv Anidado: BDL56_NR_Xbal (SEQ ID NO: 881)
		TATCTAGACTACTATCTCTTATAAGTTGCAACCAAG
		Inv Externo: BDL56_ER_Xbal (SEQ ID NO:882)
		TATCTAGAATAGAAATGGCAAAATGGGTG
BDL59	Sall, Xbal	Dir Anidado: BDL59_NF_Sall (SEQ ID NO:883)
		AATGTCGACCTGCAATGGCTTCTCCTCTT
		Dir Externo: BDL59_EF_Sall (SEQ ID NO:884)
		TAAGTCGACGATCTCTCTCTGCACTCTCTGAC
		Inv Anidado: BDL59_NR_Xbal (SEQ ID NO:885)
		TATCTAGATCAATCTCAGACTCGAACGCGTG
		Inv Externo: BDL59_ER_Xbal (SEQ ID NO:886)
		TATCTAGACTTCAACAATCTCAGACTCGAAC
BDL60	Sall, SacI	Dir Anidado: BDL60_NF_Sall (SEQ ID NO:887)
		AGAGCTCAGGAAAATGACAGAATCGAGTC
		Dir Externo: BDL60_EF_Sall (SEQ ID NO:888)
		AATGTCGACGGAGAGGTTACTGATCTGAATTG
		Inv Anidado: BDL60_NR_SacI (SEQ ID NO:889)
		AGAGCTCAGGAAAATGACAGAATCGAGTC
		Inv Externo: BDL60_ER_SacI (SEQ ID NO:890)
		TGAGCTCAGCTTAGGTGTATGAACATTCTG
BDL65	Sall, SmaI	Dir Anidado: BDL65_NF_Sall (SEQ ID NO:891)
		AATGTCGACTCCAATTCCATCTTCCCATG
		Dir Externo: BDL65_EF_Sall (SEQ ID NO:892)
		AATGTCGACCTCTCCTCTGCTCTCCAATTC
		Inv Anidado: BDL65_NR_SmaI (SEQ ID NO:893)
		TCCCGGGTCATCATTGAGGATCGTCCCA
		Inv Externo: BDL65_ER_SmaI (SEQ ID NO:894)
		TCCCGGGCTTATAATCATTGAGGATCGT
BDL67	Sall, SmaI	Dir Anidado: BDL67_NF_Sall (SEQ ID NO:895)
		AATGTCGACGGATAATGGCTTCGTATGGC
		Inv Anidado: BDL67_NR_SmaI (SEQ ID NO:896)
		TCCCGGGTTATCAGTTTCTCITGGCGATGA
BDL68	Sall, Xbal	Dir Anidado: BDL68_NF_Sall (SEQ ID NO:897)
		TAGGTCGACTAGCCATGGACAACGAAGG

ES 2 674 256 T3

Nombre del gen	Enzimas de restricción usadas para la clonación	Cebadores usados para amplificación
		Inv Anidado: BDL68_NR_Xbal (SEQ ID NO:898)
		TATCTAGATTATTAGCCACTAGGATTATCAAGTC
BDL78	Xbal, SacI	Dir: BDL78_F_Xbal (SEQ ID NO:899)
		AATCTAGATCCGATCATGCCGACCAG
		Inv Anidado: BDL78_NR_SacI_new (SEQ ID NO:900)
		TGAGCTCTTATCAGTAATCGGTGGTAGGCA
		Inv Externo: BDL78_ER_SacI (SEQ ID NO:901)
		TGAGCTCCAGATTAACAACGTTGAATTTGAC
BDL82	Sall, Xbal	Dir Anidado: BDL82_NF_Sall (SEQ ID NO:902)
		AAGGTCGACCCGAGAGACAGAGAGGTTTCG
		Dir Externo: BDL82_EF_Sall (SEQ ID NO:903)
		ATAGTCGACCGAAGTTTGAGCTAAGAATCC
		Inv Anidado: BDL82_NR_Xbal (SEQ ID NO:904)
		TATCTAGATTATTATTCTCCATGGTCGTGAAG
		Inv Externo: BDL82_ER_Xbal (SEQ ID NO:905)
BDL89	Sall, Xbal	Dir Anidado: BDL89_NF_Sall (SEQ ID NO:906)
		AATGTCGACCCAGGATGAAGTTCATTTCTG
		Dir Externo: BDL89_EF_Sall (SEQ ID NO:907)
		AATGTCGACTCTCTCCATCTCCCATCCAG
		Inv Anidado: BDL89_NR_Xbal (SEQ ID NO:908)
		TATCTAGATCATCGCATCACTCAGTCAAACAAAC
		Inv Externo: BDL89_ER_Xbal (SEQ ID NO:909)
BDL95short	Sall, SacI	Dir: BDL95_Short_F (SEQ ID NO:910)
		AATGTCGACGGCGAATGGCTGGATTTC
		Inv Anidado: BDL95_NR_SacI (SEQ ID NO:911)
		TGAGCTCTTATCAGTCCTGATGTGTCTGCTG
BDL100	Sall, SacI	Dir Anidado: BDL100_NF_Sall (SEQ ID NO:912)
		AATGTCGACAACAATGGAGAGCGAGATGGCG
		Dir Externo: BDL100_EF_Sall (SEQ ID NO:913)
		AATGTCGACGAGGAGGAACAACAACACTCATC
		Inv Anidado: BDL100_NR_SacI (SEQ ID NO:914)
		TGAGCTCTCATCATTGAATCATCGGATCACC

ES 2 674 256 T3

Nombre del gen	Enzimas de restricción usadas para la clonación	Cebadores usados para amplificación
		Inv Externo: BDL100_ER_sacl (SEQ ID NO:915)
		TGAGCTCGCAGGTCATTGAATCATCGG
BDL106	Xbal, Sacl	Dir Anidado:BDL106_NF_Xbal (SEQ ID NO:916)
		ATTCTAGAAAACCATGACCGTCGTCTC
		Dir Externo: BDL106_EF_Xbal (SEQ ID NO:917)
		CTTCTAGAGGTCTCITCTCAGATACTCATTAC
		Inv Anidado: BDL106_NR_Sacl (SEQ ID NO:918)
		TGAGCTCTTATTAGAATCTGCAGAAAAGCTAG
		Inv Externo: BDL106_ER_Sacl (SEQ ID NO:919)
		TGAGCTCAGATGTCAAAGAGGGCTTACTC
		Dir Anidado: BDL108_NF_Sall (SEQ ID NO:920)
		AATGTCGACCAGTGATGAGGAAGCTCAAGA
		Dir Externo: BDL108_EF_Sall (SEQ ID NO:921)
		ATAGTCGACCGTTGTTTGCACCACCTTG
		Inv Anidado: BDL108_NR_Xbal (SEQ ID NO:922)
		TATCTAGATTATTAAGCAAGCATGTCGTAGTCA
Inv Externo: BDL108_ER_Xbal (SEQ ID NO:923)		
		TCTCTAGATTAGATCTTTTAAGCAAGCATGTCCG
		Dir Anidado: BDL110_NF_Sall (SEQ ID NO:924)
		ACGGTCGACTCCACATGACTTCAGATGCTC
		Dir Externo: BDL110_EF_Sall (SEQ ID NO:925)
		ACTGTGCGACGAACATCACCCAATTCTCTAGC
		Inv Anidado: BDL110_NR_xbal (SEQ ID NO:926)
		TATCTAGACTACTAGCCGGTGACAAAGTAATC
Inv Externo: BDL110_ER_Xbal (SEQ ID NO:927)		
		TATCTAGACTAATCGTTGGTTGATGTGCTCACTCTAG
		Dir Anidado: BDL111_NF_EcoRV(SEQ ID NO:928)
		TAGATATCAAAAGATGCAAGTTGTTTCTCC
		Dir Externo: BDL111_EF_EcoRV (SEQ ID NO:929)
		TAGATATCCTGTGTGTTTGTATTTATTTGGATC
		Inv Anidado: BDL111_NR_EcoRV(SEQ ID NO:930)
		TAGATATCTCATGATGATCAGTAAGGATGAACATTC
Inv Externo: BDL111_ER_EcoRV (SEQ ID NO:931)		
		TAGATATCTCAGCAAGAAGGTGATGATCAGTAAGG

ES 2 674 256 T3

Nombre del gen	Enzimas de restricción usadas para la clonación	Cebadores usados para amplificación
BDL112	Sall, Xbal	Dir Anidado: BDL112_NF_SI (SEQ ID NO:932)
		TTGGTCCGACCGTAGACACGTATTTTGAAGGG
		Dir Externo: BDL112_EF_SI (SEQ ID NO:933)
		TATGTCGACTTAATGGTAGACCGTAGACACG
		Inv Anidado: BDL112_NR_Xb (SEQ ID NO:934)
		CAATCTAGATTAATGCTCTCAAGAGACACAATAAGC
		Inv Externo: BDL112_ER_Xb (SEQ ID NO:935)
		CTTCTAGATTAGGTCATCAAATATTGTATAGATCG
BDL113 GA	Sacl, Xbal	Producto sintético
BDL114	Sall, Xbal	Dir: BDL114_NF_SI (SEQ ID NO:936)
		TTTGTCGACTCAGCTTCAGATGGTGATTCC
		Inv: BDL114_NR_Xb (SEQ ID NO:937)
		TTTCTAGATCATCAGAGCAACTTGACACCAGC
BDL115	SmaI, SacI	Dir Anidado: BDL115_NF_SmaI (SEQ ID NO:938)
		ACCCGGGAGAAGATGAAGCTAAAATGGGAA
		Dir Externo: BDL115_EF_SmaI (SEQ ID NO:939)
		ACCCGGGGTATATCTCTCAGCGCGAGG
		Inv Anidado: BDL115_NR_SacI (SEQ ID NO:940)
		TGAGCTCTTATTATTTACCGGTTGACCATT
		Inv Externo: BDL115_ER_SacI (SEQ ID NO:941)
		TGAGCTCTTAGCCATTGACTACATACAAGCAA
BDL116	EcoRV	Dir Anidado:BDL116_NF_EcRV (SEQ ID NO:942)
		TAGATATCACCTTGGAACGATTTTGCC
		Dir Externo: BDL116_EF_EcRV (SEQ ID NO:943)
		GAGATATCAAAGCTCTGACCTTGGAACG
		Inv Anidado: BDL116_NR_EcRV (SEQ ID NO:944)
		CAGATATCTTATCATAAGTACAAATCAGTCTGCTCAC
		Inv Externo: BDL116_ER_EcRV(SEQ ID NO:945)
		TAGATATCTCACATTCATAAGTACAAATCAGTCTGC
BDL119	EcoRV	Dir: BDL119_NF_EcRV (SEQ ID NO:946)
		TTGATATCAGTTTCTCCGTCGACGATACC
		Inv: BDL119_NR_EcRV (SEQ ID NO:947)
		AAGATATCGGTCAAGTACATAAGCTAATAGATG
BDL120	SacI, Sall	Dir: BDL120_F_Sall (SEQ ID NO:948)

ES 2 674 256 T3

Nombre del gen	Enzimas de restricción usadas para la clonación	Cebadores usados para amplificación
		AATGTCGACAACAATGGTGCTTCTACTTGTGATTG
		Inv: BDL120_R_SacI (SEQ ID NO:949)
		TGAGCTCTCACTTCCACTAGTCACTACAAGCG
BDL122	Sall, Xbal	Dir:BDL122_NF_SI (SEQ ID NO:950)
		CTGGTCGACACAGTATTGAGAGACTTCCTGGTG
		Inv: BDL122_NR_Xba (SEQ ID NO:951)
		GCTTCTAGACAATGTGAACTAAATCGACC
BDL123	SacI	Dir:BDL123_F_Sac (SEQ ID NO:952)
		AGAGCTCGTTTTCTTCGCCATGGC
		Inv: BDL123_R_Sac (SEQ ID NO:953)
		TGAGCTCITAAACAGTGACTACCACAGTGCA
BDL124	EcoRV	Dir Anidado: BDL124_NF_EcRV (SEQ ID NO:954)
		TCGATATCGGAATCAGAATCTTTTCAGATGG
		Dir Externo: BDL124_EF_EcRV (SEQ ID NO:955)
		CTGATATCGAGTTTCTCTTCCTTAATTGTCC
		Inv Anidado: BDL124_NR_EcRV (SEQ ID NO:956)
		TTGATATCATCATCAGCTTGGAACCTCG
		Inv Externo: BDL124_ER_EcRV (SEQ ID NO:957)
		TAGATATCTCTTCCATCGATCATCAGC
BDL125	Sall, Xbal	Dir: BDL125_NF_SI (SEQ ID NO:958)
		CTAGTCGACTAACAACAATGGAGAACCCTC
		Inv: BDL125_NR_Xb (SEQ ID NO:959)
		ACTCTAGATTAATGATCAACCAATTGGTCTTAG
BDL127 GA	SacI, Xbal	Producto sintético
BDL128	Xbal	Dir: BDL128_NF_Xbal (SEQ ID NO:960)
		TATCTAGAAGAAAATGGCGATGCGAC
		Inv: BDL128_NR_Xbal (SEQ ID NO:961)
		TATCTAGATCATCACACATCCTGAGATACTTCATC
BDL129 GA	SacI, Xbal	Producto sintético
BDL130 GA	SacI, Xbal	Producto sintético
BDL131	Sall, Xbal	Dir: BDL131_NF_Sall (SEQ ID NO:962)
		AATGTCGACAGAGAAAATGTTGGCTATCTTCC
		Inv: BDL131_NR_Xbal (SEQ ID NO:963)
		TATCTAGATCATCAGAGAGACCAATTGGCTTC

ES 2 674 256 T3

Nombre del gen	Enzimas de restricción usadas para la clonación	Cebadores usados para amplificación
BDL132	Sall, Xbal	Dir Anidado: BDL132_NF_Sall (SEQ ID NO:964)
		AATGTCGACTTTGAATGGAACCATCATCTG
		Dir Externo: BDL132_EF_Sall (SEQ ID NO:965)
		TTAGTCGACCTGAATCTGTTTTGAATGGAAC
		Inv Anidado: BDL132_NR_Xbal (SEQ ID NO:966)
		TATCTAGATTATTAGGTGGAAAGAACAAGCG
		Inv Externo: BDL132_ER_Xbal (SEQ ID NO:967)
		TATCTAGATCAACAAGACAAGATAATGAAAGACACAG
BDL133	EcoRV	Dir: BDL133_NF_EcoRV (SEQ ID NO:968)
		TAGATATCTTAAAATGCCGGAGAAAGG
		Inv: BDL133_NR_EcoRV (SEQ ID NO:969)
		ATGATATCCTACTATCTTACACACAATGCATTCAG
BDL134 GA	Sacl, Xbal	Producto sintético
BDL135	Sall, Xbal	Dir: BDL135_NF_Sall (SEQ ID NO:970)
		ATAGTCGACGAAACATGGTTGAATCGGAC
		Inv: BDL135_NR_Xbal (SEQ ID NO:971)
		TATCTAGATTAGACACTTTATGCCTCCTTTGTAG
BDL136	Sall, Sacl	Dir: BDL136_NF_SI (SEQ ID NO:972)
		AGCGTCGACTTAGAGAGAGATGCAGAAACGG
		Inv: BDL136_NR_Sc (SEQ ID NO:973)
		CGAGCTCCTAATCTAGAGAAGACTTTTACATGCC
BDL137 GA	Sacl, Xbal	Producto sintético
BDL139 GA	Sacl, Xbal	Producto sintético
BDL141 GA	Sacl, Xbal	Producto sintético
BDL142	Sall, Xbal	Dir Anidado: BDL142_NF_Sall (SEQ ID NO:974)
		AATGTCGACCATCCTCATGAATAATTCTACATC
		Dir Externo: BDL142_EF_Sal1 (SEQ ID NO:975)
		ACTGTCGACGCATTCCATTCATCCTCATGA
		Inv Anidado: BDL142_NR_Xba (SEQ ID NO:976)
		ATTCTAGAGTGTGATTATCAGTTTGTCTCTC
		Inv Externo: BDL142_ER_Xba1 (SEQ ID NO:977)
		ATTCTAGAGAAACGACAAGTGATTATAATGG
BDL143	Sall, BamHI	Dir: BDL143_F_Sal1 (SEQ ID NO:978)
		ACTGTCGACAACATGTTGTTTAACTGGACTAAG

Nombre del gen	Enzimas de restricción usadas para la clonación	Cebadores usados para amplificación
		Inv Anidado: BDL143_NR_BamHI (SEQ ID NO:979)
		ATGGATCCTTACAGAACCGGTCAAGATGAAG
		Inv Externo: BDL143_ER_BamHI (SEQ ID NO:980)
		ATGGATCCCAATAACTCGAACACGAACAAC
BDL144	EcoRV	Dir: BDL144_F_EcoRV (SEQ ID NO:981)
		TAGATATCAACAATGATTACAGTAGCCCCCTTC
		Inv Anidado: BDL144_NR_EcoRV (SEQ ID NO:982)
		ATGATATCCTAACAAGCACAAAGACTGATACAGC
		Inv Externo: BDL144_ER_EcoRV (SEQ ID NO:983)
		ATGATATCCAAAAGCTAGCTACTAGTTTCATCAC
BDL145	Sall, XbaI	Dir: BDL145_F_Sal (SEQ ID NO:984)
		ATAGTCGACGAAAGAAAGAGAAAGCAGAACATG
		Inv: BDL145_NR_Xba1 (SEQ ID NO:985)
		ATTCTAGATGGAGGAGCAAATACAACTTG
BDL146	Sall, XbaI	Dir: BDL146_F_Sall (SEQ ID NO:986)
		AATGTCGACGAACTTGGTTTTGAGCTTAAC
		Inv Anidado: BDL146_NR_Xba1 (SEQ ID NO:987)
		ATTCTAGATCATCCCATTGCTTCTCTAGTATTAG
		Inv Externo: BDL146_ER_Xba1 (SEQ ID NO:988)
		ATTCTAGATTAATGTATCGCTCCAAAAGAC
BDL148	Sall, SacI	Dir Anidado: BDL148_NF_Sal1 (SEQ ID NO:989)
		ACTGTGACCTAATTCTCTCCGTCTCGATCG
		Dir Externo: BDL148_EF_Sal1 (SEQ ID NO:990)
		ACTGTGACGACTGATTTTACGCTTTATTGCTC
		Inv Anidado: BDL148_NR_NEW_Sac1 (SEQ ID NO:991)
		GAGAGCTCTTAAACAGGTCATCTCGAGCCAC
		Inv Externo: BDL148_ER_NEW_Sac1 (SEQ ID NO:992)
		GAGAGCTCCGTTGCCTGACAGAATCTTTG

Tabla 13. Se proporcionan los cebadores de PCR usados para clonar los genes descritos en la tabla 12 anterior. Dir = cebador directo; Inv = cebador inverso; Anidado = cebador anidado para PCR (cebador interno); Externo = cebador externo para PCR.

Se realizó la secuenciación de los productos de PCR amplificados, usando el secuenciador ABI 377 (Amersham Biosciences Inc). Para facilitar la clonación de los ADNc/las secuencias genómicas, se añadió una prolongación de 8-12 pb al extremo 5' de cada cebador. La prolongación del cebador incluye un sitio de restricción de endonucleasa. Los sitios de restricción se seleccionaron usando dos parámetros: (a). El sitio no existía en la secuencia de ADNc; y (b). Los sitios de restricción en los cebadores directo e inverso se diseñaron de manera que el ADNc digerido se

inserte en la formación sentido en el vector binario utilizado para la transformación. Los productos de PCR se digirieron con las endonucleasas de restricción (New England BioLabs Inc) según el diseño de los sitios en los cebadores (tabla 13, anterior) y se clonaron en vectores binarios según la tabla 14, a continuación. Los productos de RACE se secuenciaron como se describe a continuación en esta memoria para BDL108, BDL 110 y BDL111.

Tabla 14

Sitios de enzimas de restricción usados para clonar los genes identificados en el vector binario

Nombre del gen	Vector binario	Enzimas de restricción usadas para la clonación en el vector binario-DIRECTA	Enzimas de restricción usadas para la clonación en el vector binario-INVERSA	Enzimas de restricción usadas para digerir el vector binario
BDL42	pBXYN	Sall	EcoRI	Sall, EcoRI
BDL46	pBXYN	Sall	Smal	Sall, Ecl136
BDL51	pBXYN	Sall	EcoRI	Sall, EcoRI
BDL52	pBXYN	Sall	EcoRI	Sall, EcoRI
BDL54	pBXYN	Sall	EcoRI	Sall, EcoRI
BDL56	pBXYN	Sall	EcoRI	Sall, EcoRI
BDL59	pBXYN	Sall	EcoRI	Sall, EcoRI
BDL60	pBXYN	Sall	EcoRI	Sall, EcoRI
BDL65	pBXYN	Sall	Smal	Sall, Ecl136
BDL67	pBXYN	Sall	Smal	Sall, Ecl136
BDL68	pBXYN	Sall	Smal	Sall, Ecl136
BDL78	pBXYN	Sall,	EcoRI	Sall, EcoRI
BDL82	pBXYN	Sall	EcoRI	Sall, EcoRI
BDL89	pBXYN	Sall	EcoRI	Sall, EcoRI
BDL95	pBXYN	Sall	EcoRI	Sall, EcoRI
BDL100	pBXYN	Sall	Sacl	Sall, Sacl
BDL106	pBXYN	Sall	EcoRI	Sall, EcoRI
BDL108	pBXYN	Sall	EcoRI	Sall, EcoRI
BDL110	pBXYN	Sall	EcoRI	Sall, EcoRI
BDL111	pBXYN	EcoRV	EcoRV	Smal, Ecl136
BDL112	pBXYN	Sall	EcoRI	Sall, EcoRI
BDL114	pBXYN	Sall	EcoRI	Sall, EcoRI
BDL115	pBXYN	Smal	Sacl	Smal, Sacl
BDL116	pBXYN	EcoRV	EcoRV	Smal, Ecl136
BDL119	pBXYN	EcoRV	EcoRV	Smal, Ecl136
BDL120	pBXYN	Sall	Sacl	Sall, Sacl
BDL122	pBXYN	Sall	EcoRI	Sall, EcoRI
BDL123	pBXYN	Sall	EcoRI	Sall, EcoRI

BDL124	pBXYN	EcoRV	EcoRV	SmaI, Ecl136
BDL125	pBXYN	Sall	EcoRI	Sall, EcoRI
BDL128	pBXYN	Sall	EcoRI	Sall, EcoRI
BDL131	pBXYN	Sall	EcoRI	Sall, EcoRI
BDL132	pBXYN	Sall	EcoRI	Sall, EcoRI
BDL133	pBXYN	EcoRV	EcoRV	SmaI, Ecl136 II
BDL135	pBXYN	Sall	EcoRI	Sall, EcoRI
BDL136	pBXYN	Sall	EcoRI	Sall, EcoRI
BDL142	pBXYN	Sall	EcoRI	Sall, EcoRI
BDL143	pBXYN	BamHI	Sal I	Sall, Ecl 136 II
BDL144	pBXYN	EcoRV	EcoRV	SmaI, Ecl 136 II
BDL145	pBXYN	Sall	EcoRI	Sall, EcoRI
BDL146	pBXYN	Sall	EcoRI	Sall, EcoRI
BDL148	pBXYN	Sall	EcoRI	Sall, EcoRI
BDL113_GA	pBXYN	SacI	Xba I	SacI, Xba I
BDL127_GA	pBXYN	SacI	Xba I	SacI, Xba I
BDL129_GA	pBXYN	SacI	Xba I	SacI, Xba I
BDL130_GA	pBXYN	SacI	Xba I	SacI, Xba I
BDL134_GA	pBXYN	SacI	Xba I	SacI, Xba I
BDL137_GA	pBXYN	SacI	Xba I	SacI, Xba I
BDL139_GA	pBXYN	SacI	Xba I	SacI, Xba I
BDL141_GA	pBXYN	SacI	Xba I	SacI, Xba I
Tabla 14.				

5 Cada producto de PCR digerido se insertó en un vector de número de copias elevado, vector plasmídico pBlue-script KS [vector plasmídico pBlue-script KS, Hypertext Transfer Protocol://World Wide Web (.) stratagene (.) com/manuals/212205 (.) pdf] o en plásmidos que se originan a partir de estos vectores. En los casos en que se usó el vector pGXN de número de copias elevado (originado de pBlue-script KS), el producto de PCR se insertó cadena arriba del terminador NOS (SEQ ID NO:776) originado a partir del vector binario pBI 101.3 (No. de acceso del GenBank U12640, nucleótidos 4356 a 4693, SEQ ID NO:776) y cadena abajo del promotor 35S. En otros casos (pKSJ_6669a), el promotor At6669 (SEQ ID NO:775) ya se clonó en el pBlue-script KS, por lo que el gen se introdujo cadena abajo del promotor (tabla 15 a continuación). En todos los casos, después de la confirmación de la secuencia de los genes clonados, el ADNc clonado acompañado o no con el terminador NOS se introdujo en el vector binario pGI [pBXYN que contenía el promotor 35S de CaMV] según la tabla 14, anterior, por digestión con unas endonucleasas de restricción apropiadas. En cualquier caso, el inserto fue seguido por una copia única del terminador NOS (SEQ ID NO:776).

10

Tabla 15

Genes clonados a partir de bibliotecas de ADNc o ADN genómico en un plásmido de número de copias elevado

Nombre del gen	Plásmido de número de copias elevado	Amplificado a partir de		SEQ ID NO del polinucleótido:	SEQ ID NO del polipéptido:
		Organismo	Origen		
BDL42	pGXN	Arabidopsis	ARNm	692	86
BDL46	pKS	Arabidopsis	ARNm	693	87
BDL51	pGXN	Arabidopsis	ARNm	694	88
BDL52	pGXN	Tomate	ARNm	695	713
BDL54	pGXN	Arabidopsis	ARNm	696	90
BDL56	pGXN	Arabidopsis	ARNm	697	91
BDL59	pGXN	Arabidopsis	ARNm	698	92
BDL60	pGXN	Arabidopsis	ARNm	699	93
BDL65	pKS	Arabidopsis	ARNm	700	94
BDL67	pKS	Arabidopsis	ARNm	701	714
BDL68	pKS	Arabidopsis	ARNm	702	96
BDL78	pGXN	Arabidopsis	ARNm	703	97
BDL82	pGXN	Arabidopsis	ARNm	704	98
BDL89	pGXN	Arroz	ARNm	705	99
BDL95	pGXN	Arroz	ARNm	706	715
BDL100	pGXN	Arroz	ARNm	657	707
BDL106	pGXN	Canola	ARNm	658	52
BDL108	pGXN	Canola	ARNm	659	708
BDL110	pGXN	Canola	ARNm	660	709
BDL111	pKSJ_6669a	Canola	ARNm	661	710
BDL112	pGXN	Arabidopsis	ARNm	662	56
BDL114	pGXN	Arabidopsis	ARNm	664	58
BDL115	pKSJ	Arabidopsis	ARNm	665	59
BDL116	pKSJ_6669a	Arabidopsis	ARNm	666	60
BDL119	pKSJ_6669a	Arabidopsis	ADN genómico	667	711
BDL120	pGXN	Arabidopsis	ARNm	668	62
BDL122	pGXN	Arabidopsis	ARNm	669	63
BDL123	pGXN	Arabidopsis	ARNm	670	64
BDL124	pKSJ_6669a	Arabidopsis	ARNm	671	65
BDL125	pGXN	Arabidopsis	ARNm	672	66

Nombre del gen	Plásmido de número de copias elevado	Amplificado a partir de		SEQ ID NO del polinucleótido:	SEQ ID NO del polipéptido:
		Organismo	Origen		
BDL128	pGXN	Arabidopsis	ARNm	674	68
BDL131	pGXN	Arabidopsis	ARNm	677	71
BDL132	pGXN	Arabidopsis	ARNm	678	72
BDL133	pKSJ_6669a	Arabidopsis	ARNm	679	73
BDL135	pGXN	Arabidopsis	ARNm	681	75
BDL136	pGXN	Arabidopsis	ARNm	682	76
BDL142	pGXN	Arabidopsis	ARNm	686	80
BDL143	pKSJ	Arabidopsis	ARNm	687	81
BDL144	pKSJ_6669a	Arabidopsis	ARNm	688	82
BDL145	pGXN	Arabidopsis	ARNm	689	83
BDL146	pGXN	Arabidopsis	ARNm	690	84
BDL148	pGXN	Arabidopsis	ARNm	691	85
BDL113 GA	pGA4	Sintético	GeneArt	663	57
BDL127_GA -	pCR4Blunt-TOPO	Sintético	GeneArt	673	67
BDL129 GA	pGA4	Sintético	GeneArt	675	69
BDL130 GA	pGA14	Sintético	GeneArt	676	712
BDL134 GA	pGA4	Sintético	GeneArt	680	74
BDL137 GA	pGA18	Sintético	GeneArt	683	77
BDL139 GA	pGA15	Sintético	GeneArt	684	78
BDL141 GA	pGA4	Sintético	GeneArt	685	79

Tabla 15: Los genes clonados y sintéticos se proporcionan junto con los identificadores de secuencia de sus polinucleótidos y polipéptidos. También se proporcionan el organismo fuente, el tejido y los vectores de clonación.

- 5 Los productos digeridos y el vector plasmídico linealizado se ligaron usando la enzima T4 ADN ligasa (Roche, Suiza). El plásmido pPI se construyó insertando una secuencia señal de poli-(A) sintética, que se origina a partir del vector plasmídico básico pGL3 (Promega, Acc No U47295; pb 4658-4811) en el sitio de restricción de *HindIII* del vector binario pBI101.3 (Clontech, No. de Acc. U12640). pGI (figura 3) es similar a pPI, pero el gen original en la cadena principal, el gen GUS, fue sustituido por el gen GUS-Intron seguido por el terminador NOS (SEQ ID NO:776) (Vancanneyt. G, et al MGG 220, 245-50, 1990). Se usó pGI para clonar las secuencias de polinucleótidos, inicialmente bajo el control del promotor 35S [Odell, JT, et al. Nature 313, 810 - 812 (28 de febrero de 1985); SEQ ID NO:777.
- 10 Las secuencias de ADN seleccionadas fueron sintetizadas por un proveedor comercial GeneArt, GmbH [Hypertext Transfer Protocol://World Wide Web (.) geneart (.) com/]. El ADN sintético está diseñado in silico. Se añadieron sitios de enzimas de restricción adecuadas a las secuencias clonadas en el extremo 5' y en el extremo 3' para permitir la clonación posterior en el binario pBXYN cadena abajo del promotor 35S de CaMV (SEQ ID NO: 777).
- 15 **Optimización de genes para expresión en plantas dicotiledóneas-** Para optimizar la secuencia codificante (diseño in silico), se usaron tablas de uso de codones calculadas a partir de transcriptomas de plantas [ejemplos de dichas tablas se pueden encontrar en la base de datos de uso de codones disponible en línea en Hypertext Transfer Protocol://World Wide Web (.) kazusa (.) or (.) jp/codon/]. Las secuencias codificantes optimizadas se diseñaron de manera que no se introduzcan cambios en la secuencia de aminoácidos codificada (de polipéptidos seleccionados

de la tabla 1, ejemplo 1) mientras se usan codones preferidos para la expresión en plantas dicotiledóneas, principalmente *Arabidopsis*, tomate, canola y soja, evitando codones raros para *Arabidopsis*; y plantas monocotiledóneas tales como el maíz. Dichas secuencias optimizadas promueven una mejor velocidad de traducción y, por lo tanto, niveles de expresión de proteína más elevados. Los genes para los que se prepararon secuencias sintéticas (artificiales) optimizadas con codones son: BDL-113 (SEQ ID NO:663 polinucleótido, SEQ ID NO:57 polipéptido), BDL-127 (SEQ ID NO:673 polinucleótido, SEQ ID NO:67 polipéptido), BDL-129 (SEQ ID NO:675 polinucleótido, SEQ ID NO:69 polipéptido), BDL-130 (SEQ ID NO:676 polinucleótido, SEQ ID NO:712 polipéptido), BDL-134 (SEQ ID NO:680 polinucleótido, SEQ ID NO:74 polipéptido), BDL-137 (SEQ ID NO:683 polinucleótido, SEQ ID NO:77 polipéptido), BDL-139 (SEQ ID NO:684 polinucleótido, SEQ ID NO:78 polipéptido), BDL-141 (SEQ ID NO:685 polinucleótido, SEQ ID NO:79 polipéptido).

Varias secuencias de polinucleótidos de los genes seleccionados se clonaron cadena abajo del promotor 35S de CaMV (SEQ ID NO:777), el promotor At6669 de *Arabidopsis* (SEQ ID NO:775) o el promotor específico de la semilla Napin (SEQ ID NO:778).

El promotor Napin (SEQ ID NO:778), que se origina a partir de *Brassica napus*, se caracteriza por una actividad promotora específica de la semilla [Stuitje A. R. et. al. *Plant Biotechnology Journal* 1 (4): 301-309]. El promotor Napin se amplificó por PCR directa en ADN genómico extraído de tejido de hoja [usando el kit DNAeasy (Qiagen No. de Cat. 69104)] usando los siguientes cebadores de PCR: Napin F HindIII 5'-ATAAGCTTATTGATTCCTTTAAAGACTTATGTT (SEQ ID NO:993) y Napin R Sall 5'-TCGTCGACGGGTGTATGTTTTTAATCTTGTTT (SEQ ID NO:994). Un ejemplo de un gen clonado cadena abajo de la secuencia del promotor Napin es BDL65 (SEQ ID NO:700).

Para 9 genes, concretamente BDL52, BDL67, BDL95, BDL100, BDL108, BDL110, BDL111, BDL119 y BDL130, la traducción de la proteína de la secuencia de ADNc amplificada no coincidía con la predicción bioinformática inicial de las secuencias de proteínas. Las secuencias de polipéptidos codificadas por la clonada y sus identificadores de secuencia son las siguientes: BDL52 (SEQ ID NO:713), BDL67 (SEQ ID NO:714), BDL95 (SEQ ID NO:715), BDL100 (SEQ ID NO:707), BDL108 (SEQ ID NO:708), BDL110 (SEQ ID NO:709), BDL111 (SEQ ID NO:710), BDL119 (SEQ ID NO:711) y BDL130 (SEQ ID NO:712). Obsérvese que se predice que el gen BDL119 es un ARN no codificante (p. ej., un ARN regulador). El polinucleótido BDL119 se clonó a partir de un ADN genómico y el ADNc de BDL119 se proporciona en la SEQ ID NO:667.

Ejemplo 5

Producción de plantas transgénicas de *arabidopsis* que expresan los polinucleótidos identificados de la invención

Materiales y métodos experimentales

Transformación de plantas- Se transformó *Arabidopsis thaliana* var Columbia (plantas T₀) según el procedimiento Floral Dip [Clough SJ, Bent AF. (1998) *Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16(6): 735-43; y Desfeux C, Clough SJ, Bent AF. (2000) *Female reproductive tissues are the primary targets of Agrobacterium-mediated transformation by the Arabidopsis floral-dip method*. *Plant Physiol.* 123(3): 895-904] con modificaciones menores. En resumen, se sembraron plantas de *Arabidopsis thaliana* Columbia (Col0) T₀ en macetas de 250 ml llenas de una mezcla de crecimiento basada en turba húmeda. Las macetas se cubrieron con papel de aluminio y una cúpula de plástico, se mantuvieron a 4 °C durante 3-4 días, a continuación se descubrieron y se incubaron en una cámara de crecimiento a 18-24 °C bajo ciclos de 16/8 horas de luz/oscuridad. Las plantas T₀ estaban listas para la transformación seis días antes de la antesis.

Se cultivaron colonias individuales de *Agrobacterium* que portan los vectores binarios que albergan los genes de aceite de semilla en medio LB suplementado con kanamicina (50 mg/l) y gentamicina (50 mg/l). Los cultivos se incubaron a 28 °C durante 48 horas con agitación vigorosa y se centrifugaron a 4000 rpm durante 5 minutos. Los sedimentos que comprendían células de *Agrobacterium* se resuspendieron en un medio de transformación que contenía la mitad de la concentración (2,15 g/l) de Murashige-Skoog (Duchefa); bencilamino purina 0,044 μM (Sigma); 112 μg/L de vitaminas de Gambourg B5 (Sigma); sacarosa al 5%; y 0,2 ml/l de Silwet L-77 (OSI Specialists, CT) en agua bidestilada, a un pH de 5,7.

La transformación de las plantas T₀ se realizó invirtiendo cada planta en una suspensión de *Agrobacterium*, de modo que el tejido vegetal molido se sumergió durante 3-5 segundos. Cada planta T₀ inoculada se colocó inmediatamente en una bandeja de plástico, a continuación se cubrió con una cúpula de plástico transparente para mantener la humedad y se mantuvo en la oscuridad a temperatura ambiente durante 18 horas para facilitar la infección y la transformación. Las plantas transformadas (transgénicas) se descubrieron y se transfirieron a un invernadero para recuperación y maduración. Las plantas T₀ transgénicas se cultivaron en el invernadero durante 3-5 semanas hasta que las silicuas estuvieron marrones y secas, a continuación, las semillas se recogieron de las plantas y se mantuvieron a temperatura ambiente hasta la siembra.

Para generar plantas transgénicas T₁ y T₂ que albergan los genes, las semillas recogidas de plantas T₀ transgénicas se esterilizaron superficialmente sumergiéndolas en etanol al 70% durante 1 minuto, seguido de remojo en

hipoclorito de sodio al 5% y tritón al 0,05% durante 5 minutos. Las semillas esterilizadas en la superficie se lavaron exhaustivamente en agua destilada estéril y a continuación se colocaron sobre placas de cultivo que contenían Murashig-Skoog a la mitad de concentración (Duchefa); sacarosa al 2%; agar de planta al 0,8%; Kanamicina 50 mM; y carbenicilina 200 mM (Duchefa). Las placas de cultivo se incubaron a 4 °C durante 48 horas y a continuación se transfirieron a una sala de crecimiento a 25 °C durante una semana adicional de incubación. Las plantas Vital T₁ de *Arabidopsis* se transfirieron a placas de cultivo nuevas durante otra semana de incubación. Después de la incubación, las plantas T₁ se retiraron de las placas de cultivo y se sembraron en una mezcla de crecimiento contenida en macetas de 250 ml. Las plantas transgénicas se dejaron crecer en un invernadero hasta la madurez. Las semillas cosechadas de las plantas T₁ se cultivaron y se dejaron crecer hasta la madurez como plantas T₂ en las mismas condiciones que las utilizadas para cultivar y dejar crecer las plantas T₁.

Ejemplo 6

Identificación de promotores novedosos

Los promotores constitutivos permiten la expresión continua de genes regulados de este modo, en toda la planta. Un ejemplo ampliamente usado para un promotor constitutivo es el promotor CaMV35S del virus del mosaico de la coliflor (SEQ ID NO:777).

Uno de los requisitos importantes para una planta modificada por ingeniería genética es activar el gen de interés en el tejido u órgano adecuado, y/o en el momento apropiado (p. ej., una fase del desarrollo determinada, en ciertas condiciones ambientales). Por ejemplo, para influir en un tejido único tal como la semilla, el gen de interés puede inducirse para la expresión (activada) en una determinada fase del desarrollo tal como fertilización preembrionaria, post-fertilización, embriogénesis temprana o tardía. Por ejemplo, para mejorar el rendimiento y/o el contenido de aceite de una planta, la expresión del gen de interés puede regularse mediante un promotor que tenga un patrón de expresión apropiado para el desarrollo de la semilla. Por lo tanto, la combinación de un gen diana con promotores específicos tales como un promotor específico del desarrollo (tal como semilla, carpelo, tallo, plántula) puede aumentar el efecto deseado del gen (p. ej., mejorar el rendimiento y/o el contenido de aceite) y evitar la influencia indeseada del gen sobre otros procesos biológicos en otros tejidos, por ejemplo, estructura celular, arquitectura de la planta.

Los inventores de la presente invención han aislado y validado nuevos promotores específicos del desarrollo de diferentes fases del desarrollo vegetal y/o tejidos vegetales, que tienen diferentes niveles de expresión génica. La siguiente descripción resume el proceso de selección y clonación de los novedosos promotores de *Arabidopsis*.

Clonación y análisis de promotores- Los novedosos promotores de *Arabidopsis* de la invención se seleccionaron basándose en el perfil de expresión de los genes nativos situados cadena abajo (3') en las secuencias promotoras (véase la tabla 16, a continuación).

Tabla 16

Perfil de expresión basado en el análisis de micromatrices

Gen 3' respecto al promotor	AT1G30860	AT2G31160	AT2G39640	AT3G21380	AT3G24510	AT3G61040	AT4G15975
Descripción del producto génico	proteína expresada	Proteína de función desconocida (DUF640)	Proteína 17 de la glucosil 1 hidrolasa	similar a la proteína de la familia de la lectina jacalina [<i>Arabidopsis thaliana</i>] (TAIR:At1g52 040.1)	Codifica una proteína de la familia similar a defensina (DEFL)	Proteína de la familia del citocromo P450	Dedo de Zinc, tipo C3HC4 (dedo RING)
Especificidad/nivel de expresión normalizado	Semilla	Tallo	Semilla	Semilla	Carpelo	Semilla	Plántula
carpelos	28,89	6,89	35,03	50,33	462,3	23,75	16,29
tallo	58,82	26,06	18,62	8,48	4	40,36	4
cotiledones	27,56	35,91	30,1	4	4,59	36,86	39,32
flor	21,59	97,92	35,48	32,46	23,73	26,94	18,92

ES 2 674 256 T3

hipocotilo	48,59	782,8	30,62	31,39	6,32	27,57	31,21
inflorescencia	23,93	643,83	24,23	39,18	4	32,95	4
hoja	9,61	41,3	25	7,73	5,95	42,8	23,3
pedicelos	4	12,22	22,78	13,35	4,12	39,68	20,16
pétalos	4	16	41,7	14	4,48	36,9	17,2
pecíolo	4	174,5	15,23	20,1	4	55,57	28,04
polen	56,49	16,3	36,44	19,85	4	16,31	20,17
raíz	20	91,6	39	38,2	6,91	35,8	19,3
roseta	8,19	37,84	26,28	17,49	4,78	33,78	27,05
semilla	1172,9	52,49	30,41	1702,9	10,89	1186,5	24,34
plántula	16,78	65,72	30,6	19,9	6,92	37,95	81,98
sépalos	77,8	19,3	30	9,09	4	53,9	13,2
brote	19,22	631,3	26,5	34,29	4,84	26,34	21,36
silicuas	61,36	60,56	132,9	16,83	698,8	39,27	22,16
estambre	66,15	17,04	32,04	62,88	4	20,98	21,67
tallo	24,18	449,5	18,17	15,99	6,77	38,93	5,62

Tabla 16. Se proporcionan los resultados de un perfil de expresión de micromatrices de genes (No de acceso al GenBank Accession) situados en 3' de los promotores identificados. Se muestran la especificidad tisular de los promotores y los niveles de expresión normalizados de cada gen en el tejido específico.

La tabla 17, a continuación, proporciona los identificadores de secuencia de los promotores novedosos de la invención, junto con los identificadores de secuencia de los genes y los polipéptidos codificados de ese modo situados cadena abajo de los promotores novedosos de la invención.

Tabla 17

Identificación de promotores novedosos

Designación del promotor (SEQ ID NO:)	Los polinucleótidos (No. de acceso al GenBank y SEQ ID NO:) situados cadena abajo de los promotores identificados	Los polipéptidos (No. de acceso al GenBank y SEQ ID NO:) codificados por los polinucleótidos situados cadena abajo de los promotores identificados	Longitud del promotor (pb)
PrBDL40 L (SEQ ID NO:779)	AT1G30860 (SEQ ID NO:793)	AT1G30860_P1 SEQ ID NO:800	2970
PrBDL40 S (SEQ ID NO:780)	AT1G30860 (SEQ ID NO:793)	AT1G30860_P1 SEQ ID NO:800	2238
PrBDL34 L (SEQ ID NO:781)	AT2G31160 (SEQ ID NO:794)	AT2G31160_P1 SEQ ID NO:801	3097
PrBDL34 S (SEQ ID NO:782)	AT2G31160 (SEQ ID NO:794)	AT2G31160_P1 SEQ ID NO:801	3000
PrBDL36 L (SEQ ID NO:783)	AT2G39640 (SEQ ID NO:795)	AT2G39640_P1 SEQ ID NO:802	2889
PrBDL36 S (SEQ ID NO:784)	AT2G39640 (SEQ ID NO:795)	AT2G39640_P1 SEQ ID NO:802	831

PrBDL38 L (SEQ ID NO:785)	AT3G21380 (SEQ ID NO:796)	AT3G21380_P1 SEQ ID NO:803	3000
PrBDL38 S (SEQ ID NO:786)	AT3G21380 (SEQ ID NO:796)	AT3G21380_P1 SEQ ID NO:803	880
PrBDL37 L (SEQ ID NO:787)	AT3G24510 (SEQ ID NO:797)	AT3G24510_P1 SEQ ID NO:804	3000
PrBDL37 S (SEQ ID NO:788)	AT3G24510 (SEQ ID NO:797)	AT3G24510_P1 SEQ ID NO:804	1423
PrBDL39 L (SEQ ID NO:789)	AT3G61040 (SEQ ID NO:798)	AT3G61040_P1 SEQ ID NO:805	3000
PrBDL39 S (SEQ ID NO:790)	AT3G61040 (SEQ ID NO:798)	AT3G61040_P1 SEQ ID NO:805	1159
PrBDL35 L (SEQ ID NO:791)	AT4G15975 (SEQ ID NO:799)	AT4G15975_P1 SEQ ID NO:806	2881
PrBDL35 S (SEQ ID NO:792)	AT4G15975 (SEQ ID NO:799)	AT4G15975_P1 SEQ ID NO:806	942
Tabla 17. Se proporcionan los promotores identificados, su longitud y los identificadores de secuencia junto con los genes que se encuentran cadena abajo de los promotores.			

Construcción del promotor: construcción de ácido nucleico de fusión GUS para el análisis del patrón de expresión de los promotores identificados- Para la clonación de cada una de las secuencias promotoras, se diseñaron dos conjuntos de cebadores que abarcan la secuencia promotora predicha. La secuencia corta del promotor se amplificó usando una secuencia de cebador 3' seleccionada cerca del codón de inicio de la secuencia codificante del gen cadena abajo (que se localiza cadena abajo de las secuencias promotoras) y una secuencia de cebador 5' seleccionada de la secuencia que está cadena abajo respecto al gen cadena arriba adyacente. La secuencia larga del promotor estaba usando una secuencia de cebador 3' seleccionada desde el inicio de la región no traducida (5'UTR) del gen cadena abajo del promotor y una secuencia de cebador 5' ubicada 3 kb cadena arriba del cebador 3' (véase la tabla 18, a continuación). Cada secuencia promotora se fusionó por traducción a la secuencia codificante de GUS (un gen indicador).

Todas las secuencias se amplificaron por PCR. Los productos de PCR se purificaron usando el kit de purificación de PCR Mini Elute (Qiagen) y se realizó la secuenciación de los productos de PCR amplificados, usando el secuenciador ABI 377 (Applied Biosystems). Para facilitar la clonación de las secuencias promotoras, se añadió una prolongación de 8-12 pb al extremo 5' de cada cebador. La prolongación del cebador incluye un sitio de restricción de endonucleasa. Los sitios de restricción se seleccionan usando dos parámetros: a.) El sitio no existe en la secuencia promotora. b.) Los sitios de restricción en los cebadores directo e inverso están diseñados para que el ADN genómico digerido se inserte en la formación sentido en el vector binario utilizado para la transformación. Por ejemplo, el vector plasmídico pGI se construyó insertando una secuencia señal de poli-(A) sintética, que se origina a partir del vector plasmídico básico pGL3 (Promega, No. de Acc. U47295; pb 4658-4811) en el sitio de restricción de *HindIII* del vector binario pBI101.3 (Clontech, No. de Acc. U12640) y gen GUS-Intron (Vancanneyt. G, et al MGG 220, 245-50, 1990). Otro vector plasmídico usado para la clonación fue el pMBLArt (Gleave AP. Plant Mol Biol. diciembre de 1992; 20 (6): 1203-7).

Los productos de PCR digeridos se subclonaron en primer lugar en pBlue-script KS [(originado del vector plasmídico pBlue-script KS www.stratagene.com/manuals/212205.pdf)] seguido de clonación en vector binario pGI con el gen GUS-Intron (Vancanneyt. G, et al MGG 220, 245-50, 1990) y el terminador NOS originado a partir del vector binario pBI 101.3 (No. de acceso al GenBank U12640; GI:529333 nucleótidos 4356 a 4693, SEQ ID NO: 776). Algunos de los productos de PCR se subclonaron en primer lugar en pBlue-script KS [(originado a partir del vector plasmídico pBlue-script KS www.stratagene.com/manuals/212205.pdf)] con el gen GUS-Intron (Vancanneyt. G, et al MGG 220, 245-50, 1990) y el terminador NOS se originó a partir del vector binario pBI 101.3 seguido de la clonación del casete completo en el vector binario pMBLArt (según la tabla 19). El producto de PCR digerido y el vector plasmídico linealizado se ligaron usando la enzima T4 ADN ligasa (Roche, Suiza). Los cebadores usados para la clonación se proporcionan en la tabla 18.

Tabla 18

Cebadores usados para la clonación de los promotores novedosos

Nombre del promotor	Enzimas de restricción usadas para la clonación	Cebadores usados para amplificación/SEQ ID NO:
PrBDL34_L	PstI, Sall	Dir: PrBDL34_EF_PstI - ATCTGCAGGAAATTGAAAAGGGTTTAAC /SEQ ID NO:995
		Inv: PrBDL34_ER_Sall - ATTGTCGACGATTAGTTCTTGATTCTTGATCTTTC/SEQ ID NO:996
PrBDL35 L	HindIII, Sall	Dir: PrBDL_35_F_HindIII - ATAAAGCTTCATTGACTTGAGATTCAGTTCATG /SEQ ID NO:997
		Inv: PrBDL_35_R_Sall - ATTGTCGACAGAGAAGTGAATGAAGATTTTAGG /SEQ ID NO:98
PrBDL36 L	Sall, XbaI	Dir: PrBDL_36_F_Sall - AATGTCGACCGAATCAATACGTAACCTTCAATC /SEQ ID NO:999
		Inv: PrBDL_36_R_XbaI - TATCTAGATGCTTTGTTTTGTTTTGTTTTG /SEQ ID NO:1000
PrBDL37_S	HindIII, Sall	Dir: PrBDL37_Short_F_HindIII - ACTAAGCTTGACTTGATACTAACGAGGAAATG /SEQ ID NO:001
		Inv: PrBDL37_Short_R_Sall - TGTGTCGACTTCAAATTTTTAGAATGGGAG /SEQ ID NO:1002
PrBDL38_S	PstI, Sall	Dir: PrBDL38_Short_F1_PstI - AACTGCAGAGCTCACGAGTGTGTTTTGG /SEQ ID NO:1003
		Inv: PrBDL38_Short_R_Sall - ATTGTCGACTGTATCTGATCATATCTTACCGG / SEQ ID NO: 1004
PrBDL39 L	HindIII, SmaI	Dir: PrBDL_39_F_HindIII - ATTAAGCTTCCTGCAACAATGATTTATTATG /SEQ ID NO:1005
		Inv: PrBDL_39_R_SmaI - TCCCGGGCTAATATTATGCACGCTTCGTC /SEQ ID NO:1006
PrBDL40 L	HindIII, Sall	Dir: PrBDL_40_F_HindIII - TATAAGCTTCATCTCGGACTTGATATCGTC /SEQ ID NO:1007
		Inv: PrBDL_40_R_Sall_1 - ATTGTCGACGAATCGAACAAACGAACATAAA /SEQ ID NO:1008
Tabla 18.		

La tabla 19, a continuación, proporciona los vectores de clonación usados para clonar cada uno de los promotores identificados.

Tabla 19

Promotores clonados en vectores binarios diferentes

Promotor	Clonado en pGI	Clonado en pMBLArt
PrBDL40 L		V
PrBDL34 L		V
PrBDL36 L	V	

PrBDL38 S		V
PrBDL37 S		V
PrBDL39 L		V
PrBDL35 L		V

Tabla 19: Se proporcionan las designaciones del promotor (los identificadores de secuencia se dan en la tabla 17, anterior) y los vectores usados para su clonación. "V" indica que el promotor se clonó en el vector indicado.

5 Las construcciones se transformaron en plantas de Arabidopsis como se describe en el ejemplo 5 anterior y se realizó un análisis de expresión basado en la monitorización del nivel de expresión del gen GUS (tinción de GUS) esencialmente como se describe en Jefferson RA. et. al. 1987 EMBO J 6 (13), 3901-3907; y Meissner et. al. 2000 Plant Journal 22 (3), 265-274.

El nivel de tinción de GUS se determinó según la intensidad del color azul. La tabla 20, a continuación, proporciona el nivel de coloración de la tinción de GUS.

Tabla 20
Nivel de coloración

sin color	0
medio -	2
medio oscuro	3
medio +	4
el más oscuro	5

Tabla 20: El índice de intensidad del color azul.

10

La tabla 21, a continuación, describe el patrón de expresión de los promotores clonados.

Tabla 21
Patrón de expresión de promotores de la fase del desarrollo

Promotor	Promotor de SEQ ID NO:	Evento	Flores pequeñas	Flores grandes	Hojas	Tallo	Silicuas
pMBL_GI	777	5681.1	4-5	2	3	2-5	2-5
pMBL_GI	777	5681.2	4-5	2	2-3	2-5	3-5
pMBL_GI	777	5681.3	4-5	2	3	2-5	2-5
MBL_GI	777	5681.4	4-5	2	3	3-5	3-5
pMBL_GI	777	5681.5	4-5	2	3	2-5	2-5
pM_PrBDL 40_YN	779	6552.1	0	0	1	1-3	1
pM_PrBDL 40_YN	779	6552.2	0	0	1	0-2	0
pM_PrBDL 40_YN	779	6552.3	3	3	3	3	3
pM_PrBDL 40_YN	779	6552.4	0	5	1	5	0

ES 2 674 256 T3

pM_PrBDL 40_YN	779	6554.1	0	0	0	0-1	0
pM_PrBDL 40_YN	779	6554.2	1	4	0-5	3	0
pM_PrBDL 40_YN	779	6554.3	0	4	0-5	5	0
pM_PrBDL 40_YN	779	6554.4	0	1-2	0-2	0	0
pM_PrBDL 39_YN	789	6501.1	0	0	0	0	0
pM_PrBDL 39_YN	789	6501.2	1	0	0	0	0
pM_PrBDL 39_YN	789	6501.3	0	0	0	0	0
pM_PrBDL 39_YN	789	6501.4	0	0	0	0	0
pM_PrBDL 39_YN	789	6501.5	0	0	0	0	0
pM_PrBDL 39_YN	789	6502.1	0	0	0	0	0
pM_PrBDL 39_YN	789	6502.2	0	0	0	0	0
pM_PrBDL 39_YN	789	6502.3	0	0	0	0	0
pM_PrBDL 39_YN	789	6502.4	0	0	0	0	0
pM_PrBDL 39_YN	789	6502.5	0	0	0	0	0
pM_PrBDL 35_YN	791	6512.1	0	0	0	0	0
pM_PrBDL 35_YN	791	6512.2	0	0	0	0	0
pM_PrBDL 35_YN	791	6512.3	0	0	0	0	3
pM_PrBDL 35_YN	791	6512.4	0	0	0	0	0
pM_PrBDL 35_YN	791	6512.5	0	0	0	0	0
pM_PrBDL 35_YN	791	6511.1	0	0	0	0	0
pM_PrBDL 35_YN	791	6511.2	0	0	0	0	3-5
pM_PrBDL 35_YN	791	6511.3	0	0	0	0	1-2
pM_PrBDL 35_YN	791	6511.4	0	0	0	0	0

pM_PrBDL 35_YN	791	6511.5	0	0	0	0	0
WT			0	0	0	0	0

Tabla 21. "pM" o "pMBL" se refieren al vector binario pMBLArt que incluye el promotor CaMV35S (SEQ ID NO:777). "Y" o "GI" se refieren al intrón GUS. "N" se refiere al terminador NOS. pMBL_GI sirve como un control positivo. PrBDL40 = SEQ ID NO:779 (L); PrBDL39 = SEQ ID NO:789 (L); PrBDL35 = SEQ ID NO:791 (L)

Estos resultados demuestran que los promotores novedosos de la invención son capaces de dirigir la expresión de un polinucleótido heterólogo en una célula huésped en de una manera específica del tejido y/o de la fase del desarrollo.

5 **Ejemplo 7**

Rendimiento mejorado de la planta transgénica

10 Para analizar el efecto de la expresión de los polinucleótidos aislados en plantas, las plantas se cultivaron en macetas con una cantidad adecuada de nutrientes y agua. Las plantas se analizaron para su tamaño general, ritmo de crecimiento, tiempo hasta aparición de la inflorescencia (subida a flor) y floración, rendimiento de semillas, peso de 1.000 semillas, materia seca e índice de cosecha [(HI) rendimiento de semillas/materia seca]. El rendimiento de las plantas transgénicas se comparó con plantas de control cultivadas en paralelo en las mismas condiciones. Las plantas transgénicas simuladas con un vector vacío o que expresan el gen indicador uidA (GUS-Intron) bajo el mismo promotor se usaron como control.

Los parámetros se midieron como se describe en el ejemplo 3 anterior.

15 **Análisis estadísticos-** El ritmo de crecimiento de la planta, el área de la planta, el tiempo hasta subida a la flor, el tiempo hasta florecer, el peso de 1.000 semillas, el rendimiento de semillas, el rendimiento de aceite, la materia seca y los datos del área de índice de cosecha se analizaron usando la prueba de la t. Para identificar genes y construcciones con rendimiento extraordinario, se analizaron los resultados de la combinación de eventos de transformación o eventos independientes. Para el análisis de gen frente a control, se aplicó la prueba de la t, usando significación de $p < 0,1$. Se usó el paquete de software de estadística de JMP (Versión 5.2.1, SAS Institute Inc., Cary, NC, EE. UU.).

Resultados experimentales

25 Las plantas que expresan los polinucleótidos de la invención se ensayaron para una serie de rasgos comercialmente deseados. La tabla 22 proporciona los parámetros medidos en un ensayo de cultivo tisular (los resultados se presentan en la tabla 23).

Tabla 22

Símbolo de parámetro usado en la tabla de resultados 23	Nombre del parámetro
1	Área de la hoja, punto temporal 1
2	Área de la hoja, punto temporal 2
3	Área de la hoja, punto temporal 3
4	Longitud de las raíces, punto temporal 1
5	Longitud de las raíces, punto temporal 2
6	Longitud de las raíces, punto temporal 3
7	Cobertura de las raíces, punto temporal 1
8	Cobertura de las raíces, punto temporal 2
9	Cobertura de las raíces, punto temporal 3
10	RCR del área de la hoja, punto temporal 2
11	RCR del área de la hoja, punto temporal 3

ES 2 674 256 T3

12	RCR de la cobertura de las raíces, punto temporal 2
13	RCR de la cobertura de las raíces, punto temporal 3
14	RCR de la longitud de las raíces, punto temporal 2
15	RCR de la longitud de las raíces, punto temporal 3
16	Peso fresco
17	Peso seco

Tabla 22. RCR = ritmo de crecimiento relativo.

Análisis de plantas en ensayo de cultivo tisular- La tabla 23, a continuación, representa análisis de rendimiento de semillas en plantas que sobreexpresan los polinucleótidos de la invención bajo la regulación de los promotores constitutivos 35S (SEQ ID NO:777) o At6669 (SEQ ID NO:775). En los casos en que un determinado evento aparece más de una vez, el evento se ensayó en varios experimentos independientes.

Gen	Ev.	Par	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
BDL 100	7872.2	P											0,10		0,07	0,34	0,17		
BDL 100	7872.2	Pr											1,15		1,77	1,24	1,40		
BDL 100	7872.3	P											0,22		0,19		0,01		
BDL 100	7872.3	Pr											1,10		1,46		1,63		
BDL 100	7873.2	P											0,16	0,75	0,02	0,51	0,01		
BDL 100	7873.2	Pr											1,12	1,13	1,94	1,17	1,75		
BDL 100	7873.3	P											0,24		0,09		0,01		
BDL 100	7873.3	Pr											1,16		1,47		1,76		
BDL 100	7873.4	P								0,20	0,06	0,16			0,01		0,06		
BDL 100	7873.4	Pr								1,12	1,25	1,22			1,17		1,12		
BDL 108	8122.1	P										0,20	0,24		0,50		0,11		
BDL 108	8122.1	Pr										1,38	1,35		1,32		1,58		
BDL 108	8122.2	P										0,09		0,09		0,12			
BDL 108	8122.2	Pr										1,83		1,47		1,27			
BDL 108	8123.5	P													0,77		0,32		

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
BDL 108	8123.5	Pr													1,13		1,31		
BDL 108	8123.6	P																	
BDL 108	8123.6	Pr																	
BDL 110	8092.1	P			0,05				0,41				0,13		0,42		0,31		0,31
BDL 110	8092.1	Pr			1,23				1,13				1,39		1,16		1,15		1,33
BDL 110	8092.2	P											0,35	0,22	0,13	0,18	0,04		
BDL 110	8092.2	Pr											1,22	3,01	1,25	2,69	1,33		
BDL 110	8092.5	P	0,00	0,01	0,00								0,01	0,18	0,16	0,11	0,33		0,01
BDL 110	8092.5	Pr	1,86	1,30	1,53								1,40	2,04	1,58	2,58	1,11		2,24
BDL 110	8095.2	P	0,00										0,05	0,22	0,00		0,03		0,10
BDL 110	8095.2	Pr	1,53										1,47	1,23	1,62		1,40		1,56
BDL 110	8722.3	P											0,07	0,01	0,22	0,05	0,06		0,16
BDL 110	8722.3	Pr											1,36	2,31	1,14	2,47	1,28		1,47
BDL 114	7741.3	P										0,07	0,66	0,01	0,01	0,02	0,15		
BDL 114	7741.3	Pr										1,51	1,17	1,84	1,51	1,75	1,37		
BDL 114	7741.6	P				0,24	0,34		0,64			0,00	0,25						
BDL 114	7741.6	Pr				1,14	1,22		1,13			1,40	1,23						
BDL 114	7742.1	P				0,36		0,26	0,19	0,62	0,14	0,06					0,51		
BDL 114	7742.1	Pr				1,12		1,15	1,32	1,14	1,29	1,49					1,16		
BDL 114	7742.3	P										0,17	0,69	0,08	0,09	0,08	0,01		
BDL 114	7742.3	Pr										1,28	1,24	2,68	2,00	2,89	1,80		
BDL 114	7742.5	P										0,24	0,37	0,31	0,06	0,59	0,06		

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
BDL 114	7742.5	Pr										1,22	1,40	1,47	2,31	1,27	2,05		
BDL 116	7481.2	P										0,32		0,06		0,16	0,04		
BDL 116	7481.2	Pr										1,34		1,59		1,27	1,14		
BDL 116	7481.7	P												0,03	0,21	0,01	0,07		
BDL 116	7481.7	Pr												1,85	1,44	2,11	1,59		
BDL 116	7481.8	P				0,30	0,13	0,24	0,59	0,30	0,42	0,27	0,36	0,62		0,17			
BDL 116	7481.8	Pr				1,25	1,40	1,26	1,15	1,34	1,26	1,16	1,17	1,12		1,20			
BDL 116	7482.2	P										0,46	0,62	0,22	0,35	0,02	0,17		
BDL 116	7482.2	Pr										1,11	1,16	1,40	1,56	1,44	1,58		
BDL 116	7485.1	P										0,21		0,26	0,20	0,03	0,10		
BDL 116	7485.1	Pr										1,27		1,78	1,47	2,06	1,44		
BDL 120	7891.3	P												0,12	0,07	0,01	0,01		
BDL 120	7891.3	Pr												1,35	1,41	1,63	1,52		
BDL 120	7892.4	P										0,28	0,42	0,04	0,15	0,02	0,03		
BDL 120	7892.4	Pr										1,15	1,12	2,33	1,44	2,49	1,70		
BDL 120	7892.6	P													0,03	0,77	0,02		
BDL 120	7892.6	Pr													1,63	1,12	1,44		
BDL 120	7893.2	P											0,36		0,17	0,57	0,06		0,28
BDL 120	7893.2	Pr											1,27		1,96	1,14	1,86		1,26
BDL 120	7893.5	P													0,30		0,45		
BDL 120	7893.5	Pr													1,73		1,49		
BDL 123	8082.1	P											0,05	0,54	0,07	0,17	0,11		

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
BDL 123	8082.1	Pr											1,37	1,19	1,38	1,58	1,59		
BDL 123	8082.3	P												0,27	0,12	0,33	0,01		0,43
BDL 123	8082.3	Pr												1,64	1,75	1,41	1,85		1,18
BDL 123	8082.6	P												0,03	0,07	0,07	0,01		
BDL 123	8082.6	Pr												1,67	1,52	2,05	1,62		
BDL 123	8083.2	P											0,07	0,35	0,45	0,31	0,07		
BDL 123	8083.2	Pr											1,25	1,62	1,50	1,67	1,86		
BDL 123	8083.3	P										0,20		0,72	0,11	0,34	0,18		
BDL 123	8083.3	Pr										1,34		1,12	1,57	1,28	1,51		
BDL 125	7491.1	P										0,30			0,36		0,26		
BDL 125	7491.1	Pr										1,16			1,46		1,38		
BDL 125	7491.5	P											0,16		0,03	0,43	0,01		
BDL 125	7491.5	Pr											1,24		2,32	1,28	2,15		
BDL 125	7492.5	P										0,29		0,03	0,22	0,00	0,04		
BDL 125	7492.5	Pr										1,22		2,17	1,54	2,83	1,61		
BDL 125	7494.1	P					0,04	0,07		0,05	0,14			0,30		0,08			0,23
BDL 125	7494.1	Pr					1,21	1,20		1,41	1,43			1,81		2,60			1,45
BDL 125	7495.5	P										0,36	0,51	0,05	0,09	0,05	0,00		
BDL 125	7495.5	Pr										1,12	1,10	3,54	1,45	3,05	1,82		
BDL 128	7711.3	P															0,37		
BDL 128	7711.3	Pr															1,35		
BDL 128	8361.5	P												0,13	0,08	0,10	0,09		

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
BDL 128	8361.5	Pr												1,74	1,43	1,91	1,66		
BDL 128	8362.2	P											0,32		0,18		0,35		
BDL 128	8362.2	Pr											1,17		1,31		1,36		
BDL 128	8363.2	P											0,04	0,30	0,05	0,15	0,00		
BDL 128	8363.2	Pr											1,24	1,37	1,46	1,83	1,46		
BDL 128	8365.2	P											0,02		0,01		0,11		
BDL 128	8365.2	Pr											1,70		3,04		2,64		
BDL 129	7691.2	P	0,13	0,40	0,35						0,54		0,63	0,00	0,18	0,03	0,52	0,00	0,09
BDL 129	7691.2	Pr	1,40	1,30	1,34						1,27		1,14	2,99	1,77	2,10	1,17	1,83	1,73
BDL 129	7692.2	P			0,10								0,16	0,01	0,00	0,03	0,00	0,03	0,09
BDL 129	7692.2	Pr			1,16								1,29	3,43	1,85	1,82	1,71	1,85	1,42
BDL 129	7692.5	P										0,03			0,09		0,08		
BDL 129	7692.5	Pr										1,37			1,71		1,61		
BDL 129	7693.1	P										0,51		0,00	0,27	0,00	0,27		
BDL 129	7693.1	Pr										1,37		2,05	1,58	1,82	1,52		
BDL 129	7693.4	P												0,07	0,09	0,05	0,13		
BDL 129	7693.4	Pr												2,43	1,83	1,69	1,60		
BDL 130	7661.7	P	0,06	0,01	0,00								0,00	0,02	0,12	0,04	0,01	0,01	0,27
BDL 130	7661.7	Pr	1,22	1,14	1,32								1,45	3,08	1,79	2,15	1,58	1,88	1,23
BDL 130	7663.1	P		0,03	0,25							0,00			0,00		0,00		0,67
BDL 130	7663.1	Pr		1,24	1,20							1,40			1,41		1,53		1,10

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
BDL 130	7663.3	P											0,06	0,42	0,01	0,62	0,01		
BDL 130	7663.3	Pr											1,60	1,29	2,93	1,14	1,96		
BDL 130	7663.6	P											0,12	3,03	0,08	0,04	0,00		
BDL 130	7663.6	Pr											1,21	2,28	1,75	1,98	1,79		
BDL 130	7664.5	P	0,33	0,03	0,00			0,10	0,07	0,26	0,00	0,02			0,00		0,00	0,51	
BDL 130	7664.5	Pr	1,11	1,35	1,35			1,16	1,19	1,11	1,31	1,33			1,37		1,42	1,10	
BDL 130	8572.4	P	0,01	0,07	0,07								0,23	0,05	0,00	0,10	0,00	0,00	0,01
BDL 130	8572.4	Pr	1,47	1,18	1,29								1,20	2,51	2,92	1,72	2,16	2,33	2,68
BDL 130	8573.5	P		0,35	0,08			0,32			0,15		0,29	0,28	0,09		0,09	0,04	0,18
BDL 130	8573.5	Pr		1,12	1,21			1,13			1,28		1,22	1,30	1,91		1,33	1,36	1,24
BDL 130	8574.2	P									0,39	0,46	0,23	0,28	0,05		0,06	0,16	0,10
BDL 130	8574.2	Pr									1,17	1,15	1,28	1,44	1,84		1,64	1,37	1,60
BDL 130	8574.4	P	0,03	0,05	0,01	0,37	0,13	0,05	0,17	0,03	0,02		0,14	0,61	0,55			0,05	0,05
BDL 130	8574.4	Pr	1,46	1,50	1,65	1,40	1,35	1,32	1,98	2,00	2,05		1,25	1,12	1,14			2,26	2,30
BDL 130	8575.1	P	0,00	0,00	0,00		0,11	0,08	0,00	0,03	0,02			0,13		0,03	0,13	0,00	0,31
BDL 130	8575.1	Pr	1,44	1,51	1,56		1,21	1,28	1,50	1,94	1,88			1,32		1,35	1,20	2,07	1,59
BDL 131	8631.1	P	0,02											0,40	0,06			0,05	0,00
BDL 131	8631.1	Pr	1,36											1,23	1,77			1,82	1,65
BDL 131	8632.2	P	0,01	0,01	0,01		0,24	0,15		0,25	0,03			0,03	0,20	0,00		0,03	0,05
BDL 131	8632.2	Pr	1,61	1,64	1,66		1,20	1,19		1,30	1,60			2,05	1,58	1,65		3,33	2,82
BDL 131	8633.2	P	0,14										0,39	0,48	0,05		0,14	0,11	0,08

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17		
BDL 131	8633.2	Pr	1,12										1,21	1,22	2,07		1,20	1,38	1,74		
BDL 131	8634.2	P	0,00	0,13	0,08						0,13		0,22	0,03	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00		
BDL 131	8634.2	Pr	1,34	1,23	1,35								1,27		1,23	2,70	2,39	2,04	1,54	2,04	2,49
BDL 131	8635.4	P	0,00	0,15	0,23	0,08	0,12	0,18	0,12	0,09	0,11	0,49	0,30	0,27		0,51		0,05	0,03		
BDL 131	8635.4	Pr	1,24	1,41	1,70	1,14	1,26	1,28	1,35	1,77	1,79	1,20	1,34	1,41		1,17		1,68	2,07		
BDL 133	8542.2	P												0,45				0,47	0,52		
BDL 133	8542.2	Pr												1,10				1,11	1,20		
BDL 133	8542.3	P		0,04	0,02		0,02	0,00		0,02	0,01	0,05	0,21	0,01	0,16	0,01	0,03	0,10	0,00		
BDL 133	8542.3	Pr		1,41	1,72		1,30	1,47		1,84	2,02	1,48	1,53	1,95	1,24	1,45	1,42	1,69	1,85		
BDL 133	8543.4	P	0,16	0,10	0,17						0,59	0,17		0,17	0,01	0,41	0,00	0,09	0,15		
BDL 133	8543.4	Pr	1,21	1,36	1,43						1,18	1,18		1,39	1,91	1,25	1,58	2,03	1,73		
BDL 133	8544.3	P	0,22	0,26	0,17		0,14	0,04	0,51	0,23	0,07		0,30	0,26	0,31	0,35	0,29	0,38	0,17		
BDL 133	8544.3	Pr	1,32	1,23	1,30		1,16	1,20	1,24	1,39	1,51		1,15	1,21	1,28	1,18	1,17	1,21	1,46		
BDL 133	8545.3	P	0,07	0,01	0,00		0,51	0,24		0,18	0,07	0,51		0,05	0,04	0,04	0,17	0,00	0,00		
BDL 133	8545.3	Pr	1,51	1,68	1,63		1,10	1,18		1,44	1,81	1,32		2,76	1,55	2,12	1,26	2,51	3,55		
BDL 134	7671.2	P										0,69			0,61	0,21	0,07				
BDL 134	7671.2	Pr										1,12			1,17	1,30	1,42				
BDL 134	7672.5	P										0,33	0,63	0,24	0,08	0,20	0,04				
BDL 134	7672.5	Pr										1,16	1,11	1,27	1,47	1,56	1,71				
BDL 134	7673.1	P										0,40		0,12		0,00	0,43				
BDL 134	7673.1	Pr										1,13		1,29		1,74	1,24				
BDL 134	7673.2	P											0,44		0,00		0,03				

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
BDL 134	7673.2	Pr											1,33		2,67		2,32		
BDL 135	7723.9	P				0,02	0,22		0,04			0,00	0,08						
BDL 135	7723.9	Pr				1,87	1,23		2,11			1,62	1,19						
BDL 135	8782.2	P										0,33	0,39	0,44	0,10	0,00	0,29		
BDL 135	8782.2	Pr										1,30	1,81	1,43	1,73	1,75	1,20		
BDL 135	8783.1	P				0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,09	0,00	0,23						
BDL 135	8783.1	Pr				2,70	2,40	1,85	3,94	2,48	1,80	1,68	1,20						
BDL 135	8783.2	P										0,32	0,48						
BDL 135	8783.2	Pr										1,74	1,18						
BDL 135	8785.5	P	0,02	0,07	0,14	0,10	0,01	0,02	0,03	0,03	0,05	0,20				0,32			
BDL 135	8785.5	Pr	1,16	1,28	1,33	1,67	1,96	1,76	1,66	2,53	2,26	1,17				1,20			
BDL 137	7701.2	P											0,25	0,07	0,22	0,09	0,10		
BDL 137	7701.2	Pr											1,14	1,48	1,61	1,91	1,68		
BDL 137	7701.5	P												0,33	0,02	0,21	0,03		
BDL 137	7701.5	Pr												2,23	1,36	1,92	1,44		
BDL 137	7702.1	P										0,30	0,32	0,27	0,05	0,40	0,08		
BDL 137	7702.1	Pr										1,21	1,44	1,49	1,96	1,41	1,87		
BDL 137	7703.3	P		0,10	0,16			0,12			0,51	0,31		0,03	0,13	0,03	0,08		
BDL 137	7703.3	Pr		1,13	1,15			1,15			1,12	1,20		1,95	1,17	2,59	1,26		
BDL 137	7703.7	P											0,38	0,19	0,34	0,15	0,05		
BDL 137	7703.7	Pr											1,24	2,04	2,78	2,12	1,86		
BDL 139	8581.5	P			0,38							0,23	0,30	0,10	0,01	0,15	0,09	0,05	0,02

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
BDL 139	8581.5	Pr			1,14							1,16	1,20	1,58	1,54	1,35	1,37	1,57	1,68
BDL 139	8581.5	P																	0,57
BDL 139	8581.5	Pr																	1,21
BDL 139	8581.6	P	0,01	0,01	0,07		0,28			0,19	0,56	0,36		0,12		0,31		0,00	0,00
BDL 139	8581.6	Pr	1,90	2,16	1,46		1,10			1,45	1,17	1,22		2,54		1,35		2,79	4,10
BDL 139	8581.6	P		0,32	0,43													0,10	0,01
BDL 139	8581.6	Pr		1,11	1,14													1,64	1,85
BDL 139	8583.1	P			0,24							0,09	0,12	0,00	0,00	0,03	0,00		0,22
BDL 139	8583.1	Pr			1,13							1,18	1,27	2,25	2,43	1,50	2,22		1,36
BDL 139	8583.1	P												0,20	0,59	0,36	0,27		
BDL 139	8583.1	Pr												1,24	1,12	1,10	1,26		
BDL 139	8584.1	P			0,31							0,59	0,23	0,06	0,00	0,09	0,01		0,00
BDL 139	8584.1	Pr			1,18							1,12	1,30	1,87	1,59	1,37	1,70		1,77
BDL 139	8584.1	P											0,46	0,04	0,02	0,00	0,14		
BDL 139	8584.1	Pr											1,35	1,66	1,57	1,58	1,32		
BDL 139	8585.2	P	0,00	0,01	0,02						0,35			0,05	0,05	0,03	0,05		0,11
BDL 139	8585.2	Pr	1,61	1,52	1,49						1,27			3,34	2,30	2,18	1,60		2,38
BDL 139	8585.2	P	0,32		0,23								0,16		0,13		0,17	0,20	0,03
BDL 139	8585.2	Pr	1,14		1,22								1,42		1,33		1,29	2,06	1,83
BDL 141	8641.3	P	0,02	0,06	0,01		0,09	0,10		0,16	0,11			0,00		0,00			0,01
BDL 141	8641.3	Pr	1,82	1,82	1,78		1,51	1,42		2,17	1,93			2,54		1,95			3,77
BDL 141	8641.3	P		0,49	0,10							0,45	0,10	0,49	0,52			0,10	0,10

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
BDL 141	8641.3	Pr		1,10	1,43							1,10	1,69	1,13	1,12			1,51	1,83
BDL 141	8641.4	P											0,50	0,01	0,14	0,02	0,11		0,17
BDL 141	8641.4	Pr											1,11	2,36	3,23	1,98	1,74		1,90
BDL 141	8641.4	P			0,10								0,12	0,21	0,05	0,42	0,10	0,08	0,05
BDL 141	8641.4	Pr			1,18								1,66	1,35	1,98	1,13	1,19	1,27	1,64
BDL 141	8642.3	P	0,01	0,05	0,01						0,13		0,18	0,01	0,03	0,03	0,02		0,00
BDL 141	8642.3	Pr	1,49	1,32	1,45						1,33		1,23	1,98	1,68	1,43	1,35		2,64
BDL 141	8642.3	P											0,46						0,02
BDL 141	8642.3	Pr											1,26						1,66
BDL 141	8642.6	P											0,24	0,15	0,22	0,24	0,15		0,08
BDL 141	8642.6	Pr											1,25	1,45	1,24	1,20	1,19		1,83
BDL 141	8642.6	P																	0,31
BDL 141	8642.6	Pr																	1,30
BDL 141	8643.3	P	0,00	0,07	0,08					0,63	0,22			0,06	0,11	0,01	0,19		0,00
BDL 141	8643.3	Pr	1,49	1,31	1,33					1,15	1,51			1,47	1,68	1,49	1,27		3,80
BDL 141	8643.3	P											0,24					0,43	0,14
BDL 141	8643.3	Pr											1,38					1,21	1,38
BDL 142	8283.2	P																	
BDL 142	8283.2	Pr																	
BDL 142	8284.1	P												0,60	0,18	0,11	0,11		
BDL 142	8284.1	Pr												1,10	1,17	1,47	1,36		
BDL 142	8285.1	P		0,07		0,22	0,06	0,03	0,08	0,00	0,01	0,19				0,42			

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
BDL 142	8285.1	Pr		1,51		1,22	1,35	1,36	2,43	2,18	1,75	2,62				1,22			
BDL 142	8285.3	P										0,18		0,13	0,65	0,06	0,19		
BDL 142	8285.3	Pr										1,22		1,65	1,13	1,89	1,24		
BDL 142	8285.5	P			0,48		0,38		0,15	0,42			0,33			0,60			
BDL 142	8285.5	Pr			1,11		1,11		1,29	1,15			1,22			1,11			
BDL 143	8411.1	P												0,22	0,31	0,02	0,02		
BDL 143	8411.1	Pr												1,51	1,22	2,08	1,50		
BDL 143	8412.2	P												0,28		0,08			
BDL 143	8412.2	Pr												1,59		2,30			
BDL 143	8413.3	P										0,04		0,49	0,14	0,43	0,23		
BDL 143	8413.3	Pr										1,49		1,22	1,39	1,31	1,30		
BDL 143	8414.4	P												0,69	0,17	0,59	0,01		
BDL 143	8414.4	Pr												1,27	1,42	1,25	1,84		
BDL 143	8414.5	P										0,17	0,31		0,42	0,12			
BDL 143	8414.5	Pr										1,28	1,21		1,10	1,40			
BDL 144	8381.3	P										0,53			0,03		0,11		
BDL 144	8381.3	Pr										1,15			1,85		1,39		
BDL 144	8382.2	P	0,22	0,24	0,40						0,45	0,36		0,16	0,32	0,08		0,01	0,20
BDL 144	8382.2	Pr	1,36	1,61	1,34						1,37	1,31		2,95	1,30	1,73		1,55	1,20
BDL 144	8384.4	P		0,04								0,33		0,01		0,01			
BDL 144	8384.4	Pr		1,42								2,46		2,51		1,97			
BDL 144	8385.1	P										0,13		0,06	0,02	0,27	0,03		

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
BDL 144	8385.1	Pr										1,59		1,51	2,26	1,36	1,60		
BDL 145	8233.2	P												0,08		0,11	0,00		
BDL 145	8233.2	Pr												1,39		1,61	1,42		
BDL 145	8233.3	P											0,57	0,24	0,21	0,04	0,00		
BDL 145	8233.3	Pr											1,12	1,71	1,43	2,15	1,51		
BDL 145	8235.3	P											0,40	0,31		0,01			
BDL 145	8235.3	Pr											1,18	1,34		1,55			
BDL 145	8731.3	P											0,81	0,41	0,47	0,12	0,21		
BDL 145	8731.3	Pr											1,12	1,45	1,36	1,60	1,52		
BDL 145	8734.2	P												0,09	0,32	0,02	0,00		
BDL 145	8734.2	Pr												2,95	1,16	2,57	1,38		
BDL 146	8241.1	P		0,11	0,03							0,07	0,67	0,06	0,01	0,08	0,00	0,08	3,64
BDL 146	8241.1	Pr		1,18	1,28							1,20	1,12	1,85	1,52	1,50	1,52	1,37	1,11
BDL 146	8241.3	P										0,06	0,17	0,25	0,01		0,00		
BDL 146	8241.3	Pr										1,45	1,23	1,18	4,78		3,57		
BDL 146	8244.4	P	0,00	0,01	0,04									0,03	0,53	0,09	0,06	0,02	
BDL 146	8244.4	Pr	1,76	1,74	1,66									1,45	1,45	1,43	1,52	1,78	
BDL 146	8244.7	P										0,12	0,31	0,00	0,05	0,01	0,02		
BDL 146	8244.7	Pr										1,57	1,15	2,44	2,61	2,07	2,32		
BDL 146	8245.5	P	0,02	0,01	0,01							0,22			0,40		0,00	0,13	
BDL 146	8245.5	Pr	1,23	1,43	1,32							1,26			1,12		1,33	1,32	
BDL 42	7771.3	P		0,20	0,01		0,29	0,06		0,41	0,04	0,17	0,01	0,17	0,18	0,02		0,04	0,09

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
BDL 42	7771.3	Pr		1,14	1,50		1,15	1,25		1,27	1,67	1,34	1,55	2,06	1,37	1,80		1,30	1,36
BDL 42	7771.5	P										0,43	0,05		0,12		0,00		
BDL 42	7771.5	Pr										1,51	1,15		3,36		1,69		
BDL 42	7772.6	P				0,00			0,00			0,01						0,10	
BDL 42	7772.6	Pr				1,85			3,31			1,43						1,34	
BDL 42	7774.1	P											0,01		0,01		0,02		
BDL 42	7774.1	Pr											1,57		4,16		2,03		
BDL 42	7774.5	P						0,55			0,63		0,02	0,20	0,24	0,06	0,44		
BDL 42	7774.5	Pr						1,11			1,14		1,56	2,36	1,66	2,21	1,23		
BDL 51	8021.1	P											0,25		0,01		0,01		
BDL 51	8021.1	Pr											1,14		1,92		1,50		
BDL 51	8022.4	P											0,06		0,02		0,01		
BDL 51	8022.4	Pr											1,15		1,80		1,59		
BDL 51	8022.5	P										0,24	0,00		0,06		0,00		
BDL 51	8022.5	Pr										1,11	1,27		2,05		1,84		
BDL 51	8022.7	P		0,08		0,00	0,18	0,25	0,00	0,02	0,03	0,34						0,16	
BDL 51	8022.7	Pr		1,22		1,80	1,18	1,14	3,36	1,71	1,53	1,30						1,34	
BDL 51	8024.4	P										0,02			0,46		0,04		
BDL 51	8024.4	Pr										1,20			1,25		1,38		
BDL 51	8024.7	P							0,02						0,05		0,02		
BDL 51	8024.7	Pr							1,34						1,45		1,39		
BDL 52	7861.1	P	0,05		0,44								0,08	0,10	0,12	0,02	0,04		0,38

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
BDL 52	7861.1	Pr	1,26		1,20								1,73	3,22	1,90	2,82	1,37		1,19
BDL 52	7863.2	P	0,00		0,55								0,52	0,16		0,29			0,08
BDL 52	7863.2	Pr	1,42		1,14								1,17	1,31		1,32			1,47
BDL 52	7864.2	P	0,10											0,26	0,57	0,22			
BDL 52	7864.2	Pr	1,22											3,45	1,10	2,55			
BDL 52	7864.3	P				0,00	0,27		0,01	0,41	0,46								
BDL 52	7864.3	Pr				1,28	1,11		1,76	1,16	1,12								
BDL 52	7864.5	P	0,27	0,47											0,10				
BDL 52	7864.5	Pr	1,19	1,10											1,12				
BDL 59	7792.1	P																	
BDL 59	7792.1	Pr																	
BDL 59	7792.2	P												0,20					
BDL 59	7792.2	Pr												1,27					
BDL 59	7792.3	P																	
BDL 59	7792.3	Pr																	
BDL 59	7793.3	P										0,01		0,00		0,04			
BDL 59	7793.3	Pr										1,76		1,65		1,45			
BDL 59	7794.1	P										0,12							
BDL 59	7794.1	Pr										1,15							
BDL 65	7824.1	P													0,08		0,11		
BDL 65	7824.1	Pr													1,79		1,37		
BDL 65	7825.2	P	0,18																0,48

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
BDL 65	7825.2	Pr	1,12																1,16
BDL 65	8761.1	P												0,16		0,07	0,04		0,66
BDL 65	8761.1	Pr												2,09		1,51	1,39		1,11
BDL 65	8762.3	P	0,10															0,15	0,70
BDL 65	8762.3	Pr	1,14															1,27	1,15
BDL 65	8764.1	P												0,08	0,03	0,39	0,00	0,39	
BDL 65	8764.1	Pr												1,42	1,81	1,10	1,98	1,46	
BDL 67	7901.5	P													0,18		0,16		
BDL 67	7901.5	Pr													1,71		1,58		
BDL 67	7902.3	P											0,07		0,10		0,00		
BDL 67	7902.3	Pr											1,20		1,22		1,49		
BDL 67	7902.7	P											0,06	0,03	0,50	0,08	0,35		0,27
BDL 67	7902.7	Pr											1,42	5,05	1,16	4,84	1,19		1,23
BDL 67	7903.3	P													0,00		0,19		
BDL 67	7903.3	Pr													1,40		1,21		
BDL 67	7903.5	P	0,01										0,01	0,29		0,02			
BDL 67	7903.5	Pr	1,26										1,34	1,35		2,25			
BDL 68	7761.3	P				0,11			0,24										
BDL 68	7761.3	Pr				1,16			1,13										
BDL 68	7761.5	P												0,02		0,01	0,68		
BDL 68	7761.5	Pr												1,79		1,42	1,16		
BDL 68	7761.9	P																	

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
BDL 68	7761.9	Pr																	
BDL 68	7764.1	P										0,49							
BDL 68	7764.1	Pr										1,16							
BDL 68	7765.2	P						0,11			0,10	0,03		0,26	0,25		0,22		
BDL 68	7765.2	Pr						1,23			1,51	1,84		1,40	1,43		1,37		
BDL 78	7911.11	P		0,47	0,27			0,07			0,18	0,01	0,24		0,04		0,01		
BDL 78	7911.11	Pr		1,10	1,16			1,16			1,19	1,58	1,16		1,24		1,36		
BDL 78	7911.8	P			0,53								0,04	0,05	0,22	0,05	0,08	0,09	
BDL 78	7911.8	Pr			1,12								1,31	2,55	1,36	1,87	1,47	1,63	
BDL 78	7912.6	P		0,00	0,03							0,44	0,29	0,22	0,04	0,00	0,00	0,53	
BDL 78	7912.6	Pr		1,16	1,25							1,13	1,23	2,15	1,85	1,30	1,82	1,16	
BDL 78	7913.6	P											0,61	0,27	0,20	0,20	0,47		
BDL 78	7913.6	Pr											1,16	1,83	1,50	1,35	1,16		
BDL 78	7913.8	P		0,34	0,43							0,01			0,11		0,02		0,39
BDL 78	7913.8	Pr		1,14	1,13							1,57			1,28		1,39		4,27
BDL 78	7913.9	P												0,00		0,05	0,08	0,22	
BDL 78	7913.9	Pr												2,56		1,75	1,56	1,40	
BDL 82	7801.1	P													0,05		0,00		
BDL 82	7801.1	Pr													1,97		1,57		
BDL 82	7801.2	P										0,11	0,21	0,83		0,33			
BDL 82	7801.2	Pr										1,13	1,14	1,12		1,33			
BDL 82	7801.3	P											0,00		0,20		0,01		

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
BDL 82	7801.3	Pr											1,32		1,78		1,69		
BDL 82	7801.3	P											0,09		0,00		0,02		
BDL 82	7801.3	Pr											2,47		5,03		2,49		
BDL 82	7802.2	P											0,00		0,02		0,00		
BDL 82	7802.2	Pr											1,62		3,16		2,56		
BDL 82	7802.2	P											0,58						
BDL 82	7802.2	Pr											1,11						
BDL 82	7802.3	P											0,22		0,07		0,02		
BDL 82	7802.3	Pr											1,33		1,67		1,46		
BDL 82	7803.4	P													0,11	0,28	0,03		
BDL 82	7803.4	Pr													1,51	1,28	1,36		
BDL 82	7803.8	P											0,11		0,12		0,03	0,41	0,40
BDL 82	7803.8	Pr											1,55		1,90		2,13	1,37	1,15
BDL 82	7803.9	P										0,00	0,06	0,33	0,35		0,37	0,41	0,01
BDL 82	7803.9	Pr										1,27	1,27	1,15	1,33		1,34	1,16	1,17
BDL 82	7803.9	P											0,31	0,12	0,16	0,05	0,43		
BDL 82	7803.9	Pr											1,12	2,57	1,28	2,36	1,13		
BDL 82	7808.6	P	0,00	0,02	0,05			0,04			0,10			0,14	0,17	0,08	0,08		
BDL 82	7808.6	Pr	1,50	1,18	1,22			1,29			1,42			2,35	1,48	2,32	1,26		
BDL 89	7812.2	P											0,07	0,00	0,00	0,01	0,00		
BDL 89	7812.2	Pr											1,16	1,75	1,41	1,50	1,35		
BDL 89	7812.5	P											0,16		0,04		0,01		

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
BDL 89	7812.5	Pr											1,43		3,01		2,30		
BDL 89	7814.1	P											0,05	0,64	0,07		0,07		
BDL 89	7814.1	Pr											1,17	1,13	1,60		1,57		
BDL 89	7814.4	P										0,19			0,12		0,12		
BDL 89	7814.4	Pr										1,40			1,39		1,39		
BDL 89	7814.5	P										0,11	0,28	0,41	0,02	0,37	0,05		
BDL 89	7814.5	Pr										1,30	1,16	2,04	2,01	1,21	1,68		
BDL 95	7841.2	P											0,03	0,55	0,16	0,70	0,08		
BDL 95	7841.2	Pr											1,21	1,23	1,40	1,10	1,37		
BDL 95	7842.12	P			0,41							0,02	0,10	0,31	0,17	0,36	0,02		
BDL 95	7842.12	Pr			1,12							1,26	1,26	1,28	1,27	1,17	1,46		
BDL 95	7842.2	P										0,11			0,34		0,00		
BDL 95	7842.2	Pr										1,30			1,19		1,34		
BDL 95	7842.8	P										0,18	0,14		0,00	0,33	0,06		
BDL 95	7842.8	Pr										1,22	1,22		1,63	1,19	1,49		
BDL 95	7843.4	P											0,02		0,04		0,01		
BDL 95	7843.4	Pr											1,58		2,93		2,20		

Tabla 23, "P" = valor P; "Pr" = cociente entre los promedios de evento y control. Hay que señalar que cuando el cociente de los promedios es mayor que "1" el efecto de la expresión exógena del gen es un incremento del rasgo deseado, "Par" = Parámetro de acuerdo con los parámetros enumerados en la Tabla 22 anterior; "Ev" = evento.

Ensayos en invernadero- Las tablas 25, 26 y 27 representan experimentos que se realizaron usando ensayos en invernadero. La tabla 24 especifica los parámetros que se midieron en los ensayos en invernadero y que se presentan en las tablas 25, 26 y 27. En los casos en que un determinado evento aparece más de una vez, el evento se ensayó en varios experimentos independientes.

Tabla 24

<i>Símbolo de parámetro en las tablas de resultados 25, 26 y 27</i>	<i>Nombre del parámetro</i>	<i>Símbolo de parámetro en las tablas de resultados 25, 26 y 27</i>	<i>Nombre del parámetro</i>
1	Diámetro de roseta, punto temporal 1	31	Área relativa del peciolo, punto temporal 3
2	Diámetro de roseta, punto temporal 2	32	Área relativa del peciolo, punto temporal 4
3	Diámetro de roseta, punto temporal 3	33	RCR del área del cuerpo de la hoja, punto temporal 2
4	Diámetro de roseta, punto temporal 4	34	RCR del área del cuerpo de la hoja, punto temporal 3
5	Área de roseta, punto temporal 1	35	RCR del área del cuerpo de la hoja, punto temporal 4
6	Área de roseta, punto temporal 2	36	RCR del número de hojas, punto temporal 2
7	Área de roseta, punto temporal 3	37	RCR del número de hojas, punto temporal 3
8	Área de roseta, punto temporal 4	38	RCR del número de hojas, punto temporal 4
9	Cobertura de la parcela, punto temporal 1	39	RCR del área de roseta, punto temporal 2
10	Cobertura de la parcela, punto temporal 2	40	RCR del área de roseta, punto temporal 3
11	Cobertura de la parcela, punto temporal 3	41	RCR del área de roseta, punto temporal 4
12	Cobertura de la parcela, punto temporal 4	42	RCR del diámetro de roseta, punto temporal 2
13	Número de hojas, punto temporal 1	43	RCR del diámetro de roseta, punto temporal 3
14	Número de hojas, punto temporal 2	44	RCR del diámetro de roseta, punto temporal 4
15	Número de hojas, punto temporal 3	45	RCR de la cobertura de la parcela, punto temporal 2
16	Número de hojas, punto temporal 4	46	RCR de la cobertura de la parcela, punto temporal 3
17	Área del cuerpo de la hoja, punto temporal 1	47	RCR de la cobertura de la parcela, punto temporal 4
18	Área del cuerpo de la hoja, punto temporal 2	48	Subida a flor
19	Área del cuerpo de la hoja, punto temporal 3	49	Floración
20	Área del cuerpo de la hoja, punto temporal 4	50	Peso seco
21	Área del peciolo de la hoja, punto temporal 1	51	Rendimiento de semillas

ES 2 674 256 T3

22	Área del peciolo de la hoja, punto temporal 2	52	Índice de cosecha
23	Área del peciolo de la hoja, punto temporal 3	53	Peso de 1000 semillas
24	Área del peciolo de la hoja, punto temporal 4	54	contenido de aceite
25	Área relativa del cuerpo de la hoja, punto temporal 1	55	Peso fresco
26	Área relativa del cuerpo de la hoja, punto temporal 2		
27	Área relativa del cuerpo de la hoja, punto temporal 3		
28	Área relativa del cuerpo de la hoja, punto temporal 4		
29	Área relativa del peciolo, punto temporal 1		
30	Área relativa del peciolo, punto temporal 2		
Tabla 24			

Tabla 25

Gen	Ev.	Par.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
BDL 95	7841,5	P																	
BDL 95	7841,5	Pr.																	
BDL 95	7842,12	P																	
BDL 95	7842,12	Pr.																	
BDL 95	7842,2	P																	0,35
BDL 95	7842,2	Pr.																	1,12
BDL 95	7842,8	P																	
BDL 95	7842,8	Pr.																	
BDL 95	7843,4	P																	
BDL 95	7843,4	Pr.																	
BDL 100	7871,2	P																	
BDL 100	7871,2	Pr.																	
BDL 100	7872,2	P																	
BDL 100	7872,2	Pr.																	
BDL 100	7872,3	P			0,35		0,31	0,53	0,33	0,10	0,31	0,53	0,33	0,10			0,23	0,02	0,23
BDL 100	7872,3	Pr.			1,11		1,38	1,21	1,19	1,20	1,38	1,21	1,19	1,20			1,13	1,08	1,38
BDL	7873,3	P																	

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
100																			
BDL 100	7873,3	Pr.																	
BDL 100	7873,4	P	0,43				0,23		0,57	0,53	0,23		0,57	0,53					0,39
BDL 100	7873,4	Pr.	1,11				1,23		1,12	1,14	1,23		1,12	1,14					1,15
BDL 106	7881,1	P					0,24					0,24							
BDL 106	7881,1	Pr.					1,13					1,13							
BDL 106	7881,4	P																	
BDL 106	7881,4	Pr.																	
BDL 106	7882,6	P																	
BDL 106	7882,6	Pr.																	
BDL 106	7884,1	P																	
BDL 106	7884,1	Pr.																	
BDL 106	7884,9	P																	
BDL 106	7884,9	Pr.																	
BDL 106	7881,1	P																	
BDL 106	7881,1	Pr.																	
BDL 106	7881,2	P																	
BDL 106	7881,2	Pr.																	
BDL 106	7882,2	P					0,79				0,79								0,04
BDL 106	7882,2	Pr.					1,13				1,13								1,17
BDL 106	7882,4	P																	
BDL 106	7882,4	Pr.																	
BDL 106	7882,5	P																	
BDL 106	7882,5	Pr.																	
BDL 108	8122,2	P																	
BDL 108	8122,2	Pr.																	
BDL 108	8122,3	P														0,02			0,42
BDL 108	8122,3	Pr.														1,10			1,11
BDL 108	8123,1	P																	
BDL 108	8123,1	Pr.																	
BDL 108	8123,2	P																	
BDL 108	8123,2	Pr.																	

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
BDL 108	8123,5	P																	
BDL 108	8123,5	Pr.																	
BDL 108	8121,1	P																	
BDL 108	8121,1	Pr.																	
BDL 108	8121,3	P																	
BDL 108	8121,3	Pr.																	
BDL 108	8121,4	P																	
BDL 108	8121,4	Pr.																	
BDL 108	8122,7	P																	
BDL 108	8122,7	Pr.																	
BDL 108	8123,7	P																	
BDL 108	8123,7	Pr.																	
BDL 110	8092,1	P	0,46		0,01		0,56				0,56				0,46				
BDL 110	8092,1	Pr.	1,13		1,43		1,17				1,17				1,27				
BDL 110	8092,2	P			0,15														
BDL 110	8092,2	Pr.			1,21														
BDL 110	8092,5	P	0,10		0,01		0,28	0,00	0,30	0,11	0,53			0,05	0,10				
BDL 110	8092,5	Pr.	1,27		1,52		1,26	1,17	1,11	1,19	1,19			1,11	1,35				
BDL 110	8095,2	P			0,01		0,21				0,21				0,05				
BDL 110	8095,2	Pr.			1,44		1,23				1,23				1,45				
BDL 111	8102,7	P																	
BDL 111	8102,7	Pr.																	
BDL 111	8103,1	P																	
BDL 111	8103,1	Pr.																	
BDL 111	8103,2	P																	
BDL 111	8103,2	Pr.																	
BDL 111	8103,4	P																	
BDL 111	8103,4	Pr.																	
BDL 111	8103,5	P																	0,04
BDL 111	8103,5	Pr.																	1,04
BDL 111	8102,7	P																	
BDL 111	8102,7	Pr.																	

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
111																			
BDL 111	8103,1	P	0,41		0,56	0,39		0,67		0,55		0,67		0,55					
BDL 111	8103,1	Pr.	1,11		1,13	1,10		1,12		1,15		1,12		1,15					
BDL 111	8103,2	P																	
BDL 111	8103,2	Pr.																	
BDL 111	8103,4	P																	
BDL 111	8103,4	Pr.																	
BDL 111	8103,5	P																	
BDL 111	8103,5	Pr.																	
BDL 112	7502,1	P																	
BDL 112	7502,1	Pr.																	
BDL 112	7502,14	P																	
BDL 112	7502,14	Pr.																	
BDL 112	7502,4	P																	
BDL 112	7502,4	Pr.																	
BDL 112	7502,7	P																	
BDL 112	7502,7	Pr.																	
BDL 112	7502,9	P																	
BDL 112	7502,9	Pr.																	
BDL 112	7502,1	P																	0,01
BDL 112	7502,1	Pr.																	1,36
BDL 112	7502,4	P																	
BDL 112	7502,4	Pr.																	
BDL 112	7502,7	P																	
BDL 112	7502,7	Pr.																	
BDL 112	7502,8	P																	
BDL 112	7502,8	Pr.																	
BDL 112	7502,9	P																	
BDL 112	7502,9	Pr.																	
BDL 113	7683,4	P																	
BDL 113	7683,4	Pr.																	
BDL 113	7683,6	P																	

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
BDL 113	7683,6	Pr.																	
BDL 113	7684,3	P																	
BDL 113	7684,3	Pr.																	
BDL 113	7684,6	P																	
BDL 113	7684,6	Pr.																	
BDL 113	7684,7	P																	
BDL 113	7684,7	Pr.																	
BDL 113	7683,1	P																	
BDL 113	7683,1	Pr.																	
BDL 113	7683,11	P																	
BDL 113	7683,11	Pr.																	
BDL 113	7683,4	P																	
BDL 113	7683,4	Pr.																	
BDL 113	7684,1	P																	
BDL 113	7684,1	Pr.																	
BDL 113	7684,5	P																	
BDL 113	7684,5	Pr.																	
BDL 114	7741,3	P																	
BDL 114	7741,3	Pr.																	
BDL 114	7741,6	P																	0,44
BDL 114	7741,6	Pr.																	1,10
BDL 114	7742,1	P																	
BDL 114	7742,1	Pr.																	
BDL 114	7742,3	P																	
BDL 114	7742,3	Pr.																	
BDL 114	7742,5	P																	
BDL 114	7742,5	Pr.																	
BDL 115	8152,3	P	0,09																
BDL 115	8152,3	Pr.	1,13																
BDL 115	8152,4	P						0,18		0,24								0,06	
BDL 115	8152,4	Pr.						1,13		1,12								1,13	
BDL	8154,1	P																	

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
115																			
BDL 115	8154,1	Pr.																	
BDL 115	8155,2	P																	0,46
BDL 115	8155,2	Pr.																	1,11
BDL 115	8155,4	P																	
BDL 115	8155,4	Pr.																	
BDL 115	8152,3	P																	
BDL 115	8152,3	Pr.																	
BDL 115	8152,4	P																	
BDL 115	8152,4	Pr.																	
BDL 115	8154,1	P																	
BDL 115	8154,1	Pr.																	
BDL 115	8155,2	P																	
BDL 115	8155,2	Pr.																	
BDL 115	8155,4	P	0,06																
BDL 115	8155,4	Pr.	1,15																
BDL 116	7481,2	P																	
BDL 116	7481,2	Pr.																	
BDL 116	7481,7	P																	
BDL 116	7481,7	Pr.																	
BDL 116	7481,8	P																	
BDL 116	7481,8	Pr.																	
BDL 116	7482,2	P																	
BDL 116	7482,2	Pr.																	
BDL 116	7485,1	P																	
BDL 116	7485,1	Pr.																	
BDL 119	7732,2	P			0,41														
BDL 119	7732,2	Pr.			1,16														
BDL 119	7733,2	P			0,18														
BDL 119	7733,2	Pr.			1,20														
BDL 119	7734,1	P																	
BDL 119	7734,1	Pr.																	

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
BDL 119	7734,5	P			0,08														
BDL 119	7734,5	Pr.			1,26														
BDL 119	7734,7	P	0,07		0,00	0,08			0,64	0,39			0,64	0,39	0,53				
BDL 119	7734,7	Pr.	1,33		1,57	1,09			1,13	1,19			1,13	1,19	1,27				
BDL 120	7891,3	P																	
BDL 120	7891,3	Pr.																	
BDL 120	7892,4	P																	
BDL 120	7892,4	Pr.																	
BDL 120	7892,6	P																	
BDL 120	7892,6	Pr.																	
BDL 120	7893,2	P																	
BDL 120	7893,2	Pr.																	
BDL 120	7893,5	P	0,14				0,52	0,12	0,34	0,43	0,52	0,12	0,34	0,43		0,26		0,00	0,35
BDL 120	7893,5	Pr.	1,18				1,13	1,28	1,19	1,17	1,13	1,28	1,19	1,17		1,14		1,10	1,13
BDL 122	7513,1	P																	
BDL 122	7513,1	Pr.																	
BDL 122	7513,1	P														0,07			
BDL 122	7513,1	Pr.														1,09			
BDL 122	7513,14	P																	
BDL 122	7513,14	Pr.																	
BDL 122	7513,9	P																	
BDL 122	7513,9	Pr.																	
BDL 122	7514,3	P	0,25		0,51	0,47	0,11		0,27	0,28	0,20		0,07	0,07	0,01				0,33
BDL 122	7514,3	Pr.	1,29		1,18	1,14	1,35		1,36	1,34	1,17		1,17	1,15	1,25				1,21
BDL 122	7513,1	P	0,02	0,06	0,08		0,03	0,07	0,23	0,23	0,03	0,07	0,23	0,23	0,02				
BDL 122	7513,1	Pr.	1,18	1,13	1,13		1,25	1,20	1,12	1,12	1,25	1,20	1,12	1,12	1,17				
BDL 122	7513,14	P																	
BDL 122	7513,14	Pr.																	
BDL 122	7513,9	P	0,28					0,19				0,19							
BDL 122	7513,9	Pr.	1,14					1,12				1,12							
BDL 122	7514,3	P																	
BDL 122	7514,3	Pr.																	

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
BDL 122																			
BDL 123	8082,1	P	0,21				0,32		0,20	0,25	0,32		0,20	0,25					0,26
BDL 123	8082,1	Pr.	1,15				1,21		1,17	1,12	1,21		1,17	1,12					1,20
BDL 123	8082,3	P	0,00				0,00		0,02	0,05	0,00		0,02	0,05	0,01		0,00		0,00
BDL 123	8082,3	Pr.	1,23				1,32		1,25	1,23	1,32		1,25	1,23	1,26		1,16		1,18
BDL 123	8082,6	P	0,16				0,24				0,24							0,20	
BDL 123	8082,6	Pr.	1,13				1,11				1,11							1,12	
BDL 123	8083,2	P																	
BDL 123	8083,2	Pr.																	
BDL 123	8083,3	P	0,00	0,00	0,02		0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00		0,03	0,29	0,01		0,00
BDL 123	8083,3	Pr.	1,33	1,19	1,18		1,64	1,46	1,44		1,64	1,46	1,44		1,30	1,10	1,12		1,46
BDL 124	8482,1	P																	
BDL 124	8482,1	Pr.																	
BDL 125	7491,1	P	0,00				0,08	0,34		0,18	0,08	0,34		0,18					0,00
BDL 125	7491,1	Pr.	1,24				1,29	1,23		1,20	1,29	1,23		1,20					1,28
BDL 125	7491,5	P					0,58				0,58								0,23
BDL 125	7491,5	Pr.					1,13				1,13								1,12
BDL 125	7492,5	P																	
BDL 125	7492,5	Pr.																	
BDL 125	7494,1	P																0,00	
BDL 125	7494,1	Pr.																1,12	
BDL 125	7495,5	P																	
BDL 125	7495,5	Pr.																	
BDL 128	7711,3	P	0,26																
BDL 128	7711,3	Pr.	1,14																
BDL 128	8361,5	P				0,07				0,28				0,28				0,43	
BDL 128	8361,5	Pr.				1,10				1,14				1,14				1,12	
BDL 128	8362,2	P	0,00	0,05	0,16		0,02	0,23			0,25				0,11			0,06	0,01
BDL 128	8362,2	Pr.	1,21	1,10	1,12		1,24	1,14			1,16				1,18			1,08	1,15
BDL 128	8363,2	P																	
BDL 128	8363,2	Pr.																	
BDL 128	8365,2	P																	

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
BDL 128	8365,2	Pr.																	
BDL 129	7691,4	P																	
BDL 129	7691,4	Pr.																	
BDL 129	7691,6	P																	
BDL 129	7691,6	Pr.																	
BDL 129	7692,2	P	0,14															0,00	0,41
BDL 129	7692,2	Pr.	1,11															1,12	1,15
BDL 129	7692,6	P																	
BDL 129	7692,6	Pr.																	
BDL 129	7693,1	P																	
BDL 129	7693,1	Pr.																	
BDL 130	7663,1	P			0,03									0,53					
BDL 130	7663,1	Pr.			1,33									1,15					
BDL 130	7663,3	P																	
BDL 130	7663,3	Pr.																	
BDL 130	7663,6	P			0,00		0,73							0,26					
BDL 130	7663,6	Pr.			1,49		1,12							1,37					
BDL 130	7664,5	P	0,31		0,02		0,52				0,66			0,38					
BDL 130	7664,5	Pr.	1,17		1,51		1,28				1,22			1,40					
BDL 131	7461,2	P	0,00		0,20		0,00	0,13	0,01	0,05	0,00	0,13	0,01	0,05					0,08
BDL 131	7461,2	Pr.	1,21		1,13		1,41	1,13	1,34	1,26	1,41	1,13	1,34	1,26					1,53
BDL 131	7461,4	P	0,01				0,01	0,05	0,05	0,17	0,22	0,24	0,41	0,58	0,47	0,01	0,02	0,06	0,02
BDL 131	7461,4	Pr.	1,27				1,42	1,18	1,19	1,18	1,33	1,11	1,12	1,11	1,12	1,12	1,09	1,08	1,38
BDL 131	7462,2	P	0,00	0,04	0,08	0,05	0,35	0,03	0,11	0,00	0,35	0,03	0,11	0,00	0,36	0,25			0,33
BDL 131	7462,2	Pr.	1,37	1,21	1,15	1,11	1,43	1,50	1,39	1,31	1,43	1,50	1,39	1,31	1,14	1,17			1,40
BDL 131	7463,4	P	0,01						0,13	0,15			0,13	0,15				0,06	0,21
BDL 131	7463,4	Pr.	1,13						1,13	1,15			1,13	1,15				1,04	1,12
BDL 131	7464,5	P																0,05	
BDL 131	7464,5	Pr.																1,06	
BDL 132	7471,1	P	0,00	0,28	0,06	0,35		0,30	0,11	0,22		0,30	0,11	0,22		0,43	0,09	0,02	
BDL 132	7471,1	Pr.	1,27	1,22	1,20	1,12		1,50	1,33	1,23		1,50	1,33	1,23		1,23	1,12	1,14	
BDL	7471,4	P	0,07	0,31	0,14		0,56	0,28	0,09	0,07	0,56	0,28	0,09	0,07	0,19	0,08			

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
132																			
BDL 132	7471,4	Pr.	1,08	1,11	1,12		1,15	1,27	1,21	1,19	1,15	1,27	1,21	1,19	1,14	1,18			
BDL 132	7472,4	P																	
BDL 132	7472,4	Pr.																	
BDL 132	7473,1	P	0,02		0,06				0,03	0,13			0,03	0,13					
BDL 132	7473,1	Pr.	1,12		1,09				1,31	1,15			1,31	1,15					
BDL 132	7474,4	P																	
BDL 132	7474,4	Pr.																	
BDL 132	7471,1	P																	
BDL 132	7471,1	Pr.																	
BDL 132	7471,4	P																	
BDL 132	7471,4	Pr.																	
BDL 132	7472,4	P																	
BDL 132	7472,4	Pr.																	
BDL 132	7473,1	P																	
BDL 132	7473,1	Pr.																	
BDL 132	7475,4	P																	
BDL 132	7475,4	Pr.																	
BDL 133	8161,1	P			0,27														
BDL 133	8161,1	Pr.			1,34														
BDL 133	8161,2	P	0,07		0,00		0,03	0,01		0,28	0,05				0,02				0,46
BDL 133	8161,2	Pr.	1,29		1,52		1,48	1,16		1,13	1,39				1,58				1,12
BDL 133	8161,3	P			0,06					0,32				0,32					
BDL 133	8161,3	Pr.			1,47					1,13				1,13					
BDL 133	8161,4	P			0,15														
BDL 133	8161,4	Pr.			1,32														
BDL 133	8162,1	P			0,07														
BDL 133	8162,1	Pr.			1,26														
BDL 133	8162,3	P			0,03										0,31				
BDL 133	8162,3	Pr.			1,34										1,21				
BDL 133	8162,5	P	0,30		0,00		0,24		0,02	0,01	0,24		0,02	0,01	0,17				
BDL 133	8162,5	Pr.	1,15		1,53		1,27		1,17	1,22	1,27		1,17	1,22	1,45				

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
BDL 133	8163,2	P			0,27										0,59				
BDL 133	8163,2	Pr.			1,33										1,29				
BDL 134	7671,2	P																	
BDL 134	7671,2	Pr.																	
BDL 134	7672,1	P																	
BDL 134	7672,1	Pr.																	
BDL 134	7673,1	P																	
BDL 134	7673,1	Pr.																	
BDL 134	7673,2	P			0,21														
BDL 134	7673,2	Pr.			1,19														
BDL 135	7722,1	P			0,03										0,55				
BDL 135	7722,1	Pr.			1,35										1,12				
BDL 135	7723,1	P			0,01														
BDL 135	7723,1	Pr.			1,40														
BDL 135	7723,3	P			0,27														
BDL 135	7723,3	Pr.			1,17														
BDL 135	7723,8	P			0,11														
BDL 135	7723,8	Pr.			1,31														
BDL 135	7723,9	P	0,35		0,00		0,36	0,37	0,03	0,01	0,36	0,37	0,03	0,01	0,24				
BDL 135	7723,9	Pr.	1,18		1,57		1,41	1,17	1,15	1,17	1,41	1,17	1,15	1,17	1,54				
BDL 136	7751,4	P	0,36		0,01										0,55				
BDL 136	7751,4	Pr.	1,17		1,39										1,12				
BDL 136	7751,5	P			0,25														
BDL 136	7751,5	Pr.			1,16														
BDL 136	7751,8	P	0,06		0,01	0,33	0,18	0,06	0,17	0,20	0,18	0,06	0,17	0,20	0,24	0,36			0,06
BDL 136	7751,8	Pr.	1,31		1,65	1,16	1,25	1,33	1,28	1,33	1,25	1,33	1,28	1,33	1,24	1,13			1,11
BDL 136	7752,6	P			0,01										0,10				
BDL 136	7752,6	Pr.			1,44										1,36				
BDL 137	7701,2	P			0,00				0,30	0,29			0,30	0,29					
BDL 137	7701,2	Pr.			1,51				1,16	1,13			1,16	1,13					
BDL 137	7701,5	P			0,09														
BDL 137	7701,5	Pr.			1,34														

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
137																			
BDL 137	7701,6	P			0,06										0,67				
BDL 137	7701,6	Pr.			1,44										1,21				
BDL 137	7702,1	P																	
BDL 137	7702,1	Pr.																	
BDL 137	7703,2	P			0,06														
BDL 137	7703,2	Pr.			1,38														
BDL 137	7703,3	P			0,16														
BDL 137	7703,3	Pr.			1,20														
BDL 137	7703,7	P			0,13										0,46				
BDL 137	7703,7	Pr.			1,36										1,27				
BDL 139	8131,1	P																	
BDL 139	8131,1	Pr.																	
BDL 139	8131,2	P																	
BDL 139	8131,2	Pr.																	
BDL 139	8132,7	P																	
BDL 139	8132,7	Pr.																	
BDL 139	8133,2	P																	
BDL 139	8133,2	Pr.																	
BDL 141	8141,2	P			0,06										0,30				
BDL 141	8141,2	Pr.			1,39										1,21				
BDL 141	8142,2	P																	
BDL 141	8142,2	Pr.																	
BDL 142	8282,1	P			0,18														
BDL 142	8282,1	Pr.			1,34														
BDL 142	8283,1	P			0,11														
BDL 142	8283,1	Pr.			1,24														
BDL 142	8283,2	P			0,01		0,47				0,47				0,06				
BDL 142	8283,2	Pr.			1,45		1,18				1,18				1,42				
BDL 142	8284,1	P			0,02														
BDL 142	8284,1	Pr.			1,36														
BDL 142	8285,3	P			0,13														

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
BDL 142	8285,3	Pr.			1,23														
BDL 142	8285,5	P	0,49		0,06		0,51	0,57			0,51	0,57			0,24				
BDL 142	8285,5	Pr.	1,10		1,53		1,12	1,11			1,12	1,11			1,24				
BDL 143	8411,1	P	0,33		0,00		0,28	0,03	0,00	0,06	0,28	0,03	0,00	0,06	0,30	0,08			0,03
BDL 143	8411,1	Pr.	1,18		1,73		1,47	1,36	1,28	1,32	1,47	1,36	1,28	1,32	1,51	1,12			1,17
BDL 143	8411,5	P	0,37		0,04										0,64				
BDL 143	8411,5	Pr.	1,13		1,37										1,12				
BDL 143	8412,2	P			0,24														
BDL 143	8412,2	Pr.			1,20														
BDL 143	8412,4	P																	
BDL 143	8412,4	Pr.																	
BDL 143	8413,3	P			0,21														
BDL 143	8413,3	Pr.			1,18														
BDL 143	8414,4	P			0,35														
BDL 143	8414,4	Pr.			1,35														
BDL 143	8414,5	P			0,19														
BDL 143	8414,5	Pr.			1,19														
BDL 144	8384,1	P			0,05														
BDL 144	8384,1	Pr.			1,30														
BDL 144	8384,5	P			0,06														
BDL 144	8384,5	Pr.			1,29														
BDL 144	8385,1	P																	
BDL 144	8385,1	Pr.																	
BDL 145	8233,2	P			0,10														
BDL 145	8233,2	Pr.			1,26														
BDL 145	8233,3	P																	
BDL 145	8233,3	Pr.																	
BDL 145	8235,1	P			0,13														
BDL 145	8235,1	Pr.			1,24														
BDL 145	8235,3	P																	
BDL 145	8235,3	Pr.																	
BDL 145	8235,4	P																	

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
145																			
BDL 145	8235,4	Pr.																	
BDL 146	8241,1	P	0,42		0,13		0,32		0,60		0,32		0,60		0,15				
BDL 146	8241,1	Pr.	1,12		1,46		1,18		1,13		1,18		1,13		1,30				
BDL 146	8241,3	P			0,08														
BDL 146	8241,3	Pr.			1,28														
BDL 146	8243,2	P			0,06										0,55				
BDL 146	8243,2	Pr.			1,37										1,12				
BDL 146	8243,5	P			0,45														
BDL 146	8243,5	Pr.			1,21														
BDL 146	8244,4	P			0,07			0,33	0,27	0,42		0,33	0,27	0,42			0,21		
BDL 146	8244,4	Pr.			1,57			1,16	1,26	1,22		1,16	1,26	1,22			1,11		
BDL 146	8244,7	P			0,47														
BDL 146	8244,7	Pr.			1,10														
BDL 146	8245,2	P			0,02														
BDL 146	8245,2	Pr.			1,35														
BDL 146	8245,5	P	0,32		0,00		0,23		0,21	0,47	0,23		0,21	0,47	0,05				
BDL 146	8245,5	Pr.	1,16		1,51		1,21		1,13	1,11	1,21		1,13	1,11	1,45				
BDL 42	7771,1	P																	
BDL 42	7771,1	Pr.																	
BDL 42	7772,1	P																	
BDL 42	7772,1	Pr.																	
BDL 42	7772,7	P																	
BDL 42	7772,7	Pr.																	
BDL 42	7774,1	P																	
BDL 42	7774,1	Pr.																	
BDL 42	7774,2	P																	
BDL 42	7774,2	Pr.																	
BDL 42	7774,4	P			0,56														
BDL 42	7774,4	Pr.			1,11														
BDL 46	7833,3	P																	
BDL 46	7833,3	Pr.																	

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
BDL 46	7833,4	P	0,27														0,10		
BDL 46	7833,4	Pr.	1,10														1,08		
BDL 46	7833,5	P																	
BDL 46	7833,5	Pr.																	
BDL 46	7833,6	P																	
BDL 46	7833,6	Pr.																	
BDL 46	7834,1	P																	
BDL 46	7834,1	Pr.																	
BDL 46	7833,1	P																	
BDL 46	7833,1	Pr.																	
BDL 46	7833,3	P																	
BDL 46	7833,3	Pr.																	
BDL 46	7833,4	P																	
BDL 46	7833,4	Pr.																	
BDL 46	7833,5	P																	
BDL 46	7833,5	Pr.																	
BDL 46	7834,4	P																	0,19
BDL 46	7834,4	Pr.																	1,25
BDL 51	7291,1	P																	
BDL 51	7291,1	Pr.																	
BDL 51	8021,1	P																	
BDL 51	8021,1	Pr.																	
BDL 51	8022,4	P																	
BDL 51	8022,4	Pr.																	
BDL 51	8022,5	P																	
BDL 51	8022,5	Pr.																	
BDL 51	8024,4	P																	
BDL 51	8024,4	Pr.																	
BDL 51	8024,7	P																	
BDL 51	8024,7	Pr.																	
BDL 52	7861,1	P																	0,02
BDL	7861,1	Pr.																	1,08

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
52																			
BDL 52	7861,5	P																	
BDL 52	7861,5	Pr.																	
BDL 52	7863,2	P													0,17				
BDL 52	7863,2	Pr.													1,12				
BDL 52	7864,5	P							0,14	0,14			0,14	0,14					
BDL 52	7864,5	Pr.							1,16	1,12			1,16	1,12					
BDL 54	7781,1	P																	
BDL 54	7781,1	Pr.																	
BDL 54	7781,4	P																	
BDL 54	7781,4	Pr.																	
BDL 54	7784,3	P																	
BDL 54	7784,3	Pr.																	
BDL 54	7784,5	P																	
BDL 54	7784,5	Pr.																	
BDL 54	7785,4	P																	
BDL 54	7785,4	Pr.																	
BDL 54	7781,1	P																	
BDL 54	7781,1	Pr.																	
BDL 54	7781,4	P																	
BDL 54	7781,4	Pr.																	
BDL 54	7784,3	P																	
BDL 54	7784,3	Pr.																	
BDL 54	7785,4	P																	
BDL 54	7785,4	Pr.																	
BDL 54	7785,8	P																	
BDL 54	7785,8	Pr.																	
BDL 56	7181,2	P																	
BDL 56	7181,2	Pr.																	
BDL 56	8301,1	P	0,00	0,05	0,04	0,04	0,31	0,00	0,02	0,02	0,31	0,00	0,02	0,02	0,38	0,07	0,02		0,28
BDL 56	8301,1	Pr.	1,26	1,18	1,21	1,12	1,36	1,33	1,33	1,33	1,36	1,33	1,33	1,33	1,16	1,09	1,09		1,32
BDL 56	8301,3	P																	

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
BDL 56	8301,3	Pr.																	
BDL 56	8304,1	P	0,14		0,04		0,45		0,09	0,06	0,45		0,09	0,06	0,58		0,06	0,17	0,39
BDL 56	8304,1	Pr.	1,19		1,11		1,28		1,17	1,16	1,28		1,17	1,16	1,14		1,09	1,12	1,23
BDL 56	8305,1	P																	
BDL 56	8305,1	Pr.																	
BDL 56	8301,1	P																	
BDL 56	8301,1	Pr.																	
BDL 56	8301,2	P																	0,39
BDL 56	8301,2	Pr.																	1,24
BDL 56	8301,3	P																	
BDL 56	8301,3	Pr.																	
BDL 56	8303,1	P																	0,43
BDL 56	8303,1	Pr.																	1,11
BDL 56	8303,2	P																	
BDL 56	∅	Pr.																	
BDL 59	7792,1	P	0,00	0,05		0,14	0,23	0,06		0,04	0,23	0,06		0,04	0,08	0,00		0,06	0,09
BDL 59	7792,1	Pr.	1,21	1,15		1,10	1,25	1,24		1,24	1,25	1,24		1,24	1,16	1,17		1,13	1,16
BDL 59	7792,2	P															0,05	0,20	
BDL 59	7792,2	Pr.															1,09	1,12	
BDL 59	7792,3	P	0,21	0,16	0,03	0,05	0,57	0,03	0,12	0,10	0,57	0,03	0,12	0,10	0,58	0,07	0,09	0,00	0,62
BDL 59	7792,3	Pr.	1,12	1,13	1,17	1,11	1,22	1,23	1,18	1,13	1,22	1,23	1,18	1,13	1,14	1,09	1,12	1,20	1,13
BDL 59	7793,3	P															0,07	0,09	
BDL 59	7793,3	Pr.															1,05	1,07	
BDL 59	7794,1	P																	
BDL 59	7794,1	Pr.																	
BDL 60	8011,4	P						0,47	0,40	0,42		0,47	0,40	0,42			0,27	0,00	
BDL 60	8011,4	Pr.						1,18	1,21	1,19		1,18	1,21	1,19			1,11	1,11	
BDL 60	8011,7	P																	
BDL 60	8011,7	Pr.																	
BDL 60	8013,4	P																	
BDL 60	8013,4	Pr.																	
BDL 60	8013,6	P																	

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
60																			
BDL 60	8013,6	Pr.																	
BDL 60	8014,5	P																	
BDL 60	8014,5	Pr.																	
BDL 60	8013,6	P																	
BDL 60	8013,6	Pr.																	
BDL 60	8014,2	P																	0,00
BDL 60	8014,2	Pr.																	1,20
BDL 60	8014,7	P																	0,48
BDL 60	8014,7	Pr.																	1,27
BDL 60	8014,8	P																	
BDL 60	8014,8	Pr.																	
BDL 65	7824,1	P																	
BDL 65	7824,1	Pr.																	
BDL 65	7825,2	P													0,36				
BDL 65	7825,2	Pr.													1,27				
BDL 65	8473,2	P																	
BDL 65	8473,2	Pr.																	
BDL 65	8474,1	P			0,03		0,50				0,50				0,30				
BDL 65	8474,1	Pr.			1,32		1,14				1,14				1,36				
BDL 67	7901,5	P																	
BDL 67	7901,5	Pr.																	
BDL 67	7902,3	P																	
BDL 67	7902,3	Pr.																	
BDL 67	7902,7	P																	
BDL 67	7902,7	Pr.																	
BDL 67	7903,3	P																	
BDL 67	7903,3	Pr.																	
BDL 67	7903,5	P																	
BDL 67	7903,5	Pr.																	
BDL 68	7761,3	P																	
BDL 68	7761,3	Pr.																	

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
BDL 68	7761,8	P																	
BDL 68	7761,8	Pr.																	
BDL 68	7761,9	P																	
BDL 68	7761,9	Pr.																	
BDL 68	7763,2	P																	
BDL 68	7763,2	Pr.																	
BDL 68	7764,1	P																	
BDL 68	7764,1	Pr.																	
BDL 78	7911,11	P			0,03										0,55				
BDL 78	7911,11	Pr.			1,34										1,12				
BDL 78	7911,8	P			0,31														
BDL 78	7911,8	Pr.			1,20														
BDL 78	7911,9	P																	
BDL 78	7911,9	Pr.																	
BDL 78	7912,6	P			0,11														
BDL 78	7912,6	Pr.			1,23														
BDL 78	7913,11	P			0,48														
BDL 78	7913,11	Pr.			1,11														
BDL 78	7913,3	P			0,00		0,47				0,47				0,19				
BDL 78	7913,3	Pr.			1,46		1,13				1,13				1,33				
BDL 78	7913,6	P																	
BDL 78	7913,6	Pr.																	
BDL 78	7913,8	P			0,39														
BDL 78	7913,8	Pr.			1,12														
BDL 78	7913,9	P			0,01														
BDL 78	7913,9	Pr.			1,38														
BDL 82	7801,1	P																	
BDL 82	7801,1	Pr.																	
BDL 82	7801,3	P																	
BDL 82	7801,3	Pr.																	
BDL 82	7802,2	P																	
BDL 82	7802,2	Pr.																	

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
82																			
BDL 82	7802,3	P																	
BDL 82	7802,3	Pr.																	
BDL 82	7803,9	P	0,14	0,02	0,01	0,02	0,00	0,13	0,01	0,08	0,00	0,13	0,01	0,08	0,01	0,02	0,00	0,12	0,00
BDL 82	7803,9	Pr.	1,29	1,13	1,16	1,14	1,48	1,25	1,38	1,30	1,48	1,25	1,38	1,30	1,26	1,14	1,11	1,12	1,34
BDL 89	7812,2	P																0,07	
BDL 89	7812,2	Pr.																1,05	
BDL 89	7812,5	P																	
BDL 89	7812,5	Pr.																	
BDL 89	7814,1	P	0,19																
BDL 89	7814,1	Pr.	1,20																
BDL 89	7814,4	P																	
BDL 89	7814,4	Pr.																	
BDL 89	7814,5	P																	
BDL 89	7814,5	Pr.																	

Tabla 25, "P" = valor P; "Pr" = cociente entre los promedios de evento y control. Hay que señalar que cuando el cociente de los promedios es mayor que "1" el efecto de la expresión exógena del gen es un incremento del rasgo deseado, "Par" = Parámetro de acuerdo con los parámetros enumerados en la Tabla 24 anterior; "Ev" = evento.

Tabla 26

Gen	Ev.	Par.	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
BDL 95	7841,5	P				0,71			0,78					0,70			0,66		
BDL 95	7841,5	Pr.				1,23			1,18					1,19			1,31		
BDL 95	7842,12	P				0,67		0,75	0,19							0,70	0,32		
BDL 95	7842,12	Pr.				1,11		1,18	2,66							1,28	2,84		
BDL 95	7842,2	P				0,78			0,47								0,41		
BDL 95	7842,2	Pr.				1,11			55,83								28,99		
BDL 95	7842,8	P					0,56	0,56	0,46						0,35	0,41	0,46		
BDL 95	7842,8	Pr.					1,36	1,29	3,76						1,56	1,57	4,32		
BDL 95	7843,4	P				0,03	0,56		0,54					0,00	0,53	0,16	0,48		0,54
BDL 95	7843,4	Pr.				2,00	2,47		1,84					1,84	2,94	1,23	2,18		2,06
BDL 100	7871,2	P												0,72					0,47

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par.	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
BDL 100	7871,2	Pr.												1,17				1,28	
BDL 100	7872,2	P				0,00			0,82					0,00	0,13	0,75	0,57		0,36
BDL 100	7872,2	Pr.				1,63			1,13					1,53	1,18	1,18	1,35		1,11
BDL 100	7872,3	P	0,47		0,39				0,76	0,24							0,76		
BDL 100	7872,3	Pr.	1,26		1,11				2,13	1,10							2,04		
BDL 100	7873,3	P						0,24	0,19							0,22	0,15		0,59
BDL 100	7873,3	Pr.						1,13	6,24							1,17	5,93		1,16
BDL 100	7873,4	P		0,33			0,54		0,55						0,55		0,57		0,31
BDL 100	7873,4	Pr.		1,17			1,87		2,80						2,06		2,78		2,02
BDL 106	7881,1	P				0,03			0,57					0,03			0,60	0,00	
BDL 106	7881,1	Pr.				1,21			1,33					1,21			1,34	1,32	
BDL 106	7881,4	P				0,44		0,63	0,35					0,27	0,27	0,21	0,01		0,34
BDL 106	7881,4	Pr.				5,50		1,25	1,74					2,42	1,63	1,81	3,39		1,20
BDL 106	7882,6	P				0,48			0,31					0,61	0,70		0,27		0,06
BDL 106	7882,6	Pr.				1,37			1,61					1,35	1,14		1,98		1,49
BDL 106	7884,1	P				0,22	0,46	0,65						0,31	0,47	0,00			0,60
BDL 106	7884,1	Pr.				1,87	2,65	1,11						1,67	3,05	1,34			1,56
BDL 106	7884,9	P				0,50	0,41	0,67	0,22					0,48	0,38	0,57	0,05		0,44
BDL 106	7884,9	Pr.				2,57	1,15	1,20	1,76					1,86	1,47	1,56	2,59		1,13
BDL 106	7881,1	P				0,59	0,66		0,47					0,58	0,61	0,23	0,38		
BDL 106	7881,1	Pr.				4,09	1,25		1,56					4,38	1,29	1,32	1,69		
BDL 106	7881,2	P	0,22			0,01			0,30					0,17			0,22	0,58	
BDL 106	7881,2	Pr.	1,16			5,82			1,38					6,35			1,42	2,85	
BDL 106	7882,2	P	0,10			0,57		0,46	0,59		0,03			0,65		0,54	0,66	0,15	
BDL 106	7882,2	Pr.	1,32			1,75		1,84	1,58		1,05			1,55		1,82	1,64	1,68	
BDL 106	7882,4	P						0,77	0,60						0,67	0,66	0,46		
BDL 106	7882,4	Pr.						1,23	1,49						1,13	1,42	1,71		
BDL 106	7882,5	P							0,21							0,75	0,21	0,84	

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par.	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
BDL 106	7882,5	Pr.							1,53							1,19	1,58	1,19	
BDL 108	8122,2	P				0,08	0,39							0,17	0,30	0,48			0,45
BDL 108	8122,2	Pr.				2,85	1,94							2,11	3,00	1,38			2,73
BDL 108	8122,3	P				0,46		0,00						0,50	0,08	0,04			0,09
BDL 108	8122,3	Pr.				2,61		1,46						1,58	1,20	1,50			1,18
BDL 108	8123,1	P				0,20								0,00		0,22		0,41	
BDL 108	8123,1	Pr.				1,96								1,91		1,21		1,59	
BDL 108	8123,2	P				0,30	0,42							0,20	0,38	0,62			0,53
BDL 108	8123,2	Pr.				3,17	3,64							2,36	4,07	1,26			2,81
BDL 108	8123,5	P				0,42	0,31	0,27	0,04					0,36	0,35	0,31	0,14		
BDL 108	8123,5	Pr.				2,96	1,12	1,42	3,68					1,86	1,38	1,68	4,42		
BDL 108	8121,1	P				0,12	0,63	0,26	0,73					0,10	0,51	0,00	0,18	0,64	
BDL 108	8121,1	Pr.				4,75	1,33	1,54	1,19					6,16	1,59	2,33	2,15	1,28	
BDL 108	8121,3	P				0,65	0,35	0,44						0,68	0,62	0,35	0,50		
BDL 108	8121,3	Pr.				2,11	1,24	1,36						1,88	1,12	1,61	1,34		
BDL 108	8121,4	P				0,44	0,48							0,44	0,13	0,14	0,74		
BDL 108	8121,4	Pr.				2,83	1,17							3,66	1,46	1,32	1,14		
BDL 108	8122,7	P				0,67			0,28					0,63	0,84	0,30	0,05	0,85	
BDL 108	8122,7	Pr.				4,00			1,52					5,66	1,22	1,64	2,58	1,56	
BDL 108	8123,7	P				0,71	0,38	0,06	0,32					0,72	0,23	0,00	0,08		
BDL 108	8123,7	Pr.				2,15	1,54	1,18	1,32					2,11	1,77	1,48	1,67		
BDL 110	8092,1	P																0,00	
BDL 110	8092,1	Pr.																1,28	
BDL 110	8092,2	P					0,52	0,24	0,44					0,22	0,37	0,26	0,45	0,27	
BDL 110	8092,2	Pr.					1,35	1,76	1,62					1,14	1,48	1,96	1,92	1,22	
BDL 110	8092,5	P	0,23	0,01	0,01				0,37										0,09
BDL 110	8092,5	Pr.	1,16	1,15	1,17				1,28										1,32
BDL 110	8095,2	P																	0,00

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par.	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
BDL 110	8095,2	Pr.																1,24	
BDL 111	8102,7	P				0,00	0,25							0,01	0,02	0,30			0,25
BDL 111	8102,7	Pr.				1,62	1,11							1,57	1,42	1,12			1,26
BDL 111	8103,1	P				0,41	0,06	0,08	0,32					0,36	0,29	0,30	0,12		0,32
BDL 111	8103,1	Pr.				2,15	1,27	1,11	2,44					1,85	1,76	1,40	3,38		1,37
BDL 111	8103,2	P				0,00								0,00	0,13				
BDL 111	8103,2	Pr.				1,79								1,66	1,20				
BDL 111	8103,4	P				0,41	0,12	0,00	0,50					0,28	0,22	0,00	0,40		
BDL 111	8103,4	Pr.				1,87	1,44	1,52	2,06					1,58	1,72	1,87	2,83		
BDL 111	8103,5	P				0,06	0,71	0,34	0,00					0,12	0,35	0,18	0,00	0,73	
BDL 111	8103,5	Pr.				1,77	1,11	1,21	4,29					1,66	1,25	1,37	5,17	1,14	
BDL 111	8102,7	P				0,46	0,20	0,63	0,13					0,44	0,28	0,34	0,06		
BDL 111	8102,7	Pr.				2,95	1,35	1,15	1,51					3,43	1,57	1,37	1,68		
BDL 111	8103,1	P	0,57	0,65	0,26	0,27								0,24				0,32	
BDL 111	8103,1	Pr.	1,12	1,11	1,13	2,19								2,28				1,58	
BDL 111	8103,2	P				0,96		0,51	0,20					0,88	0,68	0,34	0,33		
BDL 111	8103,2	Pr.				1,35		1,16	1,53					2,21	1,21	1,47	2,07		
BDL 111	8103,4	P				0,90								0,79				0,83	
BDL 111	8103,4	Pr.				1,51								2,47				1,42	
BDL 111	8103,5	P				0,88		0,58						0,82		0,53	0,69		
BDL 111	8103,5	Pr.				2,94		1,19						4,21		1,46	1,37		
BDL 112	7502,1	P					0,69		0,43						0,44		0,37		0,32
BDL 112	7502,1	Pr.					1,20		2,10						1,46		2,26		1,63
BDL 112	7502,14	P				0,52	0,50	0,57						0,50	0,48	0,47			0,46
BDL 112	7502,14	Pr.				1,67	3,18	1,34						1,44	3,42	1,55			2,15
BDL 112	7502,4	P				0,19			0,75					0,11	0,29	0,02	0,44	0,65	0,51
BDL 112	7502,4	Pr.				2,17			1,18					2,04	1,46	1,24	1,48	1,24	1,36
BDL 112	7502,7	P				0,19		0,19						0,07	0,18	0,00	0,84		0,25

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par.	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
BDL 112	7502,7	Pr.				1,88		1,36						1,70	1,36	1,44	1,13		1,52
BDL 112	7502,9	P							0,30					0,62	0,62	0,26	0,16		0,50
BDL 112	7502,9	Pr.							2,12					1,23	1,22	1,20	2,29		1,30
BDL 112	7502,1	P							0,42	0,41							0,41		0,61
BDL 112	7502,1	Pr.							1,29	1,15							1,27		1,40
BDL 112	7502,4	P	0,58			0,55								0,48				0,18	
BDL 112	7502,4	Pr.	1,19			1,84								2,27				2,78	
BDL 112	7502,7	P				0,64			0,82					0,61		0,71	0,72		
BDL 112	7502,7	Pr.				3,88			1,14					4,86		1,19	1,36		
BDL 112	7502,8	P				0,54		0,67	0,57					0,51		0,54	0,60		
BDL 112	7502,8	Pr.				2,50		1,20	1,40					2,33		1,41	1,52		
BDL 112	7502,9	P				0,07			0,79					0,07		0,48	0,62	0,56	
BDL 112	7502,9	Pr.				4,27			1,11					4,93		1,12	1,23	1,22	
BDL 113	7683,4	P				0,13		0,00	0,69					0,18	0,35	0,10	0,58	0,24	
BDL 113	7683,4	Pr.				1,51		1,24	1,63					1,76	1,13	1,53	2,03	1,60	
BDL 113	7683,6	P				0,06	0,10	0,09	0,20					0,01	0,04	0,00	0,02		0,00
BDL 113	7683,6	Pr.				2,09	1,38	1,25	1,80					1,93	2,10	1,67	2,80		1,59
BDL 113	7684,3	P				0,24	0,56	0,38	0,62					0,05	0,53	0,35	0,52		
BDL 113	7684,3	Pr.				1,45	1,34	1,50	1,69					1,42	1,61	1,90	2,95		
BDL 113	7684,6	P				0,12		0,04	0,54					0,17		0,00	0,51		
BDL 113	7684,6	Pr.				1,81		1,29	3,37					1,68		1,63	4,60		
BDL 113	7684,7	P						0,57	0,90							0,31	0,70		
BDL 113	7684,7	Pr.						1,15	1,19							1,59	1,88		
BDL 113	7683,1	P				0,18	0,41	0,63	0,16					0,23	0,33	0,06	0,11		0,61
BDL 113	7683,1	Pr.				4,92	1,37	1,11	1,68					6,15	1,83	1,32	2,01		2,09
BDL 113	7683,11	P					0,00								0,00				
BDL 113	7683,11	Pr.					3,76								4,28				
BDL 113	7683,4	P					0,29		0,47					0,94	0,36		0,47		0,78

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par.	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
BDL 113	7683,4	Pr.					1,28		1,32					1,72	1,56		1,62		1,47
BDL 113	7684,1	P																	
BDL 113	7684,1	Pr.																	
BDL 113	7684,5	P					0,00								0,00				
BDL 113	7684,5	Pr.					3,01								4,03				
BDL 114	7741,3	P					0,41	0,12	0,30						0,40	0,00	0,23		0,53
BDL 114	7741,3	Pr.					3,87	1,92	3,64						4,33	2,51	4,94		2,47
BDL 114	7741,6	P				0,36	0,50		0,01					0,58	0,49		0,06		0,43
BDL 114	7741,6	Pr.				1,37	12,18		2,96					1,16	4,68		2,99		3,15
BDL 114	7742,1	P				0,36								0,30	0,30				0,50
BDL 114	7742,1	Pr.				1,56								1,35	1,21				1,29
BDL 114	7742,3	P				0,39	0,23	0,59						0,29	0,00	0,02			0,10
BDL 114	7742,3	Pr.				4,22	1,73	1,24						2,30	2,68	1,73			1,70
BDL 114	7742,5	P				0,16	0,25	0,18	0,63					0,00	0,25	0,13	0,27		0,53
BDL 114	7742,5	Pr.				3,66	1,85	1,38	1,33					2,39	2,81	2,01	2,23		1,62
BDL 115	8152,3	P				0,05								0,34					
BDL 115	8152,3	Pr.				1,28								1,14					
BDL 115	8152,4	P	0,13					0,71	0,08							0,79	0,08	0,39	
BDL 115	8152,4	Pr.	1,16					1,15	2,16							1,11	2,20	1,39	
BDL 115	8154,1	P							0,40								0,36		0,60
BDL 115	8154,1	Pr.							2,40								2,88		1,11
BDL 115	8155,2	P					0,51		0,26						0,52		0,26		0,54
BDL 115	8155,2	Pr.					2,70		2,22						3,09		2,28		2,66
BDL 115	8155,4	P				0,36	0,48							0,25	0,47				0,53
BDL 115	8155,4	Pr.				2,31	1,84							1,88	2,66				2,33
BDL 115	8152,3	P				0,43	0,35	0,01	0,36					0,37	0,20	0,24	0,09		
BDL 115	8152,3	Pr.				1,84	1,26	1,22	1,88					1,96	1,41	1,51	2,04		
BDL 115	8152,4	P				0,25	0,59							0,25	0,05	0,15	0,41		

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par.	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
BDL 115	8152,4	Pr.				2,58	1,13							2,87	1,61	1,42	1,30		
BDL 115	8154,1	P				0,02		0,27						0,16		0,12			
BDL 115	8154,1	Pr.				5,48		1,16						5,83		1,36			
BDL 115	8155,2	P				0,05		0,24						0,20		0,13	0,80	0,85	
BDL 115	8155,2	Pr.				3,97		1,36						3,99		1,33	1,13	1,25	
BDL 115	8155,4	P	0,52			0,01	0,43	0,09	0,28					0,02		0,27	0,23	0,02	
BDL 115	8155,4	Pr.	1,11			4,85	1,20	1,64	1,42					5,32		1,71	1,86	2,24	
BDL 116	7481,2	P				0,10								0,07			0,54	0,52	0,49
BDL 116	7481,2	Pr.				1,59								1,64			1,46	1,16	1,14
BDL 116	7481,7	P				0,06			0,51					0,14		0,23	0,41	0,64	
BDL 116	7481,7	Pr.				1,17			1,40					1,19		1,13	1,52	1,22	
BDL 116	7481,8	P				0,75	0,51		0,32					0,68	0,50		0,18		0,54
BDL 116	7481,8	Pr.				1,15	5,20		1,78					1,17	3,75		2,05		1,87
BDL 116	7482,2	P				0,19			0,22					0,03			0,16	0,35	
BDL 116	7482,2	Pr.				1,14			2,69					1,25			2,82	1,46	
BDL 116	7485,1	P				0,00	0,52		0,40					0,02	0,29	0,07	0,37		0,59
BDL 116	7485,1	Pr.				2,16	1,17		2,56					1,92	1,62	1,27	3,36		1,26
BDL 119	7732,2	P				0,05	0,61	0,00	0,74					0,00	0,39	0,00	0,62	0,34	
BDL 119	7732,2	Pr.				2,07	1,16	1,63	1,36					1,83	1,47	2,00	1,76	1,30	
BDL 119	7733,2	P				0,42	0,46	0,11						0,15	0,07	0,01	0,73	0,32	0,10
BDL 119	7733,2	Pr.				1,27	1,15	1,19						1,37	1,38	1,39	1,19	1,10	1,13
BDL 119	7734,1	P				0,23								0,07	0,01	0,01			0,00
BDL 119	7734,1	Pr.				1,50								1,66	1,42	1,56			1,30
BDL 119	7734,5	P				0,37	0,26	0,62	0,69					0,00	0,15	0,42	0,41	0,15	
BDL 119	7734,5	Pr.				1,12	1,37	1,16	1,16					1,30	1,58	1,39	1,34	1,21	
BDL 119	7734,7	P	0,62	0,60	0,25			0,58	0,54					0,75		0,62	0,56	0,52	
BDL 119	7734,7	Pr.	1,11	1,12	1,15			1,41	2,92					1,16		1,18	2,29	1,90	
BDL 120	7891,3	P				0,09			0,01					0,00		0,01	0,01	0,43	

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par.	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
BDL 120	7891,3	Pr.				3,31			2,89					2,31		1,30	3,58	1,24	
BDL 120	7892,4	P				0,23			0,62					0,12	0,31		0,53		0,48
BDL 120	7892,4	Pr.				1,53			1,55					1,46	1,36		1,94		1,14
BDL 120	7892,6	P					0,39		0,60						0,59		0,58	0,69	
BDL 120	7892,6	Pr.					1,20		2,56						1,13		2,70	1,10	
BDL 120	7893,2	P				0,38	0,30		0,91					0,43	0,14		0,77		0,13
BDL 120	7893,2	Pr.				1,48	4,78		1,11					1,26	5,34		1,42		3,99
BDL 120	7893,5	P	0,02	0,46					0,60		0,08						0,61		
BDL 120	7893,5	Pr.	1,18	1,10					2,19		1,04						2,28		
BDL 122	7513,1	P						0,74	0,47							0,69	0,46		
BDL 122	7513,1	Pr.						1,20	2,77							1,22	2,94		
BDL 122	7513,1	P				0,49			0,80					0,35			0,83	0,35	
BDL 122	7513,1	Pr.				1,56			1,40					1,57			1,31	1,70	
BDL 122	7513,14	P				0,17			0,19					0,17	0,53		0,06		0,59
BDL 122	7513,14	Pr.				1,87			1,82					1,82	1,26		2,38		1,27
BDL 122	7513,9	P				0,01	0,46		0,52					0,00	0,44		0,52		0,45
BDL 122	7513,9	Pr.				1,79	2,20		4,29					1,57	3,19		4,97		3,28
BDL 122	7514,3	P		0,22	0,15		0,58		0,57	0,01		0,04			0,61		0,65		0,55
BDL 122	7514,3	Pr.		1,29	1,23		1,68		2,10	1,12		1,03			2,11		1,63		2,58
BDL 122	7513,1	P	0,17	0,09		0,01								0,02				0,12	
BDL 122	7513,1	Pr.	1,18	1,11		4,25								4,24				1,89	
BDL 122	7513,14	P	0,50			0,88								0,74				0,54	
BDL 122	7513,14	Pr.	1,13			1,32								1,97				3,21	
BDL 122	7513,9	P	0,31			0,35			0,86					0,31				0,37	
BDL 122	7513,9	Pr.	1,19			4,01			1,34					3,97				2,13	
BDL 122	7514,3	P				0,32								0,28				0,81	
BDL 122	7514,3	Pr.				2,36								2,69				1,22	
BDL 123	8082,1	P		0,31	0,09				0,06								0,11		0,17

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par.	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
BDL 123	8082,1	Pr.		1,16	1,12				2,47								2,20		1,37
BDL 123	8082,3	P		0,14	0,48				0,26	0,05		0,04					0,40		
BDL 123	8082,3	Pr.		1,11	1,12				2,00	1,13		1,02					1,85		
BDL 123	8082,6	P																	
BDL 123	8082,6	Pr.																	
BDL 123	8083,2	P				0,64	0,53		0,81					0,56	0,55		0,86		0,62
BDL 123	8083,2	Pr.				1,39	3,11		1,43					1,36	3,02		1,27		1,69
BDL 123	8083,3	P	0,07	0,00					0,39	0,01							0,28		
BDL 123	8083,3	Pr.	1,37	1,32					1,77	1,15							1,75		
BDL 124	8482,1	P				0,38		0,31						0,22	0,00	0,29	0,35	0,00	
BDL 124	8482,1	Pr.				2,25		1,48						1,85	1,50	2,12	1,54	1,20	
BDL 125	7491,1	P	0,21		0,06				0,20								0,15		
BDL 125	7491,1	Pr.	1,23		1,18				5,44								4,43		
BDL 125	7491,5	P							0,51								0,55		
BDL 125	7491,5	Pr.							1,67								1,56		
BDL 125	7492,5	P				0,72								0,66				0,65	
BDL 125	7492,5	Pr.				1,11								1,16				1,38	
BDL 125	7494,1	P				0,46		0,78	0,44					0,43		0,77	0,41		
BDL 125	7494,1	Pr.				1,41		1,12	2,37					1,24		1,13	2,53		
BDL 125	7495,5	P				0,36			0,43					0,02			0,31	0,23	
BDL 125	7495,5	Pr.				1,22			2,05					1,34			2,25	1,54	
BDL 128	7711,3	P				0,11	0,72	0,46	0,66					0,14	0,73	0,32	0,63		
BDL 128	7711,3	Pr.				1,44	1,14	1,14	1,90					1,32	1,18	1,18	2,03		
BDL 128	8361,5	P				0,36	0,45							0,61	0,50				0,59
BDL 128	8361,5	Pr.				1,24	1,80							1,14	2,15				2,09
BDL 128	8362,2	P	0,10						0,09								0,10		
BDL 128	8362,2	Pr.	1,12						2,14								2,13		
BDL 128	8363,2	P				0,42			0,54					0,36	0,00		0,50		0,29

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par.	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
BDL 128	8363,2	Pr.				1,88			3,77					1,84	1,54		5,39		1,30
BDL 128	8365,2	P				0,41	0,47							0,42	0,47				0,48
BDL 128	8365,2	Pr.				1,22	2,55							1,27	3,56				3,78
BDL 129	7691,4	P							0,39						0,65	0,00	0,16		
BDL 129	7691,4	Pr.							1,53						1,17	1,61	2,61		
BDL 129	7691,6	P				0,20			0,64					0,04	0,21	0,52	0,38		0,23
BDL 129	7691,6	Pr.				1,91			1,48					1,92	1,75	1,37	2,87		1,38
BDL 129	7692,2	P					0,50								0,51				0,53
BDL 129	7692,2	Pr.					3,65								3,67				3,01
BDL 129	7692,6	P					0,23		0,26								0,22	0,08	
BDL 129	7692,6	Pr.					1,12		2,87								3,20	1,17	
BDL 129	7693,1	P				0,35	0,47	0,00	0,21					0,27	0,45	0,00	0,23		0,52
BDL 129	7693,1	Pr.				1,50	4,24	1,22	3,15					1,43	4,30	1,44	4,15		3,58
BDL 130	7663,1	P										0,03						0,48	
BDL 130	7663,1	Pr.										1,02						1,14	
BDL 130	7663,3	P				0,39	0,39	0,33						0,13	0,23	0,24	0,59		0,06
BDL 130	7663,3	Pr.				4,91	1,51	1,44						2,34	2,51	2,32	1,93		1,37
BDL 130	7663,6	P						0,36	0,48							0,48	0,41	0,40	
BDL 130	7663,6	Pr.						1,30	2,15							1,30	2,24	1,28	
BDL 130	7664,5	P						0,76								0,76		0,09	
BDL 130	7664,5	Pr.						1,17								1,20		1,06	
BDL 131	7461,2	P	0,02	0,01	0,14				0,54	0,06							0,67		0,01
BDL 131	7461,2	Pr.	1,18	1,33	1,22				1,74	1,10							1,48		1,28
BDL 131	7461,4	P	0,14	0,06	0,24					0,09	0,00	0,00	0,06						
BDL 131	7461,4	Pr.	1,12	1,14	1,11					1,08	1,05	1,04	1,02						
BDL 131	7462,2	P	0,00	0,08	0,01				0,66	0,30	0,04	0,08					0,70		
BDL 131	7462,2	Pr.	1,38	1,43	1,25				3,42	1,12	1,07	1,05					2,57		
BDL 131	7463,4	P			0,19				0,85			0,02					0,93		

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par.	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
BDL 131	7463,4	Pr.			1,11				1,25			1,03					1,10		
BDL 131	7464,5	P					0,01	0,01	0,16						0,21	0,49	0,04		0,38
BDL 131	7464,5	Pr.					1,26	1,19	2,44						1,29	1,17	2,63		1,15
BDL 132	7471,1	P	0,07	0,09		0,43			0,67								0,71	0,13	
BDL 132	7471,1	Pr.	1,31	1,21		1,17			1,76								1,57	1,41	
BDL 132	7471,4	P	0,51	0,07	0,09				0,26								0,27	0,76	0,68
BDL 132	7471,4	Pr.	1,11	1,20	1,13				3,00								2,64	1,19	1,20
BDL 132	7472,4	P				0,48			0,94					0,48			0,96		
BDL 132	7472,4	Pr.				1,33			1,18					1,27			1,12		
BDL 132	7473,1	P		0,00	0,39		0,48					0,03			0,51				0,40
BDL 132	7473,1	Pr.		1,27	1,15		1,70					1,02			2,06				2,66
BDL 132	7474,4	P				0,20	0,51	0,09						0,17	0,51	0,02	0,81	0,89	0,56
BDL 132	7474,4	Pr.				1,74	1,92	1,20						1,74	2,41	1,29	1,16	1,15	1,87
BDL 132	7471,1	P				0,01								0,00	0,75			0,32	
BDL 132	7471,1	Pr.				4,76								6,37	1,12			2,49	
BDL 132	7471,4	P				0,08		0,20	0,61					0,11		0,00	0,18	0,16	
BDL 132	7471,4	Pr.				5,36		1,12	1,16					6,92		1,49	1,50	3,72	
BDL 132	7472,4	P				0,05								0,04			0,54		
BDL 132	7472,4	Pr.				3,38								3,70			1,22		
BDL 132	7473,1	P													0,83	0,36	0,62	0,38	
BDL 132	7473,1	Pr.													1,13	1,27	1,16	1,35	
BDL 132	7475,4	P							0,13						0,72	0,76	0,11		0,51
BDL 132	7475,4	Pr.							1,64						1,22	1,11	1,73		1,40
BDL 133	8161,1	P				0,34	0,26	0,47						0,39	0,27	0,02			0,30
BDL 133	8161,1	Pr.				1,55	1,14	1,28						1,41	1,32	1,35			1,18
BDL 133	8161,2	P	0,04	0,05	0,02		0,31	0,46	0,01	0,16					0,46		0,01		0,35
BDL 133	8161,2	Pr.	1,08	1,17	1,13		1,31	1,20	2,62	1,16					1,18		2,22		1,20
BDL 133	8161,3	P		0,17	0,00	0,48	0,09		0,71					0,39			0,82	0,36	

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par.	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
BDL 133	8161,3	Pr.		1,11	1,20	7,63	1,19		1,59					2,03			1,29	2,21	
BDL 133	8161,4	P				0,02	0,53	0,00						0,00	0,04	0,01		0,20	
BDL 133	8161,4	Pr.				1,26	1,15	1,46						1,47	1,28	1,60		1,61	
BDL 133	8162,1	P					0,27	0,01	0,54					0,06	0,10	0,00	0,39	0,13	0,34
BDL 133	8162,1	Pr.					1,15	1,41	1,27					1,17	1,37	1,59	1,50	1,16	1,11
BDL 133	8162,3	P											0,05					0,11	0,48
BDL 133	8162,3	Pr.											1,02					1,49	1,16
BDL 133	8162,5	P		0,08	0,19				0,00								0,00	0,25	0,02
BDL 133	8162,5	Pr.		1,12	1,19				3,57								2,84	1,23	1,17
BDL 133	8163,2	P					0,59		0,74						0,57	0,78	0,65		
BDL 133	8163,2	Pr.					1,53		1,26						1,69	1,33	1,53		
BDL 134	7671,2	P				0,00	0,23	0,14						0,00	0,08	0,07	0,49	0,17	
BDL 134	7671,2	Pr.				1,93	1,18	1,20						1,94	1,73	1,76	1,38	1,39	
BDL 134	7672,1	P				0,01								0,00	0,00	0,07	0,45	0,14	0,46
BDL 134	7672,1	Pr.				3,86								2,37	1,49	1,38	1,31	1,46	1,27
BDL 134	7673,1	P				0,46	0,46	0,40	0,77					0,18	0,09	0,06	0,06	0,17	
BDL 134	7673,1	Pr.				11,84	1,30	1,26	1,10					2,40	2,03	2,04	1,95	1,14	
BDL 134	7673,2	P				0,19	0,39	0,26	0,01					0,18	0,11	0,16	0,00	0,62	
BDL 134	7673,2	Pr.				1,67	1,26	1,42	2,03					1,66	1,62	1,78	2,56	1,20	
BDL 135	7722,1	P					0,51	0,34	0,66					0,07	0,45	0,43	0,64	0,24	0,10
BDL 135	7722,1	Pr.					1,13	1,11	1,85					1,14	1,17	1,11	1,86	1,25	1,11
BDL 135	7723,1	P										0,02							0,24
BDL 135	7723,1	Pr.										1,02							1,22
BDL 135	7723,3	P						0,43	0,27					0,51		0,06	0,29	0,02	
BDL 135	7723,3	Pr.						1,13	5,05					1,20		1,29	6,62	1,34	
BDL 135	7723,8	P				0,72								0,61				0,35	0,26
BDL 135	7723,8	Pr.				1,12								1,13				1,10	1,13
BDL 135	7723,9	P	0,03	0,12	0,05					0,17	0,04							0,29	

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par.	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
BDL 135	7723,9	Pr.	1,19	1,15	1,12					1,16	1,03							1,21	
BDL 136	7751,4	P					0,19	0,57							0,19	0,48			
BDL 136	7751,4	Pr.					1,26	1,18							1,21	1,19			
BDL 136	7751,5	P				0,53		0,75	0,53					0,39	0,44	0,44	0,36	0,01	
BDL 136	7751,5	Pr.				1,57		1,12	1,40					1,49	1,35	1,41	1,77	1,12	
BDL 136	7751,8	P	0,03	0,02	0,05					0,05	0,10							0,39	
BDL 136	7751,8	Pr.	1,20	1,23	1,31					1,08	1,02							1,14	
BDL 136	7752,6	P																0,12	
BDL 136	7752,6	Pr.																1,35	
BDL 137	7701,2	P		0,21	0,05	0,50						0,06		0,47				0,40	0,05
BDL 137	7701,2	Pr.		1,15	1,14	5,92						1,02		1,90				2,37	1,21
BDL 137	7701,5	P				0,61			0,73					0,47			0,68		0,68
BDL 137	7701,5	Pr.				1,28			1,41					1,23			1,57		1,12
BDL 137	7701,6	P				0,84			0,75					0,73			0,76	0,01	0,14
BDL 137	7701,6	Pr.				1,10			1,42					1,15			1,41	1,30	1,13
BDL 137	7702,1	P				0,19	0,14		0,25					0,02	0,10	0,00	0,15		0,00
BDL 137	7702,1	Pr.				2,42	1,29		1,38					1,95	1,94	1,49	2,00		1,42
BDL 137	7703,2	P					0,41	0,45	0,59					0,35	0,41	0,46	0,61	0,30	
BDL 137	7703,2	Pr.					1,55	1,52	2,47					1,15	1,50	1,59	2,22	1,27	
BDL 137	7703,3	P						0,32						0,01	0,18	0,30	0,52	0,19	
BDL 137	7703,3	Pr.						1,19						1,25	1,23	1,42	1,20	1,27	
BDL 137	7703,7	P						0,53	0,55						0,53	0,53	0,41	0,17	
BDL 137	7703,7	Pr.						1,12	1,45						1,16	1,18	1,42	1,32	
BDL 139	8131,1	P																	
BDL 139	8131,1	Pr.																	
BDL 139	8131,2	P				0,12	0,44	0,10	0,83					0,00	0,27	0,00	0,64	0,38	0,50
BDL 139	8131,2	Pr.				1,70	1,21	1,21	1,19					1,79	1,78	1,71	1,64	1,20	1,18
BDL 139	8132,7	P																	

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par.	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
BDL 139	8132,7	Pr.																	
BDL 139	8133,2	P																	
BDL 139	8133,2	Pr.																	
BDL 141	8141,2	P												0,30				0,01	
BDL 141	8141,2	Pr.												1,12				1,13	
BDL 141	8142,2	P																	
BDL 141	8142,2	Pr.																	
BDL 142	8282,1	P				0,43	0,35	0,52	0,15					0,27	0,38	0,42	0,13	0,01	
BDL 142	8282,1	Pr.				1,17	1,21	1,20	1,47					1,31	1,37	1,33	1,49	1,25	
BDL 142	8283,1	P				0,27			0,26					0,14	0,03	0,65	0,24		0,33
BDL 142	8283,1	Pr.				4,32			1,94					2,12	1,30	1,17	2,04		1,10
BDL 142	8283,2	P	0,04		0,01													0,30	
BDL 142	8283,2	Pr.	1,07		1,14													1,42	
BDL 142	8284,1	P						0,68						0,35		0,64	0,85	0,29	0,17
BDL 142	8284,1	Pr.						1,18						1,20		1,23	1,11	1,21	1,13
BDL 142	8285,3	P				0,21			0,60					0,14	0,45	0,61	0,56	0,22	0,03
BDL 142	8285,3	Pr.				2,01			1,50					1,82	1,21	1,28	1,66	1,40	1,16
BDL 142	8285,5	P							0,52								0,65	0,36	
BDL 142	8285,5	Pr.							1,33								1,26	1,29	
BDL 143	8411,1	P	0,00	0,00	0,11					0,15	0,00	0,02	0,02					0,06	
BDL 143	8411,1	Pr.	1,28	1,24	1,41					1,17	1,05	1,02	1,03					1,17	
BDL 143	8411,5	P							0,91										0,17
BDL 143	8411,5	Pr.							1,24										1,11
BDL 143	8412,2	P				0,31	0,43	0,09	0,77					0,00	0,24	0,13	0,69		0,02
BDL 143	8412,2	Pr.				1,22	1,24	1,49	1,35					1,31	1,51	1,63	1,52		1,34
BDL 143	8412,4	P					0,23	0,63	0,59						0,03	0,42	0,28		0,78
BDL 143	8412,4	Pr.					1,14	1,21	1,26						1,80	1,90	2,17		1,22
BDL 143	8413,3	P				0,09	0,42	0,03	0,43					0,00	0,27	0,00	0,31	0,44	

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par.	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
BDL 143	8413,3	Pr.				1,69	1,28	1,29	1,40					1,61	1,50	1,55	1,64	1,20	
BDL 143	8414,4	P						0,34	0,68					0,73	0,66	0,07	0,67		
BDL 143	8414,4	Pr.						1,16	1,72					1,17	1,13	1,25	1,68		
BDL 143	8414,5	P				0,35	0,60	0,20						0,26	0,40	0,30			0,29
BDL 143	8414,5	Pr.				1,23	1,13	1,19						1,28	1,38	1,40			1,13
BDL 144	8384,1	P						0,09						0,35		0,10		0,37	0,36
BDL 144	8384,1	Pr.						1,24						1,18		1,23		1,17	1,35
BDL 144	8384,5	P												0,36		0,13			
BDL 144	8384,5	Pr.												1,18		1,24			
BDL 144	8385,1	P				0,00	0,07	0,39	0,73					0,00	0,05	0,00	0,06		0,13
BDL 144	8385,1	Pr.				2,50	1,35	1,25	1,14					2,06	2,23	1,86	1,71		1,50
BDL 145	8233,2	P				0,25								0,00			0,73	0,08	
BDL 145	8233,2	Pr.				1,47								1,47			1,24	1,15	
BDL 145	8233,3	P				0,37	0,45	0,58						0,08	0,06	0,30	0,48	0,39	0,23
BDL 145	8233,3	Pr.				9,00	1,13	1,21						2,55	1,79	1,75	1,51	1,35	1,36
BDL 145	8235,1	P				0,36		0,41						0,22		0,32	0,79	0,32	
BDL 145	8235,1	Pr.				1,25		1,57						1,27		1,73	1,34	1,16	
BDL 145	8235,3	P				0,21		0,16	0,65					0,02	0,14	0,00	0,43	0,41	0,38
BDL 145	8235,3	Pr.				3,39		1,17	1,35					2,32	1,87	1,92	2,33	1,31	1,21
BDL 145	8235,4	P																	
BDL 145	8235,4	Pr.																	
BDL 146	8241,1	P	0,29	0,42	0,72		0,32											0,30	
BDL 146	8241,1	Pr.	1,18	1,14	1,11		1,10											1,37	
BDL 146	8241,3	P				0,10		0,11	0,31					0,01	0,45	0,01	0,42	0,04	
BDL 146	8241,3	Pr.				1,19		1,29	1,88					1,26	1,24	1,41	1,96	1,08	
BDL 146	8243,2	P							0,62						0,72		0,59	0,15	0,05
BDL 146	8243,2	Pr.							1,52						1,12		1,42	1,18	1,16
BDL 146	8243,5	P				0,50	0,59	0,68						0,32	0,56	0,59		0,62	0,70

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par.	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
BDL 146	8243,5	Pr.				1,42	1,20	1,13						1,46	1,47	1,34		1,31	1,11
BDL 146	8244,4	P	0,29	0,21	0,33				0,77			0,01					0,89		
BDL 146	8244,4	Pr.	1,15	1,17	1,30				1,39			1,04					1,17		
BDL 146	8244,7	P				0,07	0,00	0,01	0,29					0,01	0,00	0,00	0,18		0,47
BDL 146	8244,7	Pr.				1,74	1,58	1,42	1,41					1,66	2,03	1,77	1,97		1,26
BDL 146	8245,2	P						0,69	0,50					0,43	0,35	0,59	0,47		
BDL 146	8245,2	Pr.						1,21	3,35					1,11	1,12	1,30	3,30		
BDL 146	8245,5	P			0,02				0,67	0,08							0,71	0,00	
BDL 146	8245,5	Pr.			1,13				2,48	1,07							2,05	1,25	
BDL 42	7771,1	P																	
BDL 42	7771,1	Pr.																	
BDL 42	7772,1	P																	
BDL 42	7772,1	Pr.																	
BDL 42	7772,7	P																	
BDL 42	7772,7	Pr.																	
BDL 42	7774,1	P				0,01	0,15	0,35	0,73					0,00	0,00	0,15	0,01		
BDL 42	7774,1	Pr.				4,17	1,16	1,25	1,11					2,40	2,04	2,29	2,15		
BDL 42	7774,2	P																	
BDL 42	7774,2	Pr.																	
BDL 42	7774,4	P				0,43		0,31	0,73					0,24	0,06	0,00	0,12	0,46	
BDL 42	7774,4	Pr.				3,46		1,18	1,10					2,06	1,55	1,85	2,09	1,15	
BDL 46	7833,3	P				0,02	0,70	0,33	0,47					0,00	0,34	0,09	0,43		0,31
BDL 46	7833,3	Pr.				1,53	1,11	1,19	4,71					1,55	1,52	1,51	6,07		1,24
BDL 46	7833,4	P									0,02							0,02	
BDL 46	7833,4	Pr.									1,04							1,17	
BDL 46	7833,5	P				0,49								0,43					
BDL 46	7833,5	Pr.				1,55								1,44					
BDL 46	7833,6	P				0,12		0,54	0,52					0,33		0,53	0,50		

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par.	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
BDL 46	7833,6	Pr.				1,24		1,74	3,06					1,18		1,94	3,78		
BDL 46	7834,1	P																	
BDL 46	7834,1	Pr.																	
BDL 46	7833,1	P				0,81	0,15	0,06	0,37					0,80	0,25	0,00	0,04		
BDL 46	7833,1	Pr.				2,17	1,81	1,26	1,29					2,21	2,29	1,66	1,76		
BDL 46	7833,3	P					0,75								0,30	0,00	0,79		
BDL 46	7833,3	Pr.					1,13								1,50	1,41	1,44		
BDL 46	7833,4	P																	
BDL 46	7833,4	Pr.																	
BDL 46	7833,5	P						0,54								0,25	0,09		
BDL 46	7833,5	Pr.						1,22								1,77	1,68		
BDL 46	7834,4	P				0,25	0,00	0,13	0,04					0,41	0,00	0,04	0,00		
BDL 46	7834,4	Pr.				2,23	3,05	2,50	3,07					1,88	3,45	2,95	3,50		
BDL 51	7291,1	P				0,17	0,34	0,24	0,07					0,06	0,22	0,13	0,04		0,10
BDL 51	7291,1	Pr.				2,46	1,84	1,59	3,10					2,14	2,30	2,12	4,63		1,11
BDL 51	8021,1	P						0,00	0,58							0,03	0,50		
BDL 51	8021,1	Pr.						2,43	3,13							4,73	7,50		
BDL 51	8022,4	P					0,02	0,31	0,63						0,02	0,25	0,16		0,49
BDL 51	8022,4	Pr.					2,50	1,54	1,30						4,06	3,15	3,24		1,29
BDL 51	8022,5	P				0,28	0,31	0,21	0,15					0,16	0,15	0,12	0,14		
BDL 51	8022,5	Pr.				3,27	2,22	1,66	2,02					2,40	3,77	4,00	5,31		
BDL 51	8024,4	P				0,23	0,06	0,32	0,55					0,10	0,12	0,30	0,51		0,85
BDL 51	8024,4	Pr.				2,16	1,60	1,55	3,05					1,80	2,19	2,27	4,90		1,14
BDL 51	8024,7	P							0,40						0,45		0,29		0,79
BDL 51	8024,7	Pr.							1,50						1,12		1,71		1,12
BDL 52	7861,1	P						0,64								0,68			
BDL 52	7861,1	Pr.						1,20								1,15			
BDL 52	7861,5	P				0,38			0,03					0,38			0,04		0,01

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par.	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
BDL 52	7861,5	Pr.				1,28			2,63					1,19			2,58		1,16
BDL 52	7863,2	P																	
BDL 52	7863,2	Pr.																	
BDL 52	7864,5	P		0,16														0,63	0,62
BDL 52	7864,5	Pr.		1,12														1,30	1,14
BDL 54	7781,1	P					0,51								0,51				0,51
BDL 54	7781,1	Pr.					4,05								3,55				2,68
BDL 54	7781,4	P				0,18								0,29				0,72	
BDL 54	7781,4	Pr.				1,67								1,57				1,15	
BDL 54	7784,3	P				0,21	0,43							0,17	0,31				0,29
BDL 54	7784,3	Pr.				2,32	2,78							2,05	3,64				2,55
BDL 54	7784,5	P				0,11			0,40					0,01	0,27		0,35		0,18
BDL 54	7784,5	Pr.				1,38			3,91					1,29	1,23		4,08		1,29
BDL 54	7785,4	P				0,00								0,00		0,02			
BDL 54	7785,4	Pr.				1,70								1,56		1,23			
BDL 54	7781,1	P				0,08	0,78							0,25	0,59	0,52	0,23		
BDL 54	7781,1	Pr.				3,23	1,30							3,98	1,88	1,41	1,72		
BDL 54	7781,4	P				0,55								0,54		0,24	0,92		
BDL 54	7781,4	Pr.				3,16								3,57		1,52	1,12		
BDL 54	7784,3	P							0,52								0,17		
BDL 54	7784,3	Pr.							1,21								1,51		
BDL 54	7785,4	P				0,04			0,53					0,13			0,11	0,34	
BDL 54	7785,4	Pr.				6,70			1,20					10,24			1,62	3,57	
BDL 54	7785,8	P				0,14			0,37					0,16			0,33	0,00	
BDL 54	7785,8	Pr.				6,30			1,51					8,24			1,48	3,47	
BDL 56	7181,2	P				0,15	0,21	0,73	0,52					0,14	0,26	0,66	0,50		0,46
BDL 56	7181,2	Pr.				1,26	1,91	1,41	2,39					1,44	2,65	1,64	3,57		2,09
BDL 56	8301,1	P	0,00	0,05	0,11				0,55	0,32	0,01	0,03					0,66		

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par.	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
BDL 56	8301,1	Pr.	1,28	1,27	1,22				1,82	1,13	1,04	1,03					1,45		
BDL 56	8301,3	P							0,40						0,81		0,35		0,75
BDL 56	8301,3	Pr.							2,62						1,11		2,83		1,15
BDL 56	8304,1	P		0,38															
BDL 56	8304,1	Pr.		1,11															
BDL 56	8305,1	P				0,38			0,43					0,07			0,46	0,79	
BDL 56	8305,1	Pr.				1,19			1,52					1,17			1,58	1,12	
BDL 56	8301,1	P						0,29								0,00			
BDL 56	8301,1	Pr.						1,27								1,63			
BDL 56	8301,2	P																	0,77
BDL 56	8301,2	Pr.																	1,68
BDL 56	8301,3	P	0,54			0,95								0,91			0,84	0,36	
BDL 56	8301,3	Pr.	1,25			1,36								1,62			1,11	1,80	
BDL 56	8303,1	P																	
BDL 56	8303,1	Pr.																	
BDL 56	8303,2	P	0,53			0,01					0,33			0,00		0,08	0,51	0,12	
BDL 56	8303,2	Pr.	1,11			6,56					1,13			9,42		1,25	1,22	5,45	
BDL 59	7792,1	P							0,39	0,07							0,50		
BDL 59	7792,1	Pr.							1,69	1,08							1,58		
BDL 59	7792,2	P							0,69								0,68		
BDL 59	7792,2	Pr.							2,56								2,78		
BDL 59	7792,3	P	0,16								0,05								
BDL 59	7792,3	Pr.	1,17								1,03								
BDL 59	7793,3	P				0,64			0,83					0,57			0,73	0,36	
BDL 59	7793,3	Pr.				1,21			1,15					1,26			1,24	1,35	
BDL 59	7794,1	P					0,27		0,86						0,17		0,81		0,00
BDL 59	7794,1	Pr.					2,60		1,13						3,67		1,18		3,34
BDL 60	8011,4	P	0,45	0,45															

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par.	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
BDL 60	8011,4	Pr.	1,13	1,12															
BDL 60	8011,7	P				0,00	0,48							0,01	0,44	0,41			0,45
BDL 60	8011,7	Pr.				2,02	2,83							1,98	3,86	1,35			2,63
BDL 60	8013,4	P				0,08			0,40					0,01		0,05	0,27		
BDL 60	8013,4	Pr.				2,96			2,37					2,30		1,57	3,52		
BDL 60	8013,6	P				0,21			0,49					0,00	0,70	0,04	0,47		0,26
BDL 60	8013,6	Pr.				1,96			6,84					1,85	1,11	1,20	8,09		1,42
BDL 60	8014,5	P				0,36			0,90					0,23	0,62	0,76	0,70		
BDL 60	8014,5	Pr.				2,07			1,16					1,84	1,19	1,29	1,76		
BDL 60	8013,6	P				0,01	0,34	0,32	0,21					0,00	0,04	0,19	0,09	0,77	0,89
BDL 60	8013,6	Pr.				6,90	1,59	1,30	2,17					8,76	1,88	1,59	2,45	1,23	1,17
BDL 60	8014,2	P					0,04	0,18	0,01						0,00	0,16	0,00		
BDL 60	8014,2	Pr.					1,58	1,50	2,12						2,04	2,11	3,09		
BDL 60	8014,7	P							0,56	0,43					0,42	0,45	0,50		
BDL 60	8014,7	Pr.							1,55	1,26					1,23	1,29	2,00		
BDL 60	8014,8	P	0,81			0,12		0,16	0,66					0,17		0,25	0,24	0,41	
BDL 60	8014,8	Pr.	1,12			7,59		1,18	1,14					9,76		1,41	1,39	4,18	
BDL 65	7824,1	P				0,57	0,36		0,65					0,41	0,01	0,55	0,47		0,03
BDL 65	7824,1	Pr.				1,51	1,24		1,37					1,51	1,72	1,21	2,26		1,36
BDL 65	7825,2	P					0,40	0,49	0,11						0,17	0,21	0,15		
BDL 65	7825,2	Pr.					1,29	1,18	1,76						1,49	1,45	2,51		
BDL 65	8473,2	P				0,13	0,20	0,07	0,51					0,01	0,05	0,00	0,42		0,13
BDL 65	8473,2	Pr.				3,11	1,16	1,31	2,00					2,17	1,78	1,82	2,80		1,34
BDL 65	8474,1	P						0,13	0,22							0,05	0,33	0,64	
BDL 65	8474,1	Pr.						1,25	1,78							1,28	2,01	1,12	
BDL 67	7901,5	P				0,38	0,26	0,15	0,17					0,36	0,18	0,23	0,12		
BDL 67	7901,5	Pr.				1,56	1,22	1,29	1,92					1,46	1,34	1,48	2,49		
BDL 67	7902,3	P			0,46	0,65	0,47							0,68	0,48				0,49

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par.	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
BDL 67	7902,3	Pr.			1,12	1,11	2,65							1,11	3,06				2,43
BDL 67	7902,7	P				0,19	0,54							0,20	0,51	0,66			0,55
BDL 67	7902,7	Pr.				1,49	1,94							1,46	2,91	1,15			2,69
BDL 67	7903,3	P				0,68			0,73					0,71			0,68		
BDL 67	7903,3	Pr.				1,19			1,99					1,17			2,50		
BDL 67	7903,5	P				0,12			0,54					0,00	0,00	0,05	0,49		0,04
BDL 67	7903,5	Pr.				2,41			2,43					2,03	1,41	1,33	2,85		1,26
BDL 68	7761,3	P				0,59			0,74					0,59		0,66	0,72		
BDL 68	7761,3	Pr.				1,42			1,55					1,32		1,17	1,60		
BDL 68	7761,8	P				0,45			0,21					0,23	0,00	0,29	0,04		0,09
BDL 68	7761,8	Pr.				7,80			1,77					2,62	2,04	1,30	2,56		2,02
BDL 68	7761,9	P													0,39	0,64	0,96		0,63
BDL 68	7761,9	Pr.													1,60	1,67	1,12		1,41
BDL 68	7763,2	P				0,24			0,30					0,19			0,14	0,46	
BDL 68	7763,2	Pr.				2,08			1,62					1,91			1,99	1,28	
BDL 68	7764,1	P				0,42	0,54		0,83					0,13	0,46	0,53	0,45		0,40
BDL 68	7764,1	Pr.				9,83	2,45		1,14					2,76	3,43	1,26	1,50		2,71
BDL 78	7911,11	P						0,40						0,08	0,56	0,14		0,00	
BDL 78	7911,11	Pr.						1,11						1,16	1,14	1,21		1,24	
BDL 78	7911,8	P							0,63					0,15	0,57		0,60	0,36	
BDL 78	7911,8	Pr.							1,79					1,21	1,22		2,17	1,30	
BDL 78	7911,9	P				0,20								0,00	0,14	0,00	0,69		0,00
BDL 78	7911,9	Pr.				6,36								2,58	1,94	1,88	1,25		1,48
BDL 78	7912,6	P						0,70							0,61	0,63			0,37
BDL 78	7912,6	Pr.						1,21							1,14	1,28			1,16
BDL 78	7913,11	P				0,24		0,66						0,05	0,32	0,24		0,13	0,67
BDL 78	7913,11	Pr.				1,72		1,13						1,84	1,18	1,50		1,60	1,11
BDL 78	7913,3	P						0,53								0,44		0,00	

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par.	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
BDL 78	7913,3	Pr.						1,14								1,20		1,31	
BDL 78	7913,6	P				0,45	0,25	0,49	0,68					0,18	0,12	0,06	0,24	0,49	0,42
BDL 78	7913,6	Pr.				8,48	1,13	1,22	1,23					2,37	1,90	1,81	1,92	1,16	1,44
BDL 78	7913,8	P					0,31	0,21	0,68					0,04	0,23	0,10	0,52	0,07	0,48
BDL 78	7913,8	Pr.					1,36	1,28	1,29					1,30	1,69	1,58	1,69	1,14	1,11
BDL 78	7913,1	P				0,51		0,52	0,20					0,34	0,49	0,46	0,15	0,07	
BDL 78	7913,9	Pr.				1,37		1,14	1,41					1,48	1,25	1,28	1,50	1,53	
BDL 82	7801,1	P				0,20	0,00	0,24	0,34					0,00	0,00	0,12	0,25		
BDL 82	7801,1	Pr.				2,67	1,39	1,66	2,12					2,04	1,80	2,22	3,05		
BDL 82	7801,3	P				0,33			0,83					0,03	0,03		0,14		
BDL 82	7801,3	Pr.				8,14			1,12					2,90	1,28		2,08		
BDL 82	7802,2	P				0,18			0,44					0,14	0,77	0,01	0,41	0,09	
BDL 82	7802,2	Pr.				2,55			5,01					2,16	1,11	1,26	6,53	1,35	
BDL 82	7802,3	P				0,16	0,67	0,00	0,43					0,08	0,48	0,21	0,06		
BDL 82	7802,3	Pr.				2,36	1,21	1,20	1,58					2,03	1,70	1,72	2,45		
BDL 82	7803,9	P	0,24	0,01	0,37					0,00		0,00							0,46
BDL 82	7803,9	Pr.	1,15	1,30	1,18					1,14		1,04							1,28
BDL 89	7812,2	P				0,49								0,67					0,34
BDL 89	7812,2	Pr.				1,15								1,14					1,11
BDL 89	7812,5	P					0,44	0,55	0,26						0,45	0,46	0,29		0,49
BDL 89	7812,5	Pr.					3,98	1,46	7,37						3,87	1,49	7,29		2,55
BDL 89	7814,1	P				0,03	0,20	0,29	0,44					0,42	0,49	0,45	0,43		0,77
BDL 89	7814,1	Pr.				1,22	1,11	1,17	2,98					1,12	1,12	1,14	2,97		1,11
BDL 89	7814,4	P				0,51	0,42	0,00	0,44					0,51	0,39	0,15	0,10		0,33
BDL 89	7814,4	Pr.				3,96	2,15	1,23	1,63					1,94	3,04	1,58	2,16		1,96
BDL 89	7814,5	P				0,42		0,55	0,43					0,31	0,20	0,42	0,19	0,32	0,13
BDL 89	7814,5	Pr.				3,45		1,14	1,67					2,25	1,16	1,45	2,21	1,39	1,12

Tabla 26

ES 2 674 256 T3

Tabla 27

Gen	Ev.	Par.	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55
BDL 95	7841.5	P		0,67		0,70	0,74		0,55		0,14		0,74		0,55	0,03	0,01						
BDL 95	7841.5	Pr.		1,64		1,36	1,22		1,11		1,18		1,22		1,11	1,14	1,09						
BDL 95	7842.12	P									0,77	0,03				0,12	0,12		0,32			0,05	
BDL 95	7842.12	Pr.									1,12	1,19				1,24	1,11		1,28			1,04	
BDL 95	7842.2	P			0,71						0,58					0,07	0,12		0,19		0,20	0,00	
BDL 95	7842.2	Pr.			1,14						1,11					1,07	1,11		1,33		1,14	1,12	
BDL 95	7842.8	P	0,28		0,58	0,78			0,01		0,00					0,01	0,20	0,01					
BDL 95	7842.8	Pr.	1,18		1,14	1,11			1,21		1,29					1,21	1,31	1,09					
BDL 95	7843.4	P			0,49			0,49			0,49			0,49		0,01							
BDL 95	7843.4	Pr.			10,1 6			5,89			9,51			5,89		1,24							
BDL 100	7871.2	P	0,39		0,36			0,37			0,08	0,21		0,37		0,09	0,34		0,39				
BDL 100	7871.2	Pr.	1,13		1,25			1,14			1,25	1,15		1,14		1,12	1,10		1,16				
BDL 100	7872.2	P		0,03	0,29	0,46		0,26			0,32	0,09		0,26		0,27	0,12		0,00				
BDL 100	7872.2	Pr.		1,40	1,25	1,40		1,20			1,40	1,20		1,20		1,17	1,11		1,49				
BDL 100	7872.3	P			0,01											0,56			0,32				
BDL 100	7872.3	Pr.			1,49											1,11			1,27				
BDL 100	7873.3	P						0,42	0,03			0,02		0,42	0,03	0,32	0,12						
BDL 100	7873.3	Pr.						1,18	1,16			1,23		1,18	1,16	1,20	1,11						
BDL 100	7873.4	P			0,50	0,01		0,43						0,43					0,06				
BDL 100	7873.4	Pr.			2,93	1,37		2,58						2,58					1,41				
BDL 106	7881.1	P		0,01		0,50	0,00						0,00			0,03							
BDL 106	7881.1	Pr.		1,41		1,39	1,40						1,40			1,14							
BDL 106	7881.4	P		0,47		0,06	0,68						0,68			0,23	0,16						
BDL 106	7881.4	Pr.		8,12		1,69	1,12						1,12			1,42	1,23						
BDL 106	7882.6	P		0,63		0,25		0,04						0,04									0,30
BDL 106	7882.6	Pr.		1,42		1,19		1,15						1,15									1,10
BDL 106	7884.1	P			0,49			0,50			0,51	0,16		0,50		0,47	0,12						

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par.	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55
BDL 106	7884.1	Pr.			12,26			5,79			4,04	1,36		5,79		1,22	1,11						
BDL 106	7884.9	P		0,54		0,31	0,69		0,47		0,62	0,24	0,69		0,47	0,03	0,00					0,00	
BDL 106	7884.9	Pr.		3,90		2,59	1,32		1,13		1,12	1,19	1,32		1,13	1,26	1,09					1,09	
BDL 106	7881.1	P	0,44	0,00	0,46		0,01		0,23			0,21	0,01		0,23								
BDL 106	7881.1	Pr.	1,19	1,37	1,49		1,15		1,16			1,21	1,15		1,16								
BDL 106	7881.2	P			0,74	0,29	0,40				0,62		0,40				0,38						0,37
BDL 106	7881.2	Pr.			1,17	1,69	1,16				1,21		1,16				1,14						1,16
BDL 106	7882.2	P			0,11	0,73																	
BDL 106	7882.2	Pr.			1,30	1,54																	
BDL 106	7882.4	P				0,08			0,24		0,60	0,09			0,24								
BDL 106	7882.4	Pr.				2,00			1,12		1,22	1,25			1,12								
BDL 106	7882.5	P			0,14	0,44			0,43	0,26	0,06	0,03			0,43		0,35						0,50
BDL 106	7882.5	Pr.			1,30	1,72			1,21	1,12	1,39	1,16			1,21		1,14						1,13
BDL 108	8122.2	P	0,05	0,62	0,48	0,58		0,49	0,39		0,48	0,25		0,49	0,39	0,06	0,26					0,08	
BDL 108	8122.2	Pr.	1,15	3,47	4,92	1,26		4,63	1,16		2,58	1,40		4,63	1,16	1,27	1,15					1,09	
BDL 108	8122.3	P		0,42		0,53	0,44		0,31		0,44	0,05	0,44		0,31	0,05					0,25	0,00	
BDL 108	8122.3	Pr.		4,07		1,46	1,37		1,13		1,22	1,17	1,37		1,13	1,20					1,17	1,11	
BDL 108	8123.1	P		0,14		0,78	0,03			0,37	0,40		0,03			0,15							
BDL 108	8123.1	Pr.		3,19		1,13	1,93			1,25	1,22		1,93			1,13							
BDL 108	8123.2	P		0,59	0,51	0,39	0,71	0,52	0,50		0,54	0,38	0,71	0,52	0,50	0,00	0,05				0,53		
BDL 108	8123.2	Pr.		6,61	11,57	2,13	2,17	6,48	1,30		3,24	1,56	2,17	6,48	1,30	1,35	1,15				1,21		
BDL 108	8123.5	P	1	0,45		0,22	0,47		0,13			0,43	0,47		0,13	0,09	0,05						
BDL 108	8123.5	Pr.		4,40		1,30	1,34		1,11			1,30	1,34		1,11	1,30	1,15						
BDL 108	8121.1	P				0,21																	
BDL 108	8121.1	Pr.				3,08																	
BDL 108	8121.3	P				0,01																	
BDL 108	8121.3	Pr.				1,65																	
BDL 108	8121.4	P		0,76		0,06																	

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par.	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55
BDL 108	8121.4	Pr.		1,23		1,44																	
BDL 108	8122.7	P				0,02																	
BDL 108	8122.7	Pr.				1,90																	
BDL 108	8123.7	P		0,48	0,34	0,09					0,74	0,00											
BDL 108	8123.7	Pr.		1,21	1,15	1,58					1,11	1,21											
BDL 110	8092.1	P				0,24										0,18	0,02						
BDL 110	8092.1	Pr.				1,18										1,12	1,15						
BDL 110	8092.2	P				0,11			0,01			0,01			0,01	0,00	0,03						
BDL 110	8092.2	Pr.				1,75			1,20			1,24			1,20	1,30	1,21						
BDL 110	8092.5	P				0,27			0,04						0,04	0,05	0,00						
BDL 110	8092.5	Pr.				1,17			1,09						1,09	1,14	1,12						
BDL 110	8095.2	P										0,61				0,20	0,01						
BDL 110	8095.2	Pr.										1,11				1,16	1,10						
BDL 111	8102.7	P		0,24	0,54	0,14		0,04			0,02	0,21		0,04		0,15	0,00		0,37				
BDL 111	8102.7	Pr.		1,33	1,24	1,81		1,24			1,30	1,13		1,24		1,26	1,15		1,28				
BDL 111	8103.1	P		0,68	0,09	0,04		0,20			0,00	0,07		0,20		0,00	0,00						
BDL 111	8103.1	Pr.		1,37	1,70	1,77		1,54			1,37	1,15		1,54		1,20	1,16						
BDL 111	8103.2	P		0,26			0,72			0,76			0,72			0,03	0,30		0,00				
BDL 111	8103.2	Pr.		2,29			1,13			1,14			1,13			1,34	1,14		1,37				
BDL 111	8103.4	P		0,52	0,53	0,08					0,47					0,00	0,12		0,12			0,00	
BDL 111	8103.4	Pr.		2,01	1,22	1,81					1,19					1,19	1,11		1,15			1,08	
BDL 111	8103.5	P		0,25	0,40	0,17	0,67	0,64	0,27			0,03	0,67	0,64	0,27	0,00	0,01						
BDL 111	8103.5	Pr.		1,87	1,19	1,71	1,20	1,12	1,13			1,20	1,20	1,12	1,13	1,16	1,09						
BDL 111	8102.7	P		0,31		0,52			0,44			0,27			0,44								
BDL 111	8102.7	Pr.		1,32		1,29			1,12			1,23			1,12								
BDL 111	8103.1	P				0,45			0,24		0,00				0,24								0,18
BDL 111	8103.1	Pr.				1,24			1,12		1,31				1,12								1,17
BDL 111	8103.2	P		0,61		0,51					0,33	0,25											

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par.	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55
BDL 111	8103.2	Pr.		1,93		1,80					1,25	1,22											
BDL 111	8103.4	P				0,15					0,25	0,40											
BDL 111	8103.4	Pr.				1,66					1,18	1,17											
BDL 111	8103.5	P		0,15		0,34			0,10						0,10								
BDL 111	8103.5	Pr.		1,80		1,72			1,11						1,11								
BDL 112	7502.1	P						0,07			0,38	0,09		0,07		0,31			0,07				
BDL 112	7502.1	Pr.						1,30			1,22	1,14		1,30		1,13			1,22				
BDL 112	7502.14	P			0,50			0,49			0,49			0,49		0,56			0,12				
BDL 112	7502.14	Pr.			9,53			4,98			9,33			4,98		1,11			1,16				
BDL 112	7502.4	P		0,40	0,33	0,02	0,65	0,48			0,00	0,03	0,65	0,48		0,00	0,00						0,03
BDL 112	7502.4	Pr.		2,81	1,20	1,35	1,37	1,31			1,23	1,19	1,37	1,31		1,16	1,09						1,07
BDL 112	7502.7	P		0,26		0,31		0,45			0,00	0,20		0,45		0,03							
BDL 112	7502.7	Pr.		2,00		1,76		1,21			1,22	1,15		1,21		1,08							
BDL 112	7502.9	P			0,59			0,48			0,28	0,15		0,48		0,00	0,08						
BDL 112	7502.9	Pr.			1,14			1,29			1,15	1,11		1,29		1,21	1,10						
BDL 112	7502.1	P		0,31		0,39			0,03		0,04	0,02				0,03							
BDL 112	7502.1	Pr.		2,00		1,38			1,11		1,38	1,26				1,11							
BDL 112	7502.4	P	0,01		0,22		0,01		0,02		0,26	0,43	0,01		0,02								0,08
BDL 112	7502.4	Pr.	1,26		1,85		1,15		1,13		1,29	1,19	1,15		1,13								1,10
BDL 112	7502.7	P	0,25	0,11	0,20		0,41		0,00		0,25	0,57	0,41		0,00			0,34					0,05
BDL 112	7502.7	Pr.	1,28	1,50	1,20		1,11		1,23		1,30	1,10	1,11		1,23			1,12					1,23
BDL 112	7502.8	P	0,38	0,49	0,58		0,01		0,01	0,07	0,15	0,01	0,01		0,01								
BDL 112	7502.8	Pr.	1,21	1,64	1,17		1,14		1,15	1,16	1,21	1,25	1,14		1,15								
BDL 112	7502.9	P		0,06		0,07			0,11		0,00				0,11			0,28					0,09
BDL 112	7502.9	Pr.		1,22		1,63			1,12		1,34				1,12			1,25					1,41
BDL 113	7683.4	P		0,29		0,06	0,28		0,01		0,02	0,07	0,28		0,01	0,39	0,23						
BDL 113	7683.4	Pr.		2,64		2,49	1,88		1,23		1,11	1,15	1,88		1,23	1,28	1,14						
BDL 113	7683.6	P		0,30	0,24	0,00		0,03				0,33		0,03		0,39	0,26						

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par.	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55
BDL 113	7683.6	Pr.		2,33	1,40	1,67		1,47				1,21		1,47		1,29	1,12						
BDL 113	7684.3	P		0,68	0,14	0,00										0,34	0,17						
BDL 113	7684.3	Pr.		1,42	1,21	1,92										1,30	1,14						
BDL 113	7684.6	P		0,25		0,21	0,70		0,51			0,37	0,70		0,51	0,00	0,01						
BDL 113	7684.6	Pr.		2,21		1,55	1,20		1,12			1,10	1,20		1,12	1,17	1,09						
BDL 113	7684.7	P				0,02						0,32				0,22	0,00						
BDL 113	7684.7	Pr.				1,67						1,15				1,19	1,15						
BDL 113	7683.1	P		0,05		0,43		0,54			0,41	0,01		0,54									
BDL 113	7683.1	Pr.		1,39		1,62		1,15			1,20	1,20		1,15									
BDL 113	7683.11	P																					
BDL 113	7683.11	Pr.																					
BDL 113	7683.4	P		0,72		0,77		0,69			0,39	0,00		0,69									
BDL 113	7683.4	Pr.		1,33		1,21		1,12			1,14	1,24		1,12									
BDL 113	7684.1	P																					
BDL 113	7684.1	Pr.																					
BDL 113	7684.5	P																					
BDL 113	7684.5	Pr.																					
BDL 114	7741.3	P			0,50	0,00		0,50	0,10		0,49	0,33		0,50	0,10	0,26	0,10						
BDL 114	7741.3	Pr.			24,7 4	1,73		10,33	1,14		6,56	1,14		10,33	1,14	1,27	1,15						
BDL 114	7741.6	P			0,50			0,49			0,50			0,49		0,40						0,72	
BDL 114	7741.6	Pr.			65,4 1			11,28			9,24			11,28		1,23						1,12	
BDL 114	7742.1	P		0,50				0,39			0,01	0,20		0,39		0,16							
BDL 114	7742.1	Pr.		1,51				1,22			1,16	1,11		1,22		1,13							
BDL 114	7742.3	P		0,48	0,00			0,03			0,15			0,03		0,20	0,15						
BDL 114	7742.3	Pr.		6,61	1,94			1,69			1,30			1,69		1,41	1,16						
BDL 114	7742.5	P		0,22	0,29	0,02		0,45	0,17		0,02	0,34		0,45	0,17	0,06	0,07						
BDL 114	7742.5	Pr.		3,37	1,93	2,22		1,58	1,14		1,57	1,32		1,58	1,14	1,44	1,21						
BDL 115	8152.3	P		0,27												0,11	0,24		0,03		0,08		

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par.	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55
BDL 115	8152.3	Pr.		1,28												1,26	1,14		1,25		1,13		
BDL 115	8152.4	P		0,05		0,00	0,02		0,07				0,02		0,07	0,15							
BDL 115	8152.4	Pr.		1,42		1,67	1,58		1,12				1,58		1,12	1,13							
BDL 115	8154.1	P			0,15	0,11		0,40				0,22		0,40		0,05	0,00		0,31				
BDL 115	8154.1	Pr.			1,41	1,31		1,32				1,23		1,32		1,31	1,14		1,36				
BDL 115	8155.2	P			0,49	0,03		0,50			0,50			0,50		0,00	0,12				0,50		
BDL 115	8155.2	Pr.			9,95	1,32		6,80			12,32			6,80		1,24	1,11				1,13		
BDL 115	8155.4	P		0,72	0,49	0,00		0,51			0,45			0,51		0,12	0,12						
BDL 115	8155.4	Pr.		2,26	4,22	1,60		3,59			1,83			3,59		1,27	1,11						
BDL 115	8152.3	P		0,51		0,24			0,01		0,12	0,33			0,01								
BDL 115	8152.3	Pr.		1,56		1,84			1,27		1,22	1,13			1,27								
BDL 115	8152.4	P		0,01	0,57	0,01		0,25	0,08		0,08	0,02		0,25	0,08								
BDL 115	8152.4	Pr.		2,40	1,29	2,01		1,20	1,19		1,63	1,25		1,20	1,19								
BDL 115	8154.1	P		0,35	0,85	0,00	0,29		0,01		0,40	0,42	0,29		0,01								0,17
BDL 115	8154.1	Pr.		1,78	1,15	2,51	1,19		1,16		1,47	1,14	1,19		1,16								1,43
BDL 115	8155.2	P				0,11																	
BDL 115	8155.2	Pr.				1,60																	
BDL 115	8155.4	P				0,05																	
BDL 115	8155.4	Pr.				2,30																	
BDL 116	7481.2	P		0,24	0,16	0,18		0,12			0,22			0,12		0,02	0,00						
BDL 116	7481.2	Pr.		1,61	1,19	1,16		1,21			1,17			1,21		1,32	1,17						
BDL 116	7481.7	P	0,48	0,69	0,26		0,74		0,44		0,63		0,74		0,44	0,00	0,00		0,27				
BDL 116	7481.7	Pr.	1,11	1,11	1,44		1,14		1,13		1,11		1,14		1,13	1,24	1,13		1,10				
BDL 116	7481.8	P			0,49			0,50			0,49	0,33		0,50		0,56	0,36		0,04		0,60		
BDL 116	7481.8	Pr.			15,7 8			5,33			13,31	1,10		5,33		1,12	1,11		1,22		1,33		
BDL 116	7482.2	P		0,45		0,10	0,46		0,02			0,13	0,46		0,02	0,00	0,00						
BDL 116	7482.2	Pr.		1,23		1,53	1,34		1,18			1,22	1,34		1,18	1,20	1,04						
BDL 116	7485.1	P		0,00	0,13	0,36		0,46	0,08		0,55	0,20		0,46	0,08	0,12			0,24				

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par.	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55
BDL 116	7485.1	Pr.		2,03	1,35	1,47		1,27	1,20		1,10	1,31		1,27	1,20	1,27			1,24				
BDL 119	7732.2	P		0,09		0,03		0,09			0,10				0,09	0,02	0,00	0,12					
BDL 119	7732.2	Pr.		2,30		1,61		1,16			1,44				1,16	1,10	1,11	1,13					
BDL 119	7733.2	P	0,70	0,01	0,23			0,06				0,27		0,06									
BDL 119	7733.2	Pr.	1,12	1,47	1,28			1,21				1,39		1,21									
BDL 119	7734.1	P	0,30	0,02				0,52	0,21			0,15		0,52	0,21	0,02	0,01						
BDL 119	7734.1	Pr.	1,21	1,50				1,12	1,13			1,36		1,12	1,13	1,11	1,10						
BDL 119	7734.5	P			0,39																0,14		
BDL 119	7734.5	Pr.			1,16																1,13		
BDL 119	7734.7	P																					
BDL 119	7734.7	Pr.																					
BDL 120	7891.3	P		0,00		0,06	0,15		0,02		0,35	0,10	0,15		0,02	0,00	0,12		0,51				
BDL 120	7891.3	Pr.		5,30		1,42	1,84		1,19		1,30	1,13	1,84		1,19	1,34	1,11		1,22				
BDL 120	7892.4	P		0,36	0,01			0,03			0,00	0,26		0,03		0,23			0,37				
BDL 120	7892.4	Pr.		1,37	1,48			1,28			1,37	1,15		1,28		1,15			1,11				
BDL 120	7892.6	P														0,15					0,00	0,07	
BDL 120	7892.6	Pr.														1,13					1,34	1,11	
BDL 120	7893.2	P	0,65		0,36	0,86		0,19	0,14					0,19	0,14	0,07	0,21		0,06				
BDL 120	7893.2	Pr.	1,11		22,4 6	1,20		11,26	1,13					11,26	1,13	1,29	1,11		1,20				
BDL 120	7893.5	P		0,39			0,22						0,22			0,03			0,25				
BDL 120	7893.5	Pr.		1,13			1,19						1,19			1,08			1,17				
BDL 122	7513.1	P										0,16							0,29		0,13		
BDL 122	7513.1	Pr.										1,20							1,15		1,13		
BDL 122	7513.1	P	0,17	0,48			0,06			0,76		0,30	0,06								0,18		
BDL 122	7513.1	Pr.	1,12	1,90			1,51			1,13		1,26	1,51								1,22		
BDL 122	7513.14	P		0,23				0,31			0,00	0,02		0,31		0,14			0,01		0,10	0,00	
BDL 122	7513.14	Pr.		2,17				1,18			1,27	1,30		1,18		1,25			1,37		1,13	1,08	
BDL 122	7513.9	P			0,49			0,48			0,45			0,48		0,21						0,01	

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par.	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55
BDL 122	7513.9	Pr.			5,96			5,25			3,93			5,25		1,14						1,10	
BDL 122	7514.3	P			0,53			0,53			0,42			0,53							0,51		
BDL 122	7514.3	Pr.			4,10			4,19			1,34			4,19							1,20		
BDL 122	7513.1	P				0,44												0,33					0,47
BDL 122	7513.1	Pr.				1,17												1,16					1,14
BDL 122	7513.14	P			0,36	0,42	0,04						0,04										
BDL 122	7513.14	Pr.			1,28	1,17	1,26						1,26										
BDL 122	7513.9	P																					
BDL 122	7513.9	Pr.																					
BDL 122	7514.3	P				0,34																	
BDL 122	7514.3	Pr.				1,73																	
BDL 123	8082.1	P						0,00						0,00					0,49				
BDL 123	8082.1	Pr.						1,30						1,30						1,21			
BDL 123	8082.3	P																	0,03				
BDL 123	8082.3	Pr.																	1,24				
BDL 123	8082.6	P			0,72	0,38		0,68				0,08		0,68						0,13			
BDL 123	8082.6	Pr.			1,21	1,45		1,17				1,15		1,17						1,21			
BDL 123	8083.2	P			0,50			0,50			0,50			0,50		0,28	0,26		0,07				
BDL 123	8083.2	Pr.			20,4 0			9,06			17,24			9,06		1,38	1,15		1,32				
BDL 123	8083.3	P															0,07						
BDL 123	8083.3	Pr.															1,03						
BDL 124	8482.1	P	0,17	0,39		0,04			0,01			0,09			0,01	0,13	0,22						
BDL 124	8482.1	Pr.	1,12	2,21		1,35			1,12			1,18			1,12	1,30	1,29						
BDL 125	7491.1	P																	0,04				
BDL 125	7491.1	Pr.																	1,23				
BDL 125	7491.5	P			0,37			0,05						0,05									
BDL 125	7491.5	Pr.			1,27			1,16						1,16									
BDL 125	7492.5	P		0,43		0,54	0,56				0,40	0,13	0,56			0,02	0,00		0,40			0,06	

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par.	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55
BDL 125	7492.5	Pr.		1,72		1,62	1,53				1,12	1,16	1,53			1,21	1,13		1,23			1,04	
BDL 125	7494.1	P		0,54		0,03	0,59		0,20				0,59		0,20	0,00	0,00						
BDL 125	7494.1	Pr.		1,65		1,65	1,21		1,10				1,21		1,10	1,17	1,09						
BDL 125	7495.5	P		0,48	0,33	0,17	0,43				0,37	0,47	0,43			0,06	0,00		0,28				
BDL 125	7495.5	Pr.		1,41	1,28	1,75	1,50				1,14	1,24	1,50			1,14	1,09		1,20				
BDL 128	7711.3	P		0,55	0,79	0,59	0,82	0,85	0,53				0,82	0,85	0,53	0,18	0,00		0,24				
BDL 128	7711.3	Pr.		1,41	1,26	1,73	1,12	1,12	1,13				1,12	1,12	1,13	1,29	1,15		1,20				
BDL 128	8361.5	P			0,50	0,64		0,53	0,43			0,36		0,53	0,43	0,26			0,30			0,05	
BDL 128	8361.5	Pr.			4,09	1,61		3,76	1,14			1,30		3,76	1,14	1,16			1,12			1,04	
BDL 128	8362.2	P				0,72										0,26	0,02		0,01		0,31	0,04	
BDL 128	8362.2	Pr.				1,15										1,12	1,08		1,36		1,23	1,11	
BDL 128	8363.2	P		0,48		0,60													0,16		0,41	0,06	
BDL 128	8363.2	Pr.		2,28		1,46													1,14		1,24	1,11	
BDL 128	8365.2	P			0,48	0,49		0,48			0,46			0,48		0,06	0,00		0,01				
BDL 128	8365.2	Pr.			7,01	1,50		5,56			3,18			5,56		1,43	1,17		1,42				
BDL 129	7691.4	P			0,26	0,70										0,05	0,00					0,04	
BDL 129	7691.4	Pr.			1,41	1,25										1,17	1,15					1,08	
BDL 129	7691.6	P		0,25	0,04	0,34		0,16			0,02			0,16		0,33	0,12						
BDL 129	7691.6	Pr.		1,88	1,34	1,38		1,34			1,28			1,34		1,26	1,16						
BDL 129	7692.2	P			0,50	0,09		0,51			0,51			0,51		0,42							
BDL 129	7692.2	Pr.			11,0 3	1,77		6,06			7,47			6,06		1,15							
BDL 129	7692.6	P			0,06	0,68																	
BDL 129	7692.6	Pr.			1,31	1,19																	
BDL 129	7693.1	P			0,50			0,50			0,49			0,50		0,00						0,17	
BDL 129	7693.1	Pr.			12,7 0			6,16			3,58			6,16		1,21						1,14	
BDL 130	7663.1	P			0,35			0,08				0,66		0,08				0,33				0,03	
BDL 130	7663.1	Pr.			1,26			1,14				1,15		1,14				1,16				1,13	
BDL 130	7663.3	P		0,43	0,33	0,27		0,01	0,19		0,03	0,05		0,01	0,19	0,03	0,13						

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par.	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55
BDL 130	7663.3	Pr.		6,12	1,67	1,82		1,41	1,13		1,21	1,43		1,41	1,13	1,35	1,28						
BDL 130	7663.6	P				0,11																	
BDL 130	7663.6	Pr.				1,24																	
BDL 130	7664.5	P																					
BDL 130	7664.5	Pr.																					
BDL 131	7461.2	P			0,38			0,00			0,00			0,00						0,17			
BDL 131	7461.2	Pr.			1,16			1,30			1,16			1,30						1,25			
BDL 131	7461.4	P																		0,16			
BDL 131	7461.4	Pr.																		1,17			
BDL 131	7462.2	P																					
BDL 131	7462.2	Pr.																					
BDL 131	7463.4	P			0,41			0,16				0,01		0,16			0,00						
BDL 131	7463.4	Pr.			1,26			1,21				1,24		1,21			1,09						
BDL 131	7464.5	P			0,57	0,34		0,06			0,26			0,06		0,00	0,03			0,11			
BDL 131	7464.5	Pr.			1,13	1,57		1,14			1,25			1,14		1,27	1,15			1,16			
BDL 132	7471.1	P		0,00		0,43	0,05						0,05										
BDL 132	7471.1	Pr.		1,79		1,10	1,74						1,74										
BDL 132	7471.4	P					0,72						0,72							0,60			
BDL 132	7471.4	Pr.					1,21						1,21							1,27			
BDL 132	7472.4	P		0,45	0,27	0,03	0,45						0,45			0,02							
BDL 132	7472.4	Pr.		1,89	1,15	1,31	1,30						1,30			1,17							
BDL 132	7473.1	P			0,47			0,46			0,50			0,46									
BDL 132	7473.1	Pr.			4,65			4,79			69,02			4,79									
BDL 132	7474.4	P		0,93	0,50	0,68		0,51			0,49			0,51		0,06	0,04						
BDL 132	7474.4	Pr.		1,24	8,05	1,24		5,70			10,13			5,70		1,28	1,15						
BDL 132	7471.1	P				0,50					0,23												
BDL 132	7471.1	Pr.				1,28					1,24												
BDL 132	7471.4	P			0,45		0,10						0,10					0,41					

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par.	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55
BDL 132	7471.4	Pr.			1,84		1,16						1,16					1,25					
BDL 132	7472.4	P				0,49			0,10						0,10			0,57					0,81
BDL 132	7472.4	Pr.				1,87			1,09						1,09			1,34					1,14
BDL 132	7473.1	P	0,63		0,29	0,61			0,28		0,03				0,28								0,21
BDL 132	7473.1	Pr.	1,20		1,38	1,36			1,23		1,21				1,23								1,11
BDL 132	7475.4	P		0,37						0,70	0,51												
BDL 132	7475.4	Pr.		1,75						1,11	1,16												
BDL 133	8161.1	P		0,02		0,56				0,74													
BDL 133	8161.1	Pr.		2,12		1,17				1,43													
BDL 133	8161.2	P				0,34																	
BDL 133	8161.2	Pr.				1,16																	
BDL 133	8161.3	P	0,32	0,48	0,66		0,73	0,63		0,60		0,30	0,73	0,63				0,32	0,02		0,15		
BDL 133	8161.3	Pr.	1,12	15,21	1,24		1,31	1,13		1,76		1,22	1,31	1,13				1,11	1,21		1,16		
BDL 133	8161.4	P	0,16	0,36		0,12			0,24		0,00				0,24	0,05	0,04	0,43					
BDL 133	8161.4	Pr.	1,13	1,48		1,24			1,13		1,43				1,13	1,08	1,12	1,17					
BDL 133	8162.1	P				0,07										0,42	0,01						
BDL 133	8162.1	Pr.				1,39										1,10	1,13						
BDL 133	8162.3	P										0,19				0,03	0,04					0,58	
BDL 133	8162.3	Pr.										1,13				1,09	1,07					1,34	
BDL 133	8162.5	P						0,02						0,02				0,10			0,06		
BDL 133	8162.5	Pr.						1,20						1,20				1,16			1,25		
BDL 133	8163.2	P			0,51													0,51			0,27		
BDL 133	8163.2	Pr.			1,38													1,13			1,27		
BDL 134	7671.2	P		0,40		0,02			0,26	0,57		0,11			0,26	0,11	0,01						
BDL 134	7671.2	Pr.		3,72		1,79			1,15	3,46		1,22			1,15	1,21	1,17						
BDL 134	7672.1	P		0,26	0,44			0,08			0,49	0,00		0,08		0,05	0,05	0,50				0,00	
BDL 134	7672.1	Pr.		4,40	1,24			1,26			1,14	1,29		1,26		1,08	1,10	1,12				1,25	
BDL 134	7673.1	P		0,46	0,16	0,07		0,07			0,01			0,07		0,02						0,02	

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par.	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55
BDL 134	7673.1	Pr.		13,42	1,44	1,30		1,14			1,37			1,14		1,23					1,13		
BDL 134	7673.2	P		0,02	0,16			0,15				0,32		0,15		0,00	0,00						
BDL 134	7673.2	Pr.		1,63	1,28			1,18				1,12		1,18		1,16	1,10						
BDL 135	7722.1	P			0,47			0,29						0,29									
BDL 135	7722.1	Pr.			1,18			1,16						1,16									
BDL 135	7723.1	P			0,56		0,62	0,03		0,57	0,54		0,62	0,03									
BDL 135	7723.1	Pr.			1,14		2,29	1,18		3,83	1,22		2,29	1,18									
BDL 135	7723.3	P															0,21				0,40		
BDL 135	7723.3	Pr.															1,22				1,15		
BDL 135	7723.8	P				0,74		0,25				0,56		0,25			0,01						
BDL 135	7723.8	Pr.				1,15		1,12				1,13		1,12			1,10						
BDL 135	7723.9	P				0,71												0,55			0,47	0,09	
BDL 135	7723.9	Pr.				1,14												1,20			1,15	1,03	
BDL 136	7751.4	P			0,05			0,13						0,13								0,01	
BDL 136	7751.4	Pr.			1,51			1,12						1,12								1,18	
BDL 136	7751.5	P		0,38	0,39	0,42		0,24			0,40	0,42		0,24		0,02	0,01	0,33					
BDL 136	7751.5	Pr.		1,51	1,34	1,11		1,11			1,11	1,12		1,11		1,10	1,08	1,10					
BDL 136	7751.8	P	0,12															0,00					
BDL 136	7751.8	Pr.	1,10															1,24					
BDL 136	7752.6	P			0,40						0,16					0,06	0,21						
BDL 136	7752.6	Pr.			1,16						1,16					1,20	1,11						
BDL 137	7701.2	P		0,50	0,52		0,75	0,13		0,73	0,41	0,41	0,75	0,13				0,27					
BDL 137	7701.2	Pr.		14,76	1,24		1,41	1,25		1,42	1,11	1,14	1,41	1,25				1,10					
BDL 137	7701.5	P		0,53		0,64						0,05				0,01	0,10				0,62		
BDL 137	7701.5	Pr.		1,50		1,25						1,14				1,22	1,15				1,13		
BDL 137	7701.6	P				0,76		0,55						0,55					0,77				
BDL 137	7701.6	Pr.				1,13		1,11						1,11					1,11				
BDL 137	7702.1	P		0,05	0,37	0,03		0,17	0,25		0,16			0,17	0,25	0,07	0,15						

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par.	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55
BDL 137	7702.1	Pr.		2,52	1,20	1,51		1,25	1,13		1,43			1,25	1,13	1,24	1,19						
BDL 137	7703.2	P	0,18		0,10							0,07									0,37		
BDL 137	7703.2	Pr.	1,24		1,43							1,19									1,15		
BDL 137	7703.3	P			0,34	0,21		0,67	0,22			0,00		0,67	0,22	0,00	0,14	0,48					
BDL 137	7703.3	Pr.			1,27	1,35		1,11	1,15			1,29		1,11	1,15	1,27	1,16	1,17					
BDL 137	7703.7	P			0,15			0,02				0,10		0,02		0,06	0,18						
BDL 137	7703.7	Pr.			1,32			1,21				1,12		1,21		1,23	1,13						
BDL 139	8131.1	P																					
BDL 139	8131.1	Pr.																					
BDL 139	8131.2	P	0,25	0,01	0,63			0,56			0,05	0,26		0,56		0,08	0,02				0,10		
BDL 139	8131.2	Pr.	1,19	1,83	1,16			1,13			1,23	1,16		1,13		1,15	1,15				1,19		
BDL 139	8132.7	P																					
BDL 139	8132.7	Pr.																					
BDL 139	8133.2	P																					
BDL 139	8133.2	Pr.																					
BDL 141	8141.2	P									0,15					0,15	0,05						
BDL 141	8141.2	Pr.									1,16					1,11	1,12						
BDL 141	8142.2	P																					
BDL 141	8142.2	Pr.																					
BDL 142	8282.1	P	0,03	0,43	0,62			0,20			0,03	0,10		0,20		0,01	0,00	0,68					
BDL 142	8282.1	Pr.	1,16	1,25	1,25			1,14			1,20	1,12		1,14		1,24	1,19	1,11					
BDL 142	8283.1	P	0,41	0,33	0,52			0,11		0,59		0,16		0,11									
BDL 142	8283.1	Pr.	1,23	8,56	1,27			1,16		2,47		1,28		1,16									
BDL 142	8283.2	P	0,27		0,05			0,30			0,48			0,30					0,32		0,43		
BDL 142	8283.2	Pr.	1,14		1,42			1,18			1,15			1,18					1,12		1,20		
BDL 142	8284.1	P			0,83	0,57		0,41			0,38			0,41									
BDL 142	8284.1	Pr.			1,11	1,14		1,16			1,32			1,16									
BDL 142	8285.3	P	0,03	0,34	0,65			0,41	0,44	0,57	0,01	0,18		0,41	0,44	0,00	0,00				0,63		

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par.	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55
BDL 142	8285.3	Pr.	1,17	2,67	1,20			1,22	1,16	2,90	1,31	1,21		1,22	1,16	1,27	1,16			1,12			
BDL 142	8285.5	P																0,49					
BDL 142	8285.5	Pr.																1,13					
BDL 143	8411.1	P	0,40								0,37												
BDL 143	8411.1	Pr.	1,21								1,24												
BDL 143	8411.5	P						0,54				0,54		0,54			0,03		0,38	0,24			
BDL 143	8411.5	Pr.						1,13				1,10		1,13			1,08		1,10	1,21			
BDL 143	8412.2	P		0,43		0,01		0,03				0,14		0,03		0,03	0,00						0,05
BDL 143	8412.2	Pr.		1,32		1,54		1,22				1,28		1,22		1,32	1,24						1,03
BDL 143	8412.4	P				0,01			0,47		0,56	0,03			0,47	0,00	0,00						
BDL 143	8412.4	Pr.				2,08			1,18		1,17	1,30			1,18	1,37	1,29						
BDL 143	8413.3	P		0,02	0,15			0,18				0,00		0,18		0,24	0,05						
BDL 143	8413.3	Pr.		1,72	1,35			1,11				1,24		1,11		1,18	1,16						
BDL 143	8414.4	P				0,36					0,79					0,16	0,00						
BDL 143	8414.4	Pr.				1,18					1,15					1,11	1,18						
BDL 143	8414.5	P		0,16												0,11	0,01						
BDL 143	8414.5	Pr.		1,17												1,23	1,19						
BDL 144	8384.1	P		0,58		0,28		0,18				0,41		0,18		0,03	0,00						0,03
BDL 144	8384.1	Pr.		1,33		1,47		1,13				1,18		1,13		1,29	1,21						1,03
BDL 144	8384.5	P				0,08			0,14						0,14	0,00	0,01						
BDL 144	8384.5	Pr.				1,45			1,20						1,20	1,33	1,32						
BDL 144	8385.1	P		0,00	0,76	0,06		0,40	0,05			0,23		0,40	0,05	0,12	0,04						
BDL 144	8385.1	Pr.		3,33	1,11	1,69		1,24	1,20			1,40		1,24	1,20	1,44	1,33						
BDL 145	8233.2	P		0,15	0,05			0,13			0,15				0,13								
BDL 145	8233.2	Pr.		1,48	1,51			1,23			1,14				1,23								
BDL 145	8233.3	P		0,39		0,02		0,58	0,56		0,05	0,00		0,58	0,56	0,11	0,10						
BDL 145	8233.3	Pr.		14,58		1,62		1,15	1,12		1,28	1,28		1,15	1,12	1,27	1,21						
BDL 145	8235.1	P		0,30		0,15						0,21				0,05	0,17	0,19					

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par.	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55
BDL 145	8235.1	Pr.		1,19		1,53						1,20				1,08	1,12	1,10					
BDL 145	8235.3	P		0,19		0,02			0,29		0,39	0,11			0,29	0,02	0,03						
BDL 145	8235.3	Pr.		5,48		1,65			1,20		1,31	1,27			1,20	1,21	1,15						
BDL 145	8235.4	P																					
BDL 145	8235.4	Pr.																					
BDL 146	8241.1	P			0,17																		
BDL 146	8241.1	Pr.			1,32																		
BDL 146	8241.3	P	0,31	0,60					0,00			0,00			0,00	0,00	0,00	0,47			0,02		
BDL 146	8241.3	Pr.	1,18	1,24					1,17			1,35			1,17	1,16	1,15	1,11			1,15		
BDL 146	8243.2	P						0,20						0,20		0,00	0,02						
BDL 146	8243.2	Pr.						1,14						1,14		1,20	1,15						
BDL 146	8243.5	P		0,73	0,33	0,44		0,03				0,00		0,03		0,10	0,01						
BDL 146	8243.5	Pr.		1,22	1,43	1,42		1,23				1,39		1,23		1,19	1,10						
BDL 146	8244.4	P	0,43		0,19		0,58	0,08		0,67	0,43		0,58	0,08				0,17					
BDL 146	8244.4	Pr.	1,15		1,26		2,83	1,16		1,68	1,21		2,83	1,16				1,17					
BDL 146	8244.7	P		0,00	0,61	0,23		0,15			0,07			0,15		0,04	0,15						
BDL 146	8244.7	Pr.		1,96	1,18	1,39		1,14			1,33			1,14		1,18	1,19						
BDL 146	8245.2	P			0,10			0,03			0,02			0,03							0,38		
BDL 146	8245.2	Pr.			1,34			1,18			1,50			1,18							1,35		
BDL 146	8245.5	P																0,20	0,22		0,06		
BDL 146	8245.5	Pr.																1,24	1,21		1,44		
BDL 42	7771.1	P																					
BDL 42	7771.1	Pr.																					
BDL 42	7772.1	P																					
BDL 42	7772.1	Pr.																					
BDL 42	7772.7	P																					
BDL 42	7772.7	Pr.																					
BDL 42	7774.1	P		0,07	0,58	0,00			0,06		0,24	0,12			0,06	0,00	0,01						

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par.	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55
BDL 42	7774.1	Pr.		5,75	1,14	1,59			1,11		1,21	1,19			1,11	1,31	1,27						
BDL 42	7774.2	P																					
BDL 42	7774.2	Pr.																					
BDL 42	7774.4	P		0,47		0,01										0,06	0,21						
BDL 42	7774.4	Pr.		4,18		1,81										1,36	1,21						
BDL 46	7833.3	P		0,02	0,32	0,45		0,19						0,19		0,16	0,00		0,54				
BDL 46	7833.3	Pr.		1,37	1,44	1,68		1,36						1,36		1,30	1,15		1,15				
BDL 46	7833.4	P			0,56														0,00				
BDL 46	7833.4	Pr.			1,19														1,40				
BDL 46	7833.5	P		0,47	0,45	0,51	0,54						0,54			0,04	0,07		0,19				
BDL 46	7833.5	Pr.		2,25	1,14	1,32	1,31						1,31			1,14	1,03		1,15				
BDL 46	7833.6	P			0,14	0,30		0,61						0,61		0,63			0,22				
BDL 46	7833.6	Pr.			1,21	1,24		1,19						1,19		1,16			1,52				
BDL 46	7834.1	P				0,75						0,46				0,33	0,00					0,01	
BDL 46	7834.1	Pr.				1,13						1,15				1,15	1,09					1,07	
BDL 46	7833.1	P		0,20	0,43	0,09		0,02			0,21	0,39		0,02				0,12					0,02
BDL 46	7833.1	Pr.		2,16	1,47	1,70		1,18			1,32	1,20		1,18				1,12					1,14
BDL 46	7833.3	P				0,81																	
BDL 46	7833.3	Pr.				1,20																	
BDL 46	7833.4	P				0,33												0,73					0,75
BDL 46	7833.4	Pr.				1,73												1,25					1,25
BDL 46	7833.5	P		0,65		0,17						0,32											
BDL 46	7833.5	Pr.		1,14		1,77						1,24											
BDL 46	7834.4	P	0,02	0,27		0,02			0,02		0,29	0,00			0,02								
BDL 46	7834.4	Pr.	1,22	1,96		2,26			1,29		1,13	1,33			1,29								
BDL 51	7291.1	P		0,19	0,78	0,00	0,31			0,81	0,49	0,04	0,31			0,04	0,01					0,00	
BDL 51	7291.1	Pr.		3,97	1,19	1,77	1,82			1,21	1,32	1,23	1,82			1,22	1,09					1,13	
BDL 51	8021.1	P				0,02	0,93	0,50	0,13				0,93	0,50	0,13	0,10	0,11						

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par.	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55
BDL 51	8021.1	Pr.				3,28	1,18	26,01	1,15				1,18	26,01	1,15	1,69	1,24						
BDL 51	8022.4	P			0,04	0,03		0,34		0,77		0,40		0,34		0,18	0,00						
BDL 51	8022.4	Pr.			2,98	2,43		1,54		1,17		1,15		1,54		1,41	1,19						
BDL 51	8022.5	P	0,35	0,44	0,44	0,13			0,03			0,50			0,03	0,11	0,01					0,07	
BDL 51	8022.5	Pr.	1,19	4,24	2,39	3,03			1,43			1,25			1,43	1,26	1,14					1,05	
BDL 51	8024.4	P		0,39	0,00	0,28	0,66	0,53	0,30	0,55	0,28		0,66	0,53	0,30	0,49							
BDL 51	8024.4	Pr.		3,38	1,69	1,63	1,32	1,30	1,15	1,30	1,26		1,32	1,30	1,15	1,14							
BDL 51	8024.7	P			0,33	0,37		0,41						0,41					0,35				
BDL 51	8024.7	Pr.			1,29	1,39		1,21						1,21					1,24				
BDL 52	7861.1	P		0,72		0,57	0,61						0,61						0,30				
BDL 52	7861.1	Pr.		1,25		1,24	1,18						1,18						1,38				
BDL 52	7861.5	P			0,11	0,68		0,01						0,01		0,36	0,10						
BDL 52	7861.5	Pr.			1,31	1,14		1,27						1,27		1,17	1,12						
BDL 52	7863.2	P				0,82											0,07				0,14	0,02	
BDL 52	7863.2	Pr.				1,21											1,03				1,11	1,09	
BDL 52	7864.5	P				0,61	0,76	0,71			0,40		0,76	0,71					0,39				
BDL 52	7864.5	Pr.				1,25	1,17	1,10			1,26		1,17	1,10					1,35				
BDL 54	7781.1	P			0,50	0,73		0,50			0,47			0,50		0,01	0,00						
BDL 54	7781.1	Pr.			13,0 3	1,16		6,59			3,90			6,59		1,12	1,09						
BDL 54	7781.4	P		0,06	0,09	0,78		0,27			0,55			0,27			0,00		0,50				
BDL 54	7781.4	Pr.		1,28	1,25	1,13		1,19			1,22			1,19			1,09		1,31				
BDL 54	7784.3	P		0,87	0,49	0,16		0,48	0,05		0,49	0,06		0,48	0,05	0,00	0,05		0,22				
BDL 54	7784.3	Pr.		1,49	9,56	1,68		5,77	1,15		14,83	1,26		5,77	1,15	1,35	1,15		1,12				
BDL 54	7784.5	P		0,44				0,47			0,07			0,47		0,23			0,75				
BDL 54	7784.5	Pr.		1,49				1,19			1,27			1,19		1,15			1,12				
BDL 54	7785.4	P		0,16	0,06			0,36				0,00		0,36		0,25	0,15		0,16				
BDL 54	7785.4	Pr.		1,52	1,40			1,22				1,30		1,22		1,16	1,12		1,20				
BDL 54	7781.1	P		0,55	0,19	0,08			0,23			0,10				0,23							

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par.	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55
BDL 54	7781.1	Pr.		1,50	1,33	3,05			1,13			1,27			1,13								
BDL 54	7781.4	P		0,04	0,25	0,01			0,52		0,00				0,52								0,15
BDL 54	7781.4	Pr.		1,87	1,36	1,85			1,18		1,37				1,18								1,19
BDL 54	7784.3	P		0,49	0,47	0,43			0,02			0,03			0,02								
BDL 54	7784.3	Pr.		1,54	1,37	1,81			1,14			1,30			1,14								
BDL 54	7785.4	P				0,40						0,67						0,34					0,26
BDL 54	7785.4	Pr.				1,57						1,13						1,18					1,20
BDL 54	7785.8	P			0,41						0,07	0,10											0,32
BDL 54	7785.8	Pr.			1,39						1,21	1,28											1,21
BDL 56	7181.2	P			0,51	0,51		0,50			0,43			0,50		0,00	0,00		0,70				
BDL 56	7181.2	Pr.			3,81	1,79		3,28			3,75			3,28		1,42	1,19		1,13				
BDL 56	8301.1	P															0,01		0,05				
BDL 56	8301.1	Pr.															1,05		1,24				
BDL 56	8301.3	P			0,42			0,64				0,34		0,64									
BDL 56	8301.3	Pr.			1,10			1,15				1,11		1,15									
BDL 56	8304.1	P				0,40																	
BDL 56	8304.1	Pr.				1,12																	
BDL 56	8305.1	P		0,19	0,52		0,76	0,71					0,76	0,71					0,23				
BDL 56	8305.1	Pr.		1,17	1,26		1,11	1,13					1,11	1,13					1,20				
BDL 56	8301.1	P	0,64	0,70	0,70	0,65			0,41			0,40			0,41								
BDL 56	8301.1	Pr.	1,21	1,29	1,11	1,33			1,15			1,19			1,15								
BDL 56	8301.2	P		0,44		0,13			0,01		0,01	0,12			0,01								0,07
BDL 56	8301.2	Pr.		2,00		1,67			1,17		1,30	1,32			1,17								1,10
BDL 56	8301.3	P		0,23	0,23	0,63	0,61				0,38		0,61										0,25
BDL 56	8301.3	Pr.		1,11	1,70	1,46	1,18				1,36		1,18										1,11
BDL 56	8303.1	P				0,53																	
BDL 56	8303.1	Pr.				1,39																	
BDL 56	8303.2	P			0,29	0,39	0,16						0,16						0,57				

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par.	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55
BDL 56	8303.2	Pr.			1,32	1,78	1,12						1,12				1,11						
BDL 59	7792.1	P														0,02							
BDL 59	7792.1	Pr.														1,10							
BDL 59	7792.2	P				0,70					0,20												
BDL 59	7792.2	Pr.				1,19					1,16												
BDL 59	7792.3	P				0,31											0,04						
BDL 59	7792.3	Pr.				1,43											1,06						
BDL 59	7793.3	P		0,66	0,04		0,57	0,56					0,57	0,56		0,36			0,20				
BDL 59	7793.3	Pr.		1,48	1,43		1,40	1,11					1,40	1,11		1,24			1,14				
BDL 59	7794.1	P			0,13			0,01			0,36			0,01		0,02	0,00						
BDL 59	7794.1	Pr.			7,90			6,46			4,80			6,46		1,13	1,09						
BDL 60	8011.4	P														0,29			0,03		0,12		
BDL 60	8011.4	Pr.														1,13			1,24		1,15		
BDL 60	8011.7	P			0,49	0,00		0,48			0,47	0,06		0,48		0,15	0,04		0,38		0,04		
BDL 60	8011.7	Pr.			10,8 5	1,51		5,59			2,44	1,28		5,59		1,37	1,18		1,11		1,18		
BDL 60	8013.4	P		0,97		0,39		0,50	0,38		0,49	0,35		0,50	0,38	0,06	0,00		0,60				
BDL 60	8013.4	Pr.		1,10		1,66		27,18	1,13		16,70	1,20		27,18	1,13	1,56	1,19		1,15				
BDL 60	8013.6	P		0,35		0,74		0,62	0,14		0,25			0,62	0,14	0,00	0,08						
BDL 60	8013.6	Pr.		2,43		1,34		1,18	1,10		1,12			1,18	1,10	1,53	1,19						
BDL 60	8014.5	P		0,48		0,10	0,61			0,72	0,37		0,61			0,07	0,08						
BDL 60	8014.5	Pr.		3,21		1,73	1,43			1,20	1,12		1,43			1,38	1,17						
BDL 60	8013.6	P		0,78		0,59			0,02		0,24	0,35			0,02								
BDL 60	8013.6	Pr.		1,15		1,37			1,12		1,22	1,15			1,12								
BDL 60	8014.2	P		0,02		0,01					0,02	0,01											
BDL 60	8014.2	Pr.		2,03		2,05					1,35	1,19											
BDL 60	8014.7	P		0,40	0,17	0,72		0,07			0,01	0,04		0,07									
BDL 60	8014.7	Pr.		1,23	1,32	1,20		1,22			1,33	1,17		1,22									
BDL 60	8014.8	P			0,72	0,01	0,46		0,14	0,61	0,29		0,46		0,14			0,25					0,10

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par.	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55
BDL 60	8014.8	Pr.			1,53	1,95	1,30		1,10	1,19	1,18		1,30		1,10			1,16					1,24
BDL 65	7824.1	P		0,73		0,69						0,27				0,13	0,18						
BDL 65	7824.1	Pr.		1,40		1,11						1,13				1,44	1,22						
BDL 65	7825.2	P			0,20	0,56						0,03				0,00	0,05						
BDL 65	7825.2	Pr.			1,25	1,33						1,33				1,27	1,14						
BDL 65	8473.2	P		0,10	0,37	0,00		0,01	0,01	0,45	0,50	0,05		0,01	0,01	0,00	0,00						
BDL 65	8473.2	Pr.		4,55	1,17	1,69		1,27	1,22	3,42	1,42	1,33		1,27	1,22	1,25	1,18						
BDL 65	8474.1	P				0,58											0,01						
BDL 65	8474.1	Pr.				1,11											1,08						
BDL 67	7901.5	P		0,42	0,46	0,00	0,52					0,38	0,52			0,00	0,00		0,31			0,02	
BDL 67	7901.5	Pr.		1,92	1,10	1,70	1,27					1,13	1,27			1,29	1,15		1,13			1,14	
BDL 67	7902.3	P	0,30		0,48			0,48			0,50	0,50		0,48		0,12	0,21		0,04			0,00	
BDL 67	7902.3	Pr.	1,22		8,10			5,44			20,18	1,19		5,44		1,36	1,13		1,40			1,11	
BDL 67	7902.7	P			0,49	0,12		0,50	0,08		0,50			0,50	0,08	0,04	0,04				0,44	0,00	
BDL 67	7902.7	Pr.			8,01	1,43		6,31	1,13		6,95			6,31	1,13	1,42	1,16				1,16	1,11	
BDL 67	7903.3	P		0,52	0,33											0,19			0,19				
BDL 67	7903.3	Pr.		1,23	1,21											1,18			1,46				
BDL 67	7903.5	P	0,26	0,00		0,35	0,47		0,00			0,15	0,47		0,00	0,00	0,13						
BDL 67	7903.5	Pr.	1,10	3,19		1,61	1,29		1,26			1,39	1,29		1,26	1,34	1,13						
BDL 68	7761.3	P				0,26		0,49			0,50			0,49		0,34	0,00						
BDL 68	7761.3	Pr.				1,25		12,65			24,18			12,65		1,21	1,14						
BDL 68	7761.8	P		0,48	0,50	0,01		0,19	0,08		0,36	0,08		0,19	0,08	0,00	0,08		0,27				
BDL 68	7761.8	Pr.		10,41	1,23	1,49		1,67	1,18		1,42	1,41		1,67	1,18	1,36	1,16		1,18				
BDL 68	7761.9	P				0,25	0,49	0,44		0,59	0,13	0,00	0,49	0,44		0,00	0,00						
BDL 68	7761.9	Pr.				1,73	2,09	1,22		1,23	1,69	1,45	2,09	1,22		1,52	1,18						
BDL 68	7763.2	P		0,40		0,03	0,51		0,02	0,75	0,05	0,20	0,51		0,02	0,00	0,04		0,29		0,22		
BDL 68	7763.2	Pr.		3,14		1,55	1,54		1,18	1,20	1,46	1,21	1,54		1,18	1,32	1,13		1,31		1,13		
BDL 68	7764.1	P		0,55	0,50	0,33		0,49	0,03		0,47	0,01		0,49	0,03	0,09	0,24		0,33				

ES 2 674 256 T3

Gen	Ev.	Par.	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55
BDL 68	7764.1	Pr.		10,21	13,08	1,50		7,93	1,16		5,30	1,27		7,93	1,16	1,47	1,17		1,13				
BDL 78	7911.11	P	0,13		0,52							0,35				0,00	0,12						
BDL 78	7911.11	Pr.	1,12		1,17							1,23				1,20	1,14						
BDL 78	7911.8	P	0,51		0,64				0,07			0,22			0,07	0,05	0,08						
BDL 78	7911.8	Pr.	1,15		1,26				1,07			1,11			1,07	1,12	1,13						
BDL 78	7911.9	P		0,22		0,00		0,06			0,38	0,39		0,06		0,07	0,00			0,19	0,37		
BDL 78	7911.9	Pr.		7,52		1,82		1,19			1,17	1,16		1,19		1,37	1,27			1,22	1,12		
BDL 78	7912.6	P			0,58	0,14		0,20			0,24			0,20			0,02			0,37			
BDL 78	7912.6	Pr.			1,10	1,31		1,19			1,22			1,19			1,09			1,11			
BDL 78	7913.11	P	0,20	0,21				0,14	0,29		0,53	0,36		0,14	0,29	0,00	0,00						
BDL 78	7913.11	Pr.	1,18	1,99				1,13	1,11		1,23	1,43		1,13	1,11	1,19	1,15						
BDL 78	7913.3	P																			0,03	0,04	
BDL 78	7913.3	Pr.																			1,14	1,03	
BDL 78	7913.6	P		0,42		0,04		0,09			0,61	0,01		0,09		0,00	0,01						
BDL 78	7913.6	Pr.		11,13		1,45		1,21			1,23	1,22		1,21		1,27	1,22						
BDL 78	7913.8	P			0,11			0,07				0,04		0,07		0,21	0,00		0,37	0,02			
BDL 78	7913.8	Pr.			1,33			1,16				1,15		1,16		1,25	1,16		1,11	1,19			
BDL 78	7913.9	P		0,48		0,63			0,24	0,54		0,01			0,24	0,16	0,07						
BDL 78	7913.9	Pr.		1,85		1,26			1,16	5,72		1,22			1,16	1,15	1,10						
BDL 82	7801.1	P		0,31		0,01	0,23		0,05	0,37		0,27	0,23		0,05	0,07	0,02		0,63			0,03	
BDL 82	7801.1	Pr.		3,94		1,88	1,44		1,14	1,45		1,41	1,44		1,14	1,41	1,15		1,13			1,07	
BDL 82	7801.3	P		0,39			0,47			0,51			0,47			0,13	0,00						
BDL 82	7801.3	Pr.		13,27			1,36			1,21			1,36			1,44	1,21						
BDL 82	7802.2	P		0,41		0,46	0,52				0,07	0,45	0,52			0,00	0,16						
BDL 82	7802.2	Pr.		3,78		1,20	1,54				1,34	1,17	1,54			1,17	1,12						
BDL 82	7802.3	P		0,18	0,02	0,45		0,32			0,12	0,06		0,32		0,13	0,00						
BDL 82	7802.3	Pr.		2,14	1,41	1,40		1,14			1,16	1,24		1,14		1,30	1,16						
BDL 82	7803.9	P						0,54						0,54					0,28				

Gen	Ev.	Par.	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55
BDL 82	7803.9	Pr.						1,18						1,18					1,35				
BDL 89	7812.2	P		0,67		0,26						0,42											
BDL 89	7812.2	Pr.		1,12		1,17						1,13											
BDL 89	7812.5	P			0,51			0,51	0,18		0,50			0,51	0,18	0,11	0,18						0,03
BDL 89	7812.5	Pr.			12,2 4			5,84	1,18		16,66			5,84	1,18	1,26	1,12						1,04
BDL 89	7814.1	P			0,23	0,39		0,58				0,06		0,58		0,00	0,00						
BDL 89	7814.1	Pr.			1,16	1,14		1,16				1,16		1,16		1,17	1,04						
BDL 89	7814.4	P			0,47	0,42		0,46	0,05		0,48	0,43		0,46	0,05	0,36	0,21						
BDL 89	7814.4	Pr.			9,40	2,02		5,59	1,17		6,76	1,21		5,59	1,17	1,24	1,13						
BDL 89	7814.5	P		0,47		0,26	0,46			0,52	0,20	0,15	0,46			0,02	0,05		0,00				0,10
BDL 89	7814.5	Pr.		7,62		1,57	1,98			1,65	1,26	1,14	1,98			1,38	1,21		1,59				1,15

Tabla 27

EJEMPLO 8**EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE LA PLANTA ARABIDOPSIS TRANSGÉNICA BAJO ESTRES ABIÓTICO Y CONDICIONES DE DEFICIENCIA DE NITRÓGENO EN EL ENSAYO DE CULTIVO TISULAR**

5 **Ensayo 1: crecimiento de plantas bajo estrés osmótico [poli(etilenglicol) (PEG)] en condiciones de cultivo tisular-** Una de las consecuencias de la sequía es la inducción de estrés osmótico en la zona que rodea las raíces; por lo tanto, en muchos estudios científicos, se usa PEG (por ejemplo, PEG8000 al 1,5%) para simular las condiciones de estrés osmótico que se asemejan a la alta osmolaridad encontrada durante el estrés por sequía.

10 Las semillas esterilizadas en superficie se sembraron en medio basal [medio Murashige-Skoog (MS) al 50 % complementado con agar de planta al 0,8 % como agente solidificante] en presencia de Kanamicina (para seleccionar sólo plantas transgénicas). Después de la siembra, las placas se transfirieron durante 2-3 días para la estratificación a 4 °C y a continuación se cultivaron a 25 °C bajo ciclos diarios de 12 horas de luz-12 horas de oscuridad durante de 7 a 10 días. En este punto temporal, las plántulas elegidas al azar se transfirieron cuidadosamente a placas que contenían PEG al 1,5%: medio MS a 0,5 o condiciones de cultivo normales (medio MS a 0,5). Cada placa contenía 5 plántulas del mismo evento transgénico, y 3-4 placas diferentes (repeticiones) para cada evento. Para cada polinucleótido de la invención, se analizaron al menos cuatro eventos de transformación independientes de cada construcción. Las plantas que expresan los polinucleótidos de la invención se compararon con la medición promedio de las plantas de control (vector vacío o gen indicador GUS bajo el mismo promotor) usadas en el mismo experimento.

20 **Ensayo 2: crecimiento de plantas con deficiencia de nitrógeno en condiciones de cultivo tisular -** Los inventores de la presente invención han descubierto que el ensayo de eficiencia de uso de nitrógeno (EUN) es relevante para la evaluación de los genes candidatos de TEAB, ya que la deficiencia de nitrógeno estimula el alargamiento de la raíz, el aumento de la cobertura de la raíz y permite detectar el potencial de la planta para generar un mejor sistema radicular en condiciones de sequía. Además, hay indicaciones en la bibliografía de que los mecanismos biológicos de la EUN y la tolerancia a la sequía están vinculados (Wesley et al., 2002 Journal of Experiment Botany Vol 53, No.366, págs. 13-25).

30 Las semillas esterilizadas en superficie se sembraron en medio basal [medio Murashige-Skoog (MS) al 50 % complementado con agar de planta al 0,8 % como agente solidificante] en presencia de Kanamicina (para seleccionar sólo plantas transgénicas). Después de la siembra, las placas se transfirieron durante 2-3 días para la estratificación a 4 °C y a continuación se cultivaron a 25 °C bajo ciclos diarios de 12 horas de luz-12 horas de oscuridad durante de 7 a 10 días. En este punto temporal, las plántulas elegidas al azar se transfirieron cuidadosamente a placas con condiciones limitantes de nitrógeno: medio MS a 0,5 en el que la concentración de

5 nitrógeno combinada (NH_4NO_3 y KNO_3) es 0,75 mM (condiciones de deficiencia de nitrógeno). Cada placa contiene 5 plántulas del mismo evento, y 3-4 placas diferentes (repeticiones) para cada evento. Para cada polinucleótido de la invención, se analizaron al menos cuatro eventos de transformación independientes de cada construcción. Las plantas que expresan los polinucleótidos de la invención se compararon con la medición promedio de las plantas de control (vector vacío o indicador GUS bajo el mismo promotor) usadas en el mismo experimento.

Imagenología digital- Se usó un sistema de adquisición de imágenes en laboratorio, que consiste en una cámara reflex digital (Canon EOS 300D) conectada con una lente de 55 mm de distancia focal (serie Canon EF-S), montada en un dispositivo de reproducción (Kaiser RS), que incluía 4 unidades de iluminación (4 bombillas de iluminación de 150 vatios) y ubicado en un cuarto oscuro, para capturar imágenes de plántulas sembradas en placas de agar.

10 El proceso de captura de imágenes se repitió cada 2-5 días comenzando el día 1 hasta el día 10-15 (ver por ejemplo las imágenes en las figuras 2A-B)

15 Se usó un sistema de análisis de imágenes, que consiste en una computadora de escritorio personal (procesador Intel P4 a 3,0 GHz) y un programa de dominio público - ImageJ 1.39 (programa de procesamiento de imágenes basado en Java, desarrollado en los Institutos Nacionales de Salud de EE. UU., y disponible gratuitamente en Internet en Hypertext Transfer Protocol://rsbweb (.) nih (.) gov/). Las imágenes se capturaron con una resolución de 10 megapíxeles (3888 x 2592 píxeles) y se almacenaron en un formato de compresión baja JPEG (estandar Joint Photographic Experts Group). A continuación, los datos analizados se guardaron en archivos de texto y se procesaron usando el software de análisis estadístico JMP (instituto SAS).

20 **Análisis de plántulas**- se calculó el uso del análisis digital de los datos de las plántulas, incluyendo el área foliar, la cobertura de la raíz y la longitud de la raíz.

El ritmo de crecimiento relativo para los diversos parámetros de la plántula se calculó según las siguientes fórmulas.

Fórmula VI:

$$\text{Ritmo de crecimiento relativo del área de la hoja} = (\Delta \text{ área de roseta} / \Delta t) \times (1 / \text{área de roseta } t_1)$$

25 Δ del área de roseta es el intervalo entre el área de roseta actual (medida a t_2) y el área de roseta medida el día anterior (Área t_1)

Δt es el intervalo de tiempo ($t_2 - t_1$, en días) entre el día de la imagen analizada actual (t_2) y el día anterior (t_1).

Por lo tanto, el ritmo de crecimiento relativo del área foliar está en unidades de 1/día.

Fórmula VII:

$$\text{Ritmo de crecimiento relativo de la cobertura de la raíz} = (\Delta \text{ área de cobertura de la raíz} / \Delta t) \times (1 / \text{área de cobertura de la raíz } t_1)$$

30 Δ del área de cobertura de la raíz es el intervalo entre el área de cobertura de la raíz (medida a t_2) y el área de cobertura de la raíz medida el día anterior (Área t_1)

Δt es el intervalo de tiempo ($t_2 - t_1$, en días) entre el día de la imagen analizada actual (t_2) y el día anterior (t_1).

Por lo tanto, el ritmo de crecimiento relativo del área de cobertura de la raíz está en unidades de 1/día.

Fórmula VIII:

$$\text{Ritmo de crecimiento relativo de la longitud de la raíz} = (\Delta \text{ longitud de la raíz} / \Delta t) \times (1 / \text{longitud de la raíz } t_1)$$

35 Δ de la longitud de la raíz es el intervalo entre la longitud de la raíz (medida a t_2) y la longitud de la raíz medida el día anterior (Área t_1)

Δt es el intervalo de tiempo ($t_2 - t_1$, en días) entre el día de la imagen analizada actual (t_2) y el día anterior (t_1).

Por lo tanto, el ritmo de crecimiento relativo de la longitud de la raíz está en unidades de 1/día.

40 Al final del experimento, las plántulas se retiraron del medio y se pesaron para la determinación del peso fresco de la planta. Las plántulas se secaron a continuación durante 24 horas a 60 °C, y se pesaron de nuevo para medir el peso seco de la planta para su posterior análisis estadístico. El ritmo de crecimiento se determinó comparando la cobertura del área foliar, la cobertura de la raíz y la longitud de la raíz entre cada par de fotografías sucesivas, y los resultados se usaron para resolver el efecto del gen introducido sobre el vigor de la planta, bajo estrés osmótico así

como en condiciones óptimas. De forma similar, el efecto del gen introducido sobre la acumulación de biomasa, bajo estrés osmótico así como en condiciones óptimas, se determinó comparando el peso fresco y seco de las plantas con el de las plantas de control (que contienen un vector vacío o el gen indicador GUS bajo el mismo promotor). De cada construcción creada, se examinaron 3-5 eventos de transformación independientes en repeticiones.

5 **Análisis estadísticos-** Para identificar los genes que confieren tolerancia significativamente mejorada a los estreses abióticos o arquitectura de raíz ampliada, los resultados obtenidos de las plantas transgénicas se compararon con los obtenidos de las plantas de control. Para identificar los genes y construcciones de rendimiento extraordinario, los resultados de los eventos de transformación independientes evaluados se analizaron por separado. Para evaluar el efecto de un evento génico sobre un control, los datos se analizaron mediante la prueba de la t de Student y se calculó el valor p. Los resultados se consideraron significativos si $p \leq 0,1$. Se usó el paquete de software de estadística de JMP (Versión 5.2.1, SAS Institute Inc., Cary, NC, EE. UU.).

10 **Resultados experimentales-** Las secuencias de polinucleótidos de la invención se ensayaron para una serie de rasgos comercialmente deseados. La tabla 28 proporciona los parámetros medidos en un ensayo de cultivo tisular (los resultados se presentan en las tablas 29 y 30). En los casos en que un determinado evento aparece más de una vez, el evento se ensayó en varios experimentos independientes.

Tabla 28

Símbolo de parámetro usado en la tabla de resultados 29	Nombre del parámetro
1	Área de la hoja, punto temporal 1
2	Área de la hoja, punto temporal 2
3	Área de la hoja, punto temporal 3
4	Longitud de las raíces, punto temporal 1
5	Longitud de las raíces, punto temporal 2
6	Longitud de las raíces, punto temporal 3
7	Cobertura de las raíces, punto temporal 1
8	Cobertura de las raíces, punto temporal 2
9	Cobertura de las raíces, punto temporal 3
10	RCR del área de la hoja, punto temporal 2
11	RCR del área de la hoja, punto temporal 3
12	RCR de la cobertura de las raíces, punto temporal 2
13	RCR de la cobertura de las raíces, punto temporal 3
14	RCR de la longitud de las raíces, punto temporal 2
15	RCR de la longitud de las raíces, punto temporal 3
16	Peso fresco
17	Peso seco
Tabla 28.	

Tabla 29

Gen	p.n. SEQ ID NO:	Ev.	Par.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
BDL 100	657	7872.2	P										0,29	0,10	0,53	0,08	0,54	0,03		
BDL 100	657	7872.2	Pr										1,55	1,21	1,66	1,95	1,49	1,63		
BDL 100	657	7872.3	P										0,60	0,08		0,12		0,18		
BDL 100	657	7872.3	Pr										1,10	1,13		1,71		1,51		
BDL 100	657	7873.2	P										0,41	0,12		0,01		0,00		
BDL 100	657	7873.2	Pr										1,23	1,12		1,61		1,50		
BDL 100	657	7873.4	P	0,28	0,32	0,13	0,33			0,21	0,36	0,47		0,01					0,45	0,48
BDL 100	657	7873.4	Pr	1,16	1,18	1,39	1,17			1,41	1,19	1,12		1,28					1,22	1,19
BDL 51	694	8021.1	P											0,13		0,02		0,08		
BDL 51	694	8021.1	Pr											1,23		2,20		1,47		
BDL 51	694	8022.4	P											0,00		0,09		0,05		
BDL 51	694	8022.4	Pr											1,32		1,97		1,49		
BDL 51	694	8022.5	P											0,08		0,04				
BDL 51	694	8022.5	Pr											1,14		1,49				
BDL 51	694	8024.4	P											0,36		0,00		0,16		
BDL 51	694	8024.4	Pr											1,41		2,12		1,55		
BDL 51	694	8024.7	P											0,34					0,23	
BDL 51	694	8024.7	Pr											1,29					1,28	
BDL 82	704	7801.3	P										0,23	0,00		0,04		0,00		
BDL 82	704	7801.3	Pr										1,18	1,51		2,15		1,67		
BDL 82	704	7802.2	P											0,01		0,00		0,01		
BDL 82	704	7802.2	Pr											1,24		2,69		1,98		
BDL 82	704	7802.3	P											0,02		0,11		0,03		
BDL 82	704	7802.3	Pr											1,24		1,57		1,42		
BDL 82	704	7803.8	P											0,15		0,16		0,12	0,04	0,02

ES 2 674 256 T3

Gen	p.n. SEQ ID NO:	Ev.	Par.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
BDL 82	704	7803.8	Pr											1,29		2,22		1,63	1,41	1,33
BDL 82	704	7803.9	P																	
BDL 82	704	7803.9	Pr																	
BDL 89	705	7812.2	P										0,30	0,05	0,58	0,05	0,38	0,01		
BDL 89	705	7812.2	Pr										1,19	1,50	1,52	2,31	1,41	1,65		
BDL 89	705	7812.5	P											0,05		0,01		0,00		
BDL 89	705	7812.5	Pr											1,32		3,25		2,10		
BDL 89	705	7814.1	P										0,60	0,00		0,24		0,01		
BDL 89	705	7814.1	Pr										1,13	1,40		2,18		1,70		
BDL 89	705	7814.4	P										0,07	0,33		0,07		0,07		
BDL 89	705	7814.4	Pr										1,35	1,19		1,74		1,52		
BDL 89	705	7814.5	P										0,08	0,19	0,33	0,30	0,20	0,36		
BDL 89	705	7814.5	Pr										1,29	1,26	1,79	1,56	1,56	1,30		
BDL 95_ Corto	706	7841.2	P										0,14		0,66	0,14	0,65	0,04		
BDL 95 JS hört	706	7841.2	Pr										1,22		1,29	1,42	1,17	1,27		
BDL 95_ Corto	706	7842.12	P										0,30	0,05		0,04		0,07	0,20	
BDL 95_ Corto	706	7842.12	Pr										1,14	1,17		1,36		1,19	1,19	
BDL 95_ Corto	706	7842.2	P										0,15			0,29		0,08		
BDL 95_ Corto	706	7842.2	Pr										1,45			1,27		1,28		
BDL 95_ Corto	706	7842.8	P										0,35	0,00		0,07		0,07		
BDL 95_ Corto	706	7842.8	Pr										1,10	1,37		2,82		2,07		
BDL 95_ Corto	706	7843.4	P										0,43	0,00		0,01		0,01		0,41

ES 2 674 256 T3

Gen	p.n. SEQ ID NO:	Ev.	Par.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
BDL 95_Corto	706	7843.4	Pr										1,14	1,42		3,00		2,12		1,26
BDL 108	659	8122.1	P										0,11	0,18	0,45	0,61	0,73	0,51		
BDL 108	659	8122.1	Pr										1,28	1,24	1,44	1,13	1,16	1,20		
BDL 108	659	8122.2	P										0,09	0,02	0,00	0,00	0,12	0,01	0,77	0,38
BDL 108	659	8122.2	Pr										1,59	1,37	1,82	2,09	1,29	1,71	1,11	1,17
BDL 108	659	8123.6	P										0,59	0,57	0,40		0,08			
BDL 108	659	8123.6	Pr										1,10	1,33	1,27		1,53			
BDL 108	659	8123.5	P										0,04		0,29		0,25			
BDL 108	659	8123.5	Pr										1,14		1,75		1,36			
BDL 59	698	7792.1	P													0,26				0,70
BDL 59	698	7792.1	Pr													1,38				1,11
BDL 59	698	7792.2	P										0,33	0,31	0,02	0,25	0,14	0,01		
BDL 59	698	7792.2	Pr										1,33	1,23	1,63	1,26	1,28	1,40		
BDL 59	698	7792.3	P											0,02		0,11		0,29		
BDL 59	698	7792.3	Pr											1,36		1,43		1,28		
BDL 59	698	7793.3	P										0,06	0,32	0,30	0,16	0,11	0,05		
BDL 59	698	7793.3	Pr										1,76	1,19	1,99	1,56	1,65	1,27		
BDL 59	698	7794.1	P											0,18		0,11		0,13		
BDL 59	698	7794.1	Pr											1,15		1,83		1,35		
BDL 68	702	7761.3	P										0,32							0,46
BDL 68	702	7761.3	Pr										1,15							1,17
BDL 68	702	7761.5	P											0,40	0,15	0,21	0,14	0,20		
BDL 68	702	7761.5	Pr											2,43	1,86	1,58	1,60	1,42		
BDL 68	702	7761.9	P																	
BDL 68	702	7761.9	Pr																	

ES 2 674 256 T3

Gen	p.n. SEQ ID NO:	Ev.	Par.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
BDL 68	702	7764.1	P										0,00			0,53		0,22		
BDL 68	702	7764.1	Pr										1,44			1,45		1,61		

Tabla 29. Se proporcionan parámetros de crecimiento y biomasa de plantas transgénicas frente a plantas control medidos en ensayo de cultivo de tejido bajo 1,5% PEG, "P" = valor P; "Pr" = cociente entre los promedios de evento y control. Hay que señalar que cuando el cociente de promedios es mayor que "1" el efecto de la expresión exógena del gen es un incremento del rasgo deseado; "Par" = Parámetro de acuerdo con los parámetros enumerados en la Tabla 28 anterior; "Ev" = evento, "p.n." = polinucleótido.

Tabla 30

Gen	p.n. SEQ ID NO:	Ev.	Par.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
BDL 100	657	7872.2	P										0,16	0,11		0,08		0,01		
BDL 100	657	7872.2	Pr										1,36	1,58		2,18		1,65		
BDL 100	657	7872.3	P			0,40								0,19		0,02		0,03		
BDL 100	657	7872.3	Pr			1,13								1,13		1,96		1,60		
BDL 100	657	7873.2	P											0,03		0,00		0,00		
BDL 100	657	7873.2	Pr											1,52		2,08		1,72		
BDL 100	657	7873.3	P						0,60	0,36		0,56	0,52	0,15		0,02		0,01		
BDL 100	657	7873.3	Pr						1,15	1,12		1,27	1,12	1,23		1,32		1,23		
BDL 100	657	7873.4	P	0,24	0,03	0,03	0,00			0,01		0,33	0,21			0,23		0,16	0,02	
BDL 100	657	7873.4	Pr	1,25	1,36	1,39	1,55			1,96		1,12	1,18			1,22		1,13	1,42	
BDL 51	694	8021.1	P											0,06		0,00		0,00		
BDL 51	694	8021.1	Pr											1,33		2,61		1,60		
BDL 51	694	8022.4	P							0,51				0,03		0,02		0,14		
BDL 51	694	8022.4	Pr							1,31				1,17		2,13		1,46		
BDL 51	694	8022.5	P				0,02			0,09			0,08	0,00		0,02		0,06		
BDL 51	694	8022.5	Pr				1,24			1,30			1,22	1,36		2,42		1,75		
BDL 51	694	8024.4	P											0,00		0,35		0,07		
BDL 51	694	8024.4	Pr											1,32		3,10		1,86		

ES 2 674 256 T3

Gen	p.n. SEQ ID NO:	Ev.	Par.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
BDL 51	694	8024.7	P		0,55		0,04		0,09	0,05		0,24	0,18			0,38		0,23		
BDL 51	694	8024.7	Pr		1,11		1,48		1,09	2,30		1,12	1,24			1,19		1,15		
BDL 82	704	7801.1	P										0,11		0,02		0,14			
BDL 82	704	7801.1	Pr										1,26		3,23		1,76			
BDL 82	704	7801.3	P										0,13		0,00		0,00			
BDL 82	704	7801.3	Pr										1,27		3,07		1,76			
BDL 82	704	7802.2	P										0,14		0,01		0,00			
BDL 82	704	7802.2	Pr										1,37		5,55		2,69			
BDL 82	704	7802.3	P							0,52			0,43		0,41		0,50			
BDL 82	704	7802.3	Pr							1,14			1,11		1,17		1,17			
BDL 82	704	7803.8	P												0,01		0,00			
BDL 82	704	7803.8	Pr												2,16		1,77			
BDL 82	704	7803.9	P										0,61		0,12		0,01		0,53	
BDL 82	704	7803.9	Pr										1,11		1,81		1,49		1,14	
BDL 89	705	7812.2	P										0,29	0,00		0,00	0,30	0,18		
BDL 89	705	7812.2	Pr										1,13	1,30		1,38	1,11	1,16		
BDL 89	705	7812.5	P										0,03		0,02		0,01			
BDL 89	705	7812.5	Pr										1,39		5,28		2,83			
BDL 89	705	7814.1	P										0,00		0,01		0,00			
BDL 89	705	7814.1	Pr										1,45		1,84		1,38			
BDL 89	705	7814.4	P				0,19			0,30			0,03	0,39		0,01		0,17		
BDL 89	705	7814.4	Pr				1,19			1,21			1,61	1,16		1,49		1,14		
BDL 89	705	7814.5	P									0,42	0,22	0,09		0,04		0,03		
BDL 89	705	7814.5	Pr									1,11	1,20	1,36		1,74		1,59		
BDL 95_ Corto	706	7841.2	P										0,07		0,00		0,00			

ES 2 674 256 T3

Gen	p.n. SEQ ID NO:	Ev.	Par.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
BDL 95_ Corto	706	7841.2	Pr											1,31		2,75		1,81		
BDL 95_ Corto	706	7842.12	P		0,28	0,17	0,19			0,22			0,44			0,02		0,11	0,43	0,64
BDL 95_ Corto	706	7842.12	Pr		1,15	1,13	1,17			1,26			1,14			1,24		1,16	1,25	1,11
BDL 95_ Corto	706	7842.2	P							0,17				0,19		0,02		0,00		
BDL 95_ Corto	706	7842.2	Pr							1,32				1,17		2,06		1,61		
BDL 95_ Corto	706	7842.8	P										0,17	0,03		0,00		0,00		
BDL 95_ Corto	706	7842.8	Pr										1,14	1,18		2,17		1,44		
BDL 95_ Corto	706	7843.4	P											0,01		0,01		0,00		
BDL 95_ Corto	706	7843.4	Pr											1,67		4,58		2,59		
BDL 108	659	8122.1	P										0,32			0,31				
BDL 108	659	8122.1	Pr										1,25			1,91				
BDL 108	659	8122.2	P					0,08	0,00			0,08	0,01	0,27	0,00	0,05	0,00	0,02		
BDL 108	659	8122.2	Pr					1,10	1,22			1,24	2,01	1,16	1,81	1,50	1,55	1,39		
BDL 108	659	8123.6	P											0,15	0,02	0,09	0,07	0,07		
BDL 108	659	8123.6	Pr											1,25	1,56	1,57	1,21	1,36		
BDL 108	659	8123.5	P													0,18		0,19		
BDL 108	659	8123.5	Pr													1,62		1,40		
BDL 59	698	7792.1	P													0,11				
BDL 59	698	7792.1	Pr													1,50				
BDL 59	698	7792.2	P										0,17		0,21	0,16	0,33	0,50		
BDL 59	698	7792.2	Pr										1,31		1,31	1,62	1,11	1,17		
BDL 59	698	7792.3	P													0,01		0,27		

Gen	p.n. SEQ ID NO:	Ev.	Par.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
BDL 59	698	7792.3	Pr													1,73		1,18		
BDL 59	698	7793.3	P									0,33	0,03		0,01	0,03	0,02	0,04		
BDL 59	698	7793.3	Pr									1,12	1,89		1,75	1,87	1,39	1,40		
BDL 59	698	7794.1	P												0,14	0,08		0,29		
BDL 59	698	7794.1	Pr												1,22	1,59		1,18		
BDL 68	702	7761.3	P		0,22							0,26	0,14			0,17		0,34		
BDL 68	702	7761.3	Pr		1,20							1,15	1,32			1,38		1,13		
BDL 68	702	7761.5	P												0,30	0,02	0,46	0,02		
BDL 68	702	7761.5	Pr												1,56	1,71	1,22	1,59		
BDL 68	702	7761.9	P													0,33				
BDL 68	702	7761.9	Pr													1,30				
BDL 68	702	7764.1	P										0,08			0,15		0,38		
BDL 68	702	7764.1	Pr										1,27			1,77		1,21		

Tabla 30. Se proporcionan los parámetros de crecimiento y biomasa de plantas transgénicas frente a plantas control medidos en ensayo de cultivo de tejidos a una concentración de nitrógeno 0,75 mM, "P" =valor P; "Pr" = cociente entre los promedios de evento y control. Hay que indicar que cuando el cociente de promedios es mayor que 1 el efecto de expresión exógena del gen es un incremento del rasgo deseado; "Par" = Parámetro de acuerdo con los parámetros enumerados en la Tabla 28 anterior; "Ev" = evento.

EJEMPLO 9

MEJORAR LOS RASGOS DE INTERÉS DESEADOS EN LAS PLANTAS TRANSGÉNICAS CULTIVADAS EN CONDICIONES NORMALES REDUCIENDO LA EXPRESIÓN DE GENES

5 Las plantas transgénicas que expresaban de forma exógena el gen BDL127 (SEQ ID NO:673) se ensayaron para una serie de características comercialmente deseadas en condiciones normales.

10 Para analizar el efecto de la expresión del polinucleótido exógeno BDL 127 en plantas transgénicas, las plantas se cultivaron en macetas con una cantidad adecuada de nutrientes y agua. Las plantas se evaluaron usando diversos parámetros para su tamaño general (biomasa), estructura (arquitectura de la planta), ritmo de crecimiento relativo, tiempo hasta aparición de la inflorescencia (subida a flor) y floración, rendimiento de semillas, peso de 1.000 semillas, materia seca, contenido de aceite e índice de cosecha [(HI) rendimiento de semillas/materia seca]. El rendimiento de las plantas transgénicas se comparó con plantas de control cultivadas en paralelo en las mismas condiciones. Las plantas transgénicas simuladas con un vector vacío o que expresan el gen indicador uidA (GUS-Intron) bajo el mismo promotor se usaron como control.

15 Los parámetros se midieron como se describe en el ejemplo 3 anterior.

20 **Análisis estadísticos-** Todos los parámetros, incluyendo el ritmo de crecimiento de la planta, el área de la planta, la biomasa, la arquitectura de la planta, el tiempo hasta subida a la flor, el tiempo hasta la floración, el peso de 1.000 semillas, el rendimiento de semillas, el rendimiento de aceite, la materia seca y los datos del área de índice de cosecha se analizaron usando la prueba de la t. Para identificar genes y construcciones con rendimiento extraordinario, se analizaron los resultados de la combinación de eventos de transformación o eventos

independientes. Para el análisis de gen frente a control, se aplicó la prueba de la t, usando un umbral de significación de $p < 0,1$.

Resultados experimentales

5 Las secuencias de polinucleótidos de la invención se ensayaron para una serie de rasgos comercialmente deseados. La tabla 22 proporciona los parámetros medidos en ensayos de cultivo tisular y en invernadero (los resultados se presentan en las tablas 31 y 32). En los casos en que un determinado evento aparece más de una vez, el evento se ensayó en varios experimentos independientes.

10 **Análisis de plantas en ensayo de cultivo tisular-** La tabla 31, a continuación, representa análisis de plantas transgénicas que sobreexpresan el polinucleótido BDL 127 de la invención bajo la regulación del promotor constitutivo 35S (SEQ ID NO:777).

Tabla 31

Gen	Ev.	Par	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
BDL 127	8172.1	P	8,5E-03	1,5E-03	2,0E-03	2,4E-04	1,4E-03	1,6E-01	1,3E-03	4,7E-03	1,2E-01	2,6E-02	3,8E-01					2,3E-02	
BDL 127	8172.1	Pr	7,4E-01	6,1E-01	6,3E-01	2,8E-01	5,1E-01	6,5E-01	1,7E-01	3,6E-01	5,3E-01	7,5E-01	8,7E-01					7,6E-01	
BDL 127	8172.4	P	4,5E-03	1,9E-05	3,3E-03	7,4E-04	2,2E-05	2,3E-04	2,4E-03	9,2E-04	4,1E-03	1,6E-02		4,9E-01				2,0E-02	
BDL 127	8172.4	Pr	7,7E-01	6,2E-01	7,0E-01	4,1E-01	3,9E-01	5,2E-01	2,7E-01	2,1E-01	3,1E-01	7,3E-01		8,1E-01				7,6E-01	
BDL 127	8172.7	P			1,8E-01	3,8E-04	2,0E-03	3,4E-02	1,8E-03	1,7E-02	7,9E-02	2,9E-01	2,8E-01						
BDL 127	8172.7	Pr			8,4E-01	3,5E-01	6,0E-01	6,7E-01	2,3E-01	5,3E-01	6,0E-01	8,9E-01	7,5E-01						
BDL 127	8172.8	P		4,8E-01	3,5E-01	3,1E-03	2,7E-01		2,2E-01			5,4E-01						3,8E-01	3,1E-01
BDL 127	8172.8	Pr		8,9E-01	8,5E-01	5,4E-01	8,0E-01		6,0E-01			9,0E-01						8,3E-01	8,7E-01
BDL 127	8172.9	P	3,3E-03	1,8E-05	3,0E-03	3,1E-04	2,3E-05	4,5E-05	1,5E-03	6,5E-04	1,2E-03	1,3E-03		2,0E-01	7,4E-01			6,1E-02	4,9E-02
BDL 127	8172.9	Pr	7,9E-01	5,2E-01	5,4E-01	3,4E-01	3,4E-01	3,7E-01	2,1E-01	1,6E-01	1,4E-01	5,1E-01		6,9E-01	9,0E-01			7,3E-01	6,4E-01

Tabla 31. "P" = valor P; "Pr" = relación entre los promedios de evento y control. Obsérvese que cuando la relación promedio es menor que "1" el efecto de la expresión exógena del gen es una disminución del rasgo deseado; "Par" = Parámetro según los parámetros enumerados en la tabla 24 anterior; "Ev" = evento.

15 **Ensayos en invernadero-** Las tablas 33-36 representan experimentos que se realizaron usando ensayos en invernadero. La tabla 32 especifica los parámetros que se midieron en los ensayos en invernadero y que se presentan en las tablas 33-36. En los casos en que un determinado evento aparece más de una vez, el evento se ensayó en varios experimentos independientes.

Tabla 32

Símbolo de parámetro usado en las tablas de resultados 33-36	Nombre del parámetro
1	Diámetro de roseta, punto temporal 1
2	Diámetro de roseta, punto temporal 2
3	Diámetro de roseta, punto temporal 3
4	Diámetro de roseta, punto temporal 4
5	Área de roseta, punto temporal 1

ES 2 674 256 T3

6	Área de roseta, punto temporal 2
7	Área de roseta, punto temporal 3
8	Área de roseta, punto temporal 4
9	Cobertura de la parcela, punto temporal 1
10	Cobertura de la parcela, punto temporal 2
11	Cobertura de la parcela, punto temporal 3
12	Cobertura de la parcela, punto temporal 4
13	Número de hojas, punto temporal 1
14	Número de hojas, punto temporal 2
15	Número de hojas, punto temporal 3
16	Número de hojas, punto temporal 4
17	Área del cuerpo de la hoja, punto temporal 1
18	Área del cuerpo de la hoja, punto temporal 2
19	Área del cuerpo de la hoja, punto temporal 3
20	Área del cuerpo de la hoja, punto temporal 4
21	Área del peciolo de la hoja, punto temporal 1
22	Área del peciolo de la hoja, punto temporal 2
23	Área del peciolo de la hoja, punto temporal 3
24	Área del peciolo de la hoja, punto temporal 4
25	Área relativa del cuerpo de la hoja, punto temporal 1
26	Área relativa del cuerpo de la hoja, punto temporal 2
27	Área relativa del cuerpo de la hoja, punto temporal 3
28	Área relativa del cuerpo de la hoja, punto temporal 4
29	Área relativa del peciolo, punto temporal 1
30	Área relativa del peciolo, punto temporal 2
31	Área relativa del peciolo, punto temporal 3
32	Área relativa del peciolo, punto temporal 4
33	RCR del área del cuerpo de la hoja, punto temporal 2
34	RCR del área del cuerpo de la hoja, punto temporal 3
35	RCR del área del cuerpo de la hoja, punto temporal 4
36	RCR del número de hojas, punto temporal 2
37	RCR del número de hojas, punto temporal 3
38	RCR del número de hojas, punto temporal 4
39	RCR del área de roseta, punto temporal 2
40	RCR del área de roseta, punto temporal 3

ES 2 674 256 T3

41	RCR del área de roseta, punto temporal 4
42	RCR del diámetro de roseta, punto temporal 2
43	RCR del diámetro de roseta, punto temporal 3
44	RCR del diámetro de roseta, punto temporal 4
45	RCR de la cobertura de la parcela, punto temporal 2
46	RCR de la cobertura de la parcela, punto temporal 3
47	RCR de la cobertura de la parcela, punto temporal 4
48	Subida a flor
49	Floración
50	Peso seco
51	Rendimiento de semillas
52	Índice de cosecha
53	Peso de 1000 semillas
54	contenido de aceite
55	Peso fresco
Tabla 32.	

Tabla 33

Gen	Ev	Par	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
BDL1 27	8172. 10	P																
BDL1 27	8172. 10	Prom																
BDL1 27	8172. 4	P			1,2E -03	1,7E -03	7,1E -03	1,7E -03	5,9E -03	1,6E -03	7,1E -03	1,7E -03	5,9E -03	1,6E -03				
BDL1 27	8172. 4	Prom			7,6E -01	7,7E -01	7,1E -01	2,0E -01	6,7E -01	6,5E -01	7,1E -01	2,0E -01	6,7E -01	6,5E -01				
BDL1 27	8172. 7	P																
BDL1 27	8172. 7	Prom																
BDL1 27	8172. 8	P	8,0E -04	2,2E -04			1,8E -02	1,2E -02	1,7E -02	3,3E -02	1,8E -02	1,2E -02	1,7E -02	3,3E -02		3,6E -04		
BDL1 27	8172. 8	Prom	7,4E -01	7,0E -01			6,2E -01	5,7E -01	5,2E -01	5,2E -01	6,2E -01	5,7E -01	5,2E -01	5,2E -01		7,8E -01		
BDL1 27	8172. 9	P	2,1E -02	6,4E -03	8,8E -04	7,1E -04			1,1E -02	4,4E -04			1,1E -02	4,4E -04		4,5E -02		
BDL1 27	8172. 9	Prom	8,0E -01	7,1E -01	7,3E -01	7,3E -01			6,1E -01	5,6E -01			6,1E -01	5,6E -01		8,5E -01		

ES 2 674 256 T3

Tabla 33. "P" = valor P; "Prom" = relación entre los promedios de evento y control. Obsérvese que, cuando la relación promedio es menor que "1", el efecto de la expresión exógena del gen es una disminución del rasgo deseado; "Par" = parámetro según los parámetros enumerados en la tabla 22 anterior; "Ev" = evento.

Tabla 34

Gen	Ev	Par	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
BDL1 27	8172. 10	P																
BDL1 27	8172. 10	Prom																
BDL1 27	8172. 4	P		5,4E -04	2,0E -03	7,7E -03												
BDL1 27	8172. 4	Prom		3,3E -01	6,9E -01	6,3E -01												
BDL1 27	8172. 7	P							1,8E -02								3,1E -02	
BDL1 27	8172. 7	Prom							6,8E -01								8,0E -01	
BDL1 27	8172. 8	P	3,3E -03		1,4E -03	2,1E -02												
BDL1 27	8172. 8	Prom	6,9E -01		6,2E -01	5,6E -01												
BDL1 27	8172. 9	P				3,8E -04												
BDL1 27	8172. 9	Prom				5,7E -01												

Tabla 34. "P" = valor P; "Prom" = relación entre los promedios de evento y control. Obsérvese que, cuando la relación promedio es menor que "1", el efecto de la expresión exógena del gen es una disminución del rasgo deseado; "Par" = parámetro según los parámetros enumerados en la tabla 22 anterior; "Ev" = evento.

Tabla 35

Gen	Ev	Par	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
BDL1 27	8172. 10	P																
BDL1 27	8172. 10	Prom																
BDL1 27	8172. 4	P	3,0E - 07						4,1E - 02						4,1E - 02			
BDL1 27	8172. 4	Prom	- 1,1E -02						- 5,2E -02						- 5,2E -02			
BDL1 27	8172. 7	P																
BDL1 27	8172. 7	Prom																
BDL1 27	8172. 8	P																
BDL1 27	8172. 8	Prom																

BDL1 27	8172. 9	P							3,4E - 02			2,1E -02			3,4E - 02		
BDL1 27	8172. 9	Prom							8,0E - 01			7,4E -01			8,0E - 01		

Tabla 35. "P" = valor P; "Prom" = relación entre los promedios de evento y control. Obsérvese que, cuando la relación promedio es menor que "1", el efecto de la expresión exógena del gen es una disminución del rasgo deseado; "Par" = parámetro según los parámetros enumerados en la tabla 22 anterior; "Ev" = evento.

Tabla 36

Gen	Ev	Par	49	50	51	52	53	54	55
BDL 127	8172.10	P							
BDL 127	8172.10	Av							
BDL 127	8172.4	P			2,0E-02				
BDL 127	8172.4	Av			6,9E-01				
BDL 127	8172.7	P			2,0E-02				
BDL 127	8172.7	Av			7,3E-01				
BDL 127	8172.8	P							
BDL 127	8172.8	Av							
BDL 127	8172.9	P					3.1E-02		
BDL 127	8172.9	Av					8.1E-01		

Tabla 36. "P" = valor P; "Prom" = relación entre los promedios de evento y control. Obsérvese que, cuando la relación promedio es menor que "1", el efecto de la expresión exógena del gen es una disminución del rasgo deseado; "Par" = parámetro según los parámetros enumerados en la tabla 22 anterior; "Ev" = evento.

5 Estos resultados demuestran que la transformación de plantas con el gen BDL 127 produce una disminución del rendimiento, el rendimiento de semillas, la biomasa y el ritmo de crecimiento y, por lo tanto, agentes que regulan negativamente el nivel de expresión del gen BDL 127 en plantas tales como agentes de cosupresión, supresión antisentido, interferencia de ARN, remodelación de la estructura del promotor y/o Ribozima puede aumentar el rendimiento, el rendimiento de semillas, la biomasa y el ritmo de crecimiento de una planta.

10 Los genes identificados en la presente memoria mejoran el rendimiento de la planta en general y, más específicamente, el rendimiento de aceite, el rendimiento de semillas, el contenido de aceite, el ritmo de crecimiento de la planta, la biomasa de la planta, las mediciones de raíz, la TEAB, la EUN y el vigor de la planta. El resultado del método bioinformático descrito en la presente memoria es un conjunto de genes altamente predichos para mejorar el rendimiento (rendimiento de semillas, rendimiento y contenido de aceite, biomasa) y/u otros rendimientos agronómicos importantes mediante la modificación de su expresión. Aunque se predice que cada gen tendrá su propio impacto, se espera que la modificación del modo de expresión de más de un gen proporcione un efecto aditivo o sinérgico sobre el rendimiento de la planta, el ritmo de crecimiento de la planta, las mediciones de la raíz, la TEAB, la UEN, el vigor de la planta y/u otros rendimientos agronómicos importantes. La alteración de la expresión de cada gen en solitario o conjunto de genes descrito aquí aumenta el rendimiento global del ritmo de crecimiento de la planta, las mediciones de la raíz, la TEAB, la EUN, el vigor de la planta y/o

20 **Contenido del CD-ROM**

A continuación, se enumera el contenido del archivo del CD-ROM que se adjunta y se presenta con la solicitud. La información del archivo se proporciona como: Nombre de archivo/tamaño en bytes/ fecha de creación/sistema operativo/formato de máquina.

CD-ROM1 (1 archivo del LISTADO DE SECUENCIAS):

25 1. 45731_ST25.txt/ 1,886,208 bytes/21 May 2009/ Microsoft Windows XP Professional/ PC

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método de aumento del contenido de aceite, el rendimiento de semillas, el ritmo de crecimiento y/o la biomasa de una planta en comparación con una planta nativa, que comprende expresar dentro de la planta un polinucleótido exógeno que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 80 % homóloga a la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:68, aumentando de este modo el contenido de aceite, el rendimiento de semillas, el ritmo de crecimiento y/o la biomasa de la planta en comparación con la planta nativa.
2. El método de la reivindicación 1, que comprende además extraer el aceite de la planta.
- 10 3. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde dicho polinucleótido exógeno está comprendido en una construcción de ácido nucleico que comprende un promotor para dirigir la transcripción de dicha secuencia de ácido nucleico en una célula huésped.
4. Un polinucleótido aislado que comprende la secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO:18.
5. Una construcción de ácido nucleico que comprende el polinucleótido aislado de la reivindicación 4 y un promotor para dirigir la transcripción de dicha secuencia de ácido nucleico en una célula huésped.
- 15 6. El método de la reivindicación 3, o la construcción de ácido nucleico de la reivindicación 5, en donde dicho promotor se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO:779-792.
7. El método de la reivindicación 1, 2, 3 o 6, en donde dicho polinucleótido comprende una secuencia de ácido nucleico al menos un 96 % idéntica a la SEQ ID NO:18.
- 20 8. El método de la reivindicación 1, 2, 3 o 6, en donde dicho polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 18.
9. El método de la reivindicación 1, 2 o 3, en donde dicha secuencia de aminoácidos tiene al menos un 85 % de identidad con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:68.
10. El método de la reivindicación 1, 2 o 3, en donde dicha secuencia de aminoácidos tiene al menos un 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:68.
- 25 11. El método de la reivindicación 1, 2 o 3, en donde dicha secuencia de aminoácidos tiene al menos un 95 % de identidad con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:68.
12. El método de la reivindicación 1, 2 o 3, en donde dicha secuencia de aminoácidos tiene al menos un 98 % de identidad con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:68.
- 30 13. El método de la reivindicación 1, 2 o 3, en donde dicha secuencia de aminoácidos tiene al menos un 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:68.
14. El método de la reivindicación 1, 2 o 3, en donde dicha secuencia de aminoácidos se expone en la SEQ ID NO:68.
- 35 15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y 6-14, que comprende además seleccionar progenie de dichas plantas que expresan dicho polinucleótido exógeno para un aumento de la biomasa o del rendimiento de semillas.

FIG. 1A



La longitud de la hoja está representada mediante la flecha



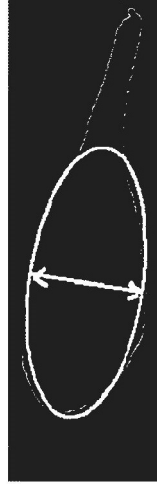
La elipse blanca representa el área laminar

FIG. 1C

FIG. 1B



La longitud laminar está representada mediante la flecha



La anchura laminar está representada mediante la flecha

FIG. 1D

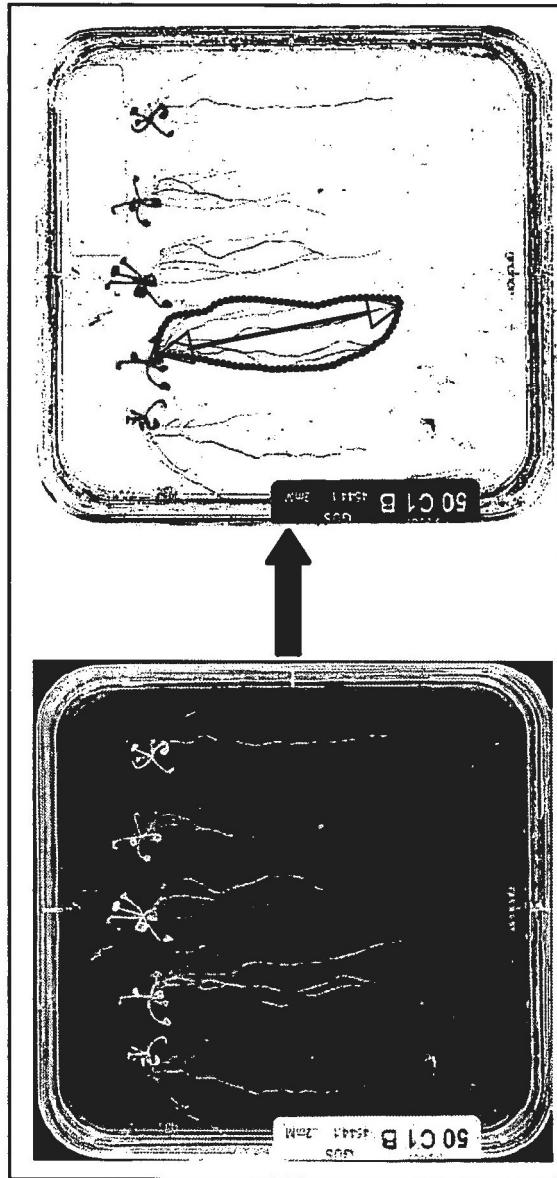


FIG. 2B

FIG. 2A

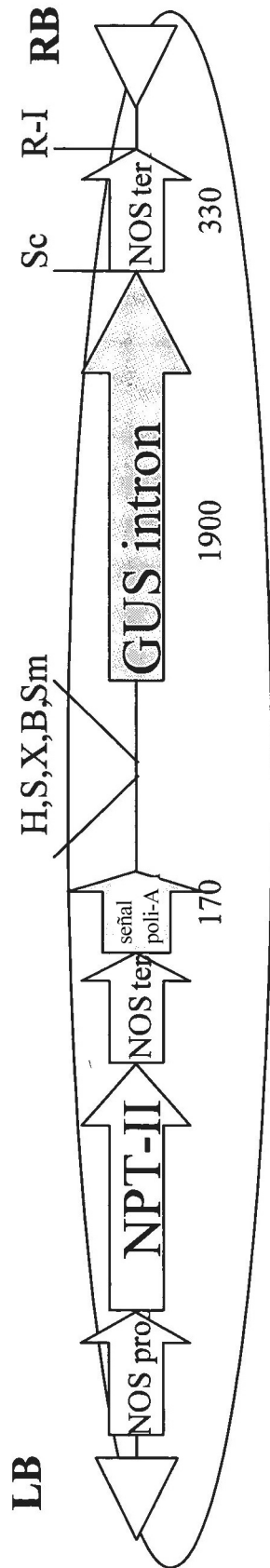


FIG. 3