(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 427 944**

(51) Int. Cl.:

A01H 5/00 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
A01H 5/10 (2006.01)
C07K 14/825 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.04.2004** **E 04741458 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2013** **EP 1613146**

(54) Título: **Plantas que tienen características de crecimiento modificadas y método para producir las mismas**

(30) Prioridad:

14.04.2003 EP 03076086

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.11.2013

(73) Titular/es:

CROPDESIGN N.V. (100.0%)
TECHNOLOGIEPARK 3
9052 ZWIJNAARDE-GENT, BE

(72) Inventor/es:

SANZ MOLINERO, ANA ISABEL

(74) Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 427 944 T3

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

DESCRIPCIÓN

Plantas que tienen características de crecimiento modificadas y método para producir las mismas

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método para aumentar el rendimiento de semillas en plantas. Más específicamente, la presente invención se refiere a un método para aumentar el rendimiento de semillas en plantas, que comprende la introducción y la sobreexpresión en una planta de un ácido nucleico que codifica para una proteína metalotioneína tal como se describe en el presente documento. La presente invención también se refiere a plantas que tienen un aumento de la expresión de una secuencia de ácido nucleico que codifica para una metalotioneína, plantas que tienen un aumento del rendimiento de semillas con relación a plantas de tipo natural correspondientes. También se describen en el presente documento constructos adecuados para su uso en los métodos de la invención.

Antecedentes de la invención

Algunos metales pesados, particularmente cobre y zinc, son micronutrientes esenciales que desempeñan un papel en una gama de procesos fisiológicos de plantas a través de la acción de enzimas dependientes de Cu y Zn. Estos y otros iones de metales pesados no esenciales, tales como cadmio, plomo y mercurio, son altamente reactivos y, por consiguiente, pueden ser tóxicos para las células vivas. Por tanto, las plantas, como todos los organismos vivos, han desarrollado una serie de mecanismos que controlan y responden a la captación y acumulación de metales pesados tanto esenciales como no esenciales. Estos mecanismos incluyen la quelación y el secuestro de metales pesados por ligandos particulares. Los dos ligandos de unión a metales pesados mejor caracterizados en células vegetales son las fitoquelatinas (PC) y las metalotioneínas (MT). Las MT son polipéptidos ricos en cisteína codificados por una familia de genes. En cambio, las PC son una familia de péptidos ricos en cisteína sintetizados enzimáticamente.

Las metalotioneínas, productos de la traducción de ARNm, son proteínas de unión a metales, ricas en cisteína, de bajo peso molecular. Las proteínas y los genes de MT se encuentran en la totalidad de los reinos animal y vegetal así como en la procariota *Synechococcus.* El gran número de residuos de cisteína en las MT se unen a una variedad de metales mediante enlaces mercáptido. Las MT contienen normalmente dos dominios ricos en cisteína, de unión a metales que proporcionan a estas metaloproteínas una conformación en forma de pesa de gimnasia. Los datos disponibles en la actualidad tienden a respaldar un papel de las MT en la tolerancia al cobre (como las PC protegen frente al cadmio).

La clasificación de las proteínas MT se basa en la disposición de los residuos de Cys. Cobbett y Goldsbrough (Annu Rev Plant Biol. 53, 159-82, 2002) distinguen cuatro clases: de tipo 1 a tipo 4. Las MT de tipo 2 contienen dos dominios ricos en cisteína separados por un espaciador de aproximadamente 40 aminoácidos, estando presente el primer par de cisteínas como un motivo Cys-Cys en las posiciones de aminoácido 3 y 4. Además, las secuencias del dominio N-terminal de las MT de tipo 2 (MSC-CGGNCGCS-) están altamente conservadas. *Arabidopsis,* el arroz y la caña de azúcar contienen genes que codifican para los cuatro tipos de las MT. Pueden realizarse observaciones generales acerca del patrón de expresión de estos genes. Las MT de tipo 4 están restringidas en el desarrollo de semillas. La expresión de MT de tipo 1 tiende a ser mayor en raíces que en brotes, mientras que generalmente se observa lo contrario para las MT de tipo 2. Las MT de tipo 3 se expresan en frutos carnosos o en hojas de plantas que producen frutos no carnosos (como *Arabidopsis*). Diversos factores ambientales influyen en la expresión de estos genes.

Se han producido plantas transgénicas que expresan GUS bajo el control del promotor AtMT2a. En plantas jóvenes, sólo se encontró tinción en los cotiledones y puntas radiculares laterales. Se observó actividad GUS en plantas de más edad en la base de tricomas, en hidátodos, sépalos, anteras, estigma, puntas radiculares y tejidos vasculares en puntos de ramificación de raíces laterales. A medida que envejecieron las hojas, aumentó la tinción con GUS.

Se han producido plantas transgénicas que expresan MT que sirven para dos fines:

1) Fitorremediación de suelos contaminados con metales pesados: plantas transgénicas de tabaco y *Brassica*, modificadas mediante ingeniería genética para sobreexpresar MT, que resisten moderadamente la toxicidad de metales pesados como cadmio (Suh *et al*., Mol Cells. 8, 678-684, 1998).

2) Mejora de la calidad nutricional, cuando se coexpresan en arroz con fitasa y ferritina, para mejorar la dieta de hierro en seres humanos. La proteína de tipo metalotioneína, rica en cisteína, (un aminoácido rico en azufre) ayuda en la absorción de hierro por el sistema digestivo de seres humanos (Potrykus I (2002) Nutritional improvement of rice to reduce malnutrtion in developing countries. En “Plant Biotechnology 2002 y Beyond” I.K. Vasil (ed.) págs. 401-406).

La solicitud de patente PCT publicada número WO 98/36084 a nombre de Agricola Technologies Inc. describe el crecimiento potenciado de plantas usando genes que codifican para proteínas de unión a metales, tales como metalotioneína. Sin embargo, la inspección más detenida de la solicitud de patente parece sugerir que los genes que codifican para metalotioneínas necesitarían expresarse en combinación con otros genes para que se produzca el crecimiento potenciado de plantas.

Dada la población mundial cada vez mayor, sigue siendo un objetivo principal de la investigación agrícola mejorar la eficacia de la agricultura y aumentar la diversidad de plantas en horticultura. Los medios convencionales para las mejoras de cultivos y en horticultura utilizan técnicas de reproducción selectiva para identificar plantas que tienen características deseables. Sin embargo, tales técnicas de reproducción selectiva tienen varios inconvenientes, concretamente que estas técnicas requieren normalmente mucha mano de obra y dan como resultado plantas que contienen a menudo complementos genéticos heterogéneos que pueden no dar siempre como resultado el rasgo deseable que se transmite desde las plantas parentales. Los avances en la biología molecular han permitido a la humanidad manipular el germoplasma de animales y plantas. La ingeniería genética de plantas conlleva el aislamiento y la manipulación de material genético (normalmente en forma de ADN o ARN) y la posterior introducción de ese material genético en una planta. Tal tecnología ha conducido al desarrollo de plantas que tienen diversos rasgos económicos, agronómicos u hortícolas mejorados. Un rasgo de particular interés económico es un alto rendimiento.

Descripción detallada

Se ha descubierto ahora sorprendentemente que la sobreexpresión en una planta de un ácido nucleico que codifica para una proteína metalotioneína tal como se describe en el presente documento da lugar a plantas que tienen el aumento del rendimiento de semillas. Por tanto según la presente invención se proporciona un método para aumentar el rendimiento de semillas, que comprende introducir y sobreexpresar en una planta un ácido nucleico aislado que codifica para una proteína metalotioneína tal como se describe en el presente documento.

También se describe la introducción de una modificación genética en una planta y la selección de la expresión modulada en una planta de un ácido nucleico que codifica para una proteína metalotioneína, siempre que el crecimiento y el desarrollo modificados no sean el aumento de la acumulación de metales o el aumento de la tolerancia o la resistencia al estrés abiótico. Con el aumento de la acumulación de metales quiere decirse cualquier captación de metales para el fin de la biorremediación o para mejorar la calidad nutricional de plantas. En particular, se prevé la captación de metales pesados o hierro. El término estrés abiótico significa estreses provocados por sal, frío o presión osmótica e incluye también estrés oxidativo.

Se describen en el presente documento métodos que engloban una modificación genética de una planta o una célula vegetal. El término “modificación genética” se refiere a un cambio mediante intervención humana en el contenido genético de una célula en comparación con una célula de tipo natural e incluye técnicas como ingeniería genética, reproducción o mutagénesis. El cambio en el contenido genético comprende modificaciones del genoma e incluye adición, deleción y sustitución de material genético en los cromosomas de una célula vegetal así como en episomas. El término también engloba la adición de información extracromosómica a una célula vegetal. Preferiblemente, la modificación genética da como resultado la expresión modulada de un ácido nucleico. Los métodos también engloban una etapa de selección posterior, durante la cual se seleccionan las plantas con las características deseadas. La etapa de selección puede basarse en la monitorización de la presencia o ausencia de características de crecimiento modificadas, o en la monitorización de la presencia o ausencia de genes marcadores seleccionables o examinables unidos a un ácido nucleico de interés introducido.

En la presente invención, se prevé el aumento de la expresión, de un ácido nucleico. Aumentar la expresión de un ácido nucleico que codifica para una metalotioneína o aumentar la actividad y/o los niveles de la propia metalotioneína engloba el aumento de la expresión de un gen y/o el aumento de la actividad y/o los niveles de un producto génico, concretamente un polipéptido, en células o tejidos específicos. La expresión alterada de un gen y/o actividad y/o niveles alterados de un producto génico se efectúa, mediante medios recombinantes. Modular la expresión de un gen y/o los niveles de un producto génico y/o modular la actividad de un producto génico puede efectuarse directamente a través de la modulación de la expresión de un gen que codifica para metalotioneína y/o directamente a través de la modulación de la actividad y/o los niveles de una proteína metalotioneína. La expresión modulada puede resultar de la expresión alterada de un ácido nucleico que codifica para metalotioneína que se introdujo previamente en una planta. De manera similar, pueden resultar niveles y/o actividad modulados de una proteína metalotioneína de la expresión alterada de un ácido nucleico que codifica para metalotioneína que se introdujo previamente en una planta. Adicionalmente, la modulación de la expresión tal como se mencionó anteriormente se efectúa de manera indirecta, por ejemplo puede efectuarse como resultado de la disminución o el aumento de los niveles y/o la actividad de factores que controlan la expresión de un gen de metalotioneína o que influye en la actividad y/o los niveles de la metalotioneína.

Ventajosamente, la modulación de la expresión de un ácido nucleico que codifica para una metalotioneína y/o la modulación de la actividad y/o los niveles de la propia metalotioneína puede efectuarse mediante medios químicos,

es decir, mediante la aplicación exógena de uno o más compuestos o elementos que pueden modular la actividad y/o los niveles de la proteína metalotioneína y/o que pueden modular la expresión de un ácido nucleico que codifica para metalotioneína (siendo el ácido nucleico un transgén introducido en una planta). El término "aplicación exógena" tomado en su contexto más amplio incluye poner en contacto o administrar células, tejidos, órganos u organismos con un compuesto o elemento adecuado. El compuesto puede aplicarse a una planta de forma adecuada para la captación (tal como a través de la aplicación al suelo para la captación por las raíces, o aplicándolo directamente a las hojas, por ejemplo mediante pulverización).

Los compuestos o elementos adecuados para la aplicación exógena incluyen ácidos nucleicos que codifican para metalotioneínas y ácidos nucleicos que se hibridan con los mismos; el producto génico de metalotioneína o un homólogo, derivado o fragmento activo del mismo y/o anticuerpos que reconocen o que imitan al producto génico. Tales anticuerpos pueden comprender "fitoanticuerpos", anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos IgG y anticuerpos de cadena pesada de camellos u otros miembros de los *Camelidae*, así como fragmentos de los mismos. Adicional o alternativamente, poner en contacto o administrar células, tejidos, órganos u organismos con una proteína de interacción o con un inhibidor o activador del gen/producto génico proporciona otro medio exógeno para la modulación de la expresión de un ácido nucleico que codifica para una metalotioneína y/o para la modulación de la actividad y/o el nivel de la propia metalotioneína. La modulación de la expresión de un ácido nucleico que codifica para una proteína metalotioneína y/o la modulación de la actividad y/o los niveles de la propia metalotioneína también pueden efectuarse como resultado de niveles alterados de factores que activan o inactivan directa o indirectamente una proteína metalotioneína.

También pueden someterse plantas, semillas u otro material vegetal a tratamiento con sustancias mutagénicas. Las sustancias químicas que producen mutagénesis comprenden N-nitroso-N-etilurea, etilenimina, metanosulfonato de etilo o sulfato de dietilo. Como alternativa, también puede usarse igualmente radiación ionizante tal como rayos γ o rayos X. Se conocen en la técnica métodos para introducir mutaciones y someter a prueba el efecto de las mutaciones (tal como expresión de proteína modificada y/o actividad de proteína modificada). Están englobados por la mutagénesis métodos que emplean mutágenos químicos, así como mutágenos físicos, tales como radiación. Puede alterarse cualquier característica de la metalotioneína mediante mutagénesis. Por ejemplo, puede aumentarse o disminuirse el nivel de expresión, puede modificarse la actividad de la proteína o pueden adaptarse las propiedades de la unión a metales.

También se describe en el presente documento la modulación de la expresión de una secuencia de ácido nucleico que codifica para una metalotioneína y/o la modulación de la actividad de la propia metalotioneína efectuada mediante medios recombinantes. Tales medios recombinantes pueden comprender un enfoque directo y/o indirecto para la modulación de la expresión de una secuencia de ácido nucleico y/o para la modulación de la actividad de una proteína.

Por ejemplo, un enfoque indirecto puede comprender introducir en una planta, una secuencia de ácido nucleico que puede modular la actividad y/o los niveles de la proteína en cuestión (una metalotioneína) y/o la expresión del gen en cuestión (un gen que codifica para una metalotioneína). Ejemplos de tales ácidos nucleicos que van a introducirse en una planta son ácidos nucleicos que codifican para factores, activadores o inhibidores de la transcripción que se unen al promotor del gen de metalotioneína o que interaccionan con la proteína metalotioneína. Métodos para someter a prueba estas clases de interacción y para aislar los ácidos nucleicos que codifican para estos elementos de interacción son, por ejemplo, la selección de un híbrido en levadura o de dos híbridos en levadura. También está englobado por un enfoque indirecto para modular la actividad de una metalotioneína y/o la expresión de un gen de metalotioneína, la inhibición o estimulación de secuencias reguladoras que dirigen la expresión del gen nativo o transgén. Tales secuencias reguladoras pueden introducirse en una planta. Además, la modulación de la actividad de una metalotioneína puede efectuarse alterando los niveles en una planta de un factor que puede interaccionar con metalotioneína. Tales factores pueden incluir ligandos (reguladores, subunidades, sustratos, dianas) de la metalotioneína.

Según la presente invención, aumentar la expresión de un gen de metalotioneína o aumentar la actividad y/o los niveles de una proteína metalotioneína comprende introducir y sobreexpresar en una planta una secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido de metalotioneína tal como se define en el presente documento. La secuencia de ácido nucleico puede introducirse en una planta mediante, por ejemplo, transformación.

Según la presente invención, se potencia o se aumenta la expresión de un ácido nucleico. Están bien documentados en la técnica métodos para obtener la potenciación o el aumento de la expresión de genes o productos génicos e incluyen, por ejemplo, la sobreexpresión dirigida por un promotor (fuerte), el uso de potenciadores de la transcripción o potenciadores de la traducción. El término sobreexpresión tal como se usa en el presente documento significa cualquier forma de expresión que sea adicional al nivel de expresión de tipo natural original. Preferiblemente, el ácido nucleico que va a introducirse en la planta y/o el ácido nucleico que va a sobreexpresarse en las plantas está en una dirección sentido con respecto al promotor al que va a unirse operativamente. El ácido nucleico que va a sobreexpresarse codifica para una metalotioneína de tipo 2 tal como se define a continuación, además preferiblemente la secuencia de ácido nucleico que codifica para la metalotioneína se aísla de una planta,

preferiblemente de una planta dicotiledónea, preferiblemente de la familia *Brassicaceae*, además preferiblemente la secuencia se aísla de *Arabidopsis thaliana,* lo más preferiblemente la secuencia de ácido nucleico es tal como se representa por SEQ ID NO: 1 o una parte de la misma, o codifica para una secuencia de aminoácidos tal como se representa por SEQ ID NO: 2 o un homólogo, derivado o fragmento activo de la misma. Debe indicarse que la aplicabilidad de la invención no se basa en el uso del ácido nucleico representado por SEQ ID NO: 1, ni en la secuencia de ácido nucleico que codifica para la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, sino que pueden usarse otras secuencias de ácido nucleico que codifican para homólogos, derivados o fragmentos activos de SEQ ID NO: 2, o partes de SEQ ID NO: 1, o secuencias que se hibridan con SEQ ID NO: 1, en los métodos de la presente invención. En particular, también son útiles los homólogos de otras especies de plantas tales como tabaco, maíz o arroz en la presente invención.

También se describe en el presente documento el aumento de la expresión de un gen que codifica para metalotioneína o el aumento de las actividades y/o los niveles de una proteína metalotioneína en células vegetales logrado mediante mutagénesis de la célula vegetal. Por ejemplo, estas mutaciones pueden ser responsables del control alterado de un gen que codifica para metalotioneína, dando como resultado una mayor expresión del gen. Las mutaciones también pueden provocar cambios conformacionales de la proteína, dando como resultado una mayor actividad y/o niveles de la proteína.

El término metalotioneína incluye proteínas homólogas a la metalotioneína tal como se presenta en SEQ ID NO 2. Las metalotioneínas se conocen bien en la técnica, para una revisión y clasificación recientes, véase Cobbett y Goldsbrough (2002). Las metalotioneínas son pequeñas proteínas con una conformación de pesa de gimnasia que encuentra su origen en dominios ricos en cisteína N-terminales y C-terminales conservados que están separados entre sí por una región que tiene longitud y composición de aminoácidos variables. Basándose en la estructura primaria, se distinguen 4 tipos de metalotioneínas, se proporciona una alineación de diversas metalotioneínas de plantas en la figura 1. La metalotioneína de SEQ ID NO 2 comprende un dominio N-terminal conservado típico para metalotioneínas de tipo 2 tal como se definen por Cobbett y Goldsbrough (2002), comprendiendo el dominio la secuencia consenso “MSCCGG (N/S) CGCG (T/S/A) (G/A/S) C (K/Q/S) C”, por consiguiente, los homólogos que van a usarse en los métodos de la presente invención son metalotioneínas que comprenden este dominio conservado. Adicionalmente, los homólogos de metalotioneína tienen actividad de unión a metales que puede medirse en una prueba de saturación de metales (Scheuhammer *et al*., Toxicol. Appl Pharmacol. 82, 417-425, 1986) y/o pueden funcionar como sensor redox (Fabisiak *et al*., Methods Enzymol. 353, 268-281 (2002)).

Los métodos para la búsqueda e identificación de homólogos de metalotioneína estarían completamente dentro del campo del experto en la técnica. Tales métodos comprenden la comparación de las secuencias representadas por SEQ ID NO: 1 ó 2, en un formato legible por ordenador, con secuencias que están disponibles en bases de datos públicas tales como MIPS (http://mips.gsf.de/), GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html) o la base de datos de secuencias de nucleótidos EMBL (http://www.ebi.ac.uk/embl/index.html), usando algoritmos bien conocidos en la técnica para la alineación o la comparación de secuencias, tales como GAP (Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48; 443-453 (1970)), BESTFIT (usando el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (Advances in Applied Mathematics 2; 482-489 (1981))), BLAST (Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)), FASTA y TFASTA (W. R. Pearson y D. J. Lipman Proc.Natl. Acad.Sci. USA 85:2444- 2448 (1988)). El software para realizar análisis de BLAST está disponible para el público a través del Centro Nacional para Información Biotecnológica. Se identificaron los homólogos mencionados anteriormente usando los parámetros por defecto de Blast (matriz BLOSUM62, penalización por apertura de hueco de 11 y penalización por extensión de hueco de 1) y preferiblemente se usan las secuencias de longitud completa para el análisis.

Los “homólogos” de una proteína metalotioneína engloban péptidos, oligopéptidos, polipéptidos, proteínas y enzimas que tienen sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos con relación a la proteína sin modificar en cuestión y que tienen actividad biológica y funcional similar a la de la proteína sin modificar de la que se derivan. Para producir tales homólogos, pueden sustituirse aminoácidos de la proteína por otros aminoácidos que tienen propiedades similares (tales como similar hidrofobicidad, hidrofilicidad, antigenicidad, propensión a formar o romper estructuras de hélice α o estructuras de lámina β). Se conocen bien en la técnica tablas de sustituciones conservativas (véase, por ejemplo, Creighton (1984) Proteins. W.H. Freeman and Company). Los homólogos útiles en el método según la invención tienen una similitud (identidad funcional) o identidad de secuencia de al menos el 50% con la proteína sin modificar, alternativamente una similitud o identidad de secuencia de al menos el 60% con una proteína sin modificar, alternativamente una similitud o identidad de secuencia de al menos el 70% con una proteína sin modificar. Normalmente, los homólogos tienen una similitud o identidad de secuencia de al menos el 80% con una proteína sin modificar, preferiblemente una similitud o identidad de secuencia de al menos el 85%,, además preferiblemente una similitud o identidad de secuencia de al menos el 90% con una proteína sin modificar, lo más preferiblemente una similitud o identidad de secuencia de al menos el 95% con una proteína sin modificar. Los homólogos de metalotioneína incluyen las proteínas que comprenden la secuencia conservada “MSCCGG (N/S) CGCG (T/S/A) (G/A/S) C (K/Q/S) c”, tal como SEQ ID NO 4 o los registros en GenBank CAA71803, AAP94016, CAA71804, NP_195858, AAM62956, AAB61212, CAA65009, CAA92243.

Pueden agruparse las proteínas homólogas en “familias de proteínas”. Una familia de proteínas puede definirse mediante análisis funcional y de similitud de secuencia, tal como, por ejemplo, Clustal W. Puede generarse un árbol del vecino más cercano (*neighbour-joining*) de las proteínas homólogas a la metalotioneína mediante el programa Clustal W y proporciona una buena visión general de su relación estructural y ancestral. En una realización particular de la presente invención, los homólogos metalotioneína pertenecen a la familia de proteínas metalotioneínas de tipo 2 (Cobbett y Goldsbrough, 2002). En el genoma de *Arabidopsis*, se identificaron dos miembros de la familia de tipo 2 de la proteína metalotioneína (registros en GeneBank AAA50250, NP_195858). También pueden identificarse miembros de la familia de la metalotioneína en otras plantas tales como arroz u otras plantas monocotiledóneas. Ventajosamente, estos miembros de la familia también son útiles en los métodos de la presente invención.

Dos formas especiales de homología, ortóloga y paráloga, son conceptos evolutivos usados para describir las relaciones ancestrales de genes. El término “parálogo” se refiere a genes homólogos que resultan de una o más duplicaciones génicas dentro del genoma de una especie. El término “ortólogo” se refiere a genes homólogos en diferentes organismos debido a una relación ancestral de estos genes. El término “homólogos” tal como se usa en el presente documento también engloba parálogos y ortólogos de las proteínas útiles en los métodos según la invención.

Pueden identificarse genes ortólogos realizando una consulta en una o más bases de datos de genes con un gen de interés de consulta, usando por ejemplo el programa BLAST. Los genes objeto de mayor clasificación que resultan de la búsqueda se someten de nuevo a un análisis de BLAST, y sólo aquellos genes objeto que coinciden de nuevo con el gen de consulta se conservan como verdaderos genes ortólogos. Por ejemplo, para hallar un ortólogo de arroz de un gen de *Arabidopsis thaliana*, puede realizarse un análisis de BLASTN o TBLASTX en una base de datos de arroz (tal como (pero sin limitarse a) la base de datos de *Oryza sativa* Nipponbare disponible en el NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) o las secuencias genómicas del arroz (cultivares índica o japónica)). En una siguiente etapa, se usan las secuencias de arroz obtenidas en un análisis de BLAST inverso usando una base de datos de *Arabidopsis*. Los resultados pueden refinarse adicionalmente cuando se analizan las secuencias resultantes con ClustalW y se visualizan en un árbol del vecino más cercano. El método puede usarse para identificar ortólogos de muchas especies diferentes.

Los “homólogos” de una metalotioneína engloban proteínas que tienen sustituciones, inserciones y/o deleciones de aminoácidos con relación a la proteína sin modificar. “Variantes de sustitución” de una proteína son aquéllas en las que se ha eliminado al menos un residuo en una secuencia de aminoácidos y se ha insertado en su lugar un residuo diferente. Las sustituciones de aminoácidos son normalmente de residuos individuales, pero pueden agruparse dependiendo de restricciones funcionales puestas sobre el polipéptido; las inserciones serán habitualmente del orden de aproximadamente 1 a 10 residuos de aminoácidos, y las deleciones oscilarán entre aproximadamente 1 y 20 residuos. Preferiblemente, las sustituciones de aminoácidos comprenden sustituciones de aminoácidos conservativas. “Las variantes de inserción” de una proteína son aquéllas en las que se introducen uno o más residuos de aminoácido en un sitio predeterminado en una proteína. Las inserciones pueden comprender fusiones amino-terminales y/o carboxi-terminales así como inserciones intra-secuencia de aminoácidos individuales o múltiples. Generalmente, las inserciones dentro de la secuencia de aminoácidos serán menores que las fusiones amino o carboxi-terminales, del orden de 1 a 10 residuos. Ejemplos de proteínas o péptidos de fusión amino o carboxi-terminal incluyen el dominio de unión o el dominio de activación de un activador transcripcional tal como se usa en el sistema de dos híbridos en levadura, proteínas de la cubierta de fagos, cola de 6 (histidina), cola de glutatión-S-transferasa, proteína A, proteína de unión a maltosa, dihidrofolato reductasa, epítopo Tag·100, epítopo de c-myc, epítopo FLAG®, lacZ, CMP (péptido de unión a calmodulina), epítopo de HA, epítopo de proteína C y epítopo de VSV. Las “variantes de deleción” de una proteína se caracterizan por la eliminación de uno o más aminoácidos de la proteína. Pueden prepararse fácilmente variantes de aminoácidos de una proteína usando técnicas de síntesis de péptidos bien conocidas en la técnica, tales como síntesis de péptidos en fase sólida y similares, o mediante manipulaciones de ADN recombinante. Se conocen bien en la técnica métodos para la manipulación de secuencias de ADN para producir variantes de sustitución, inserción o deleción de una proteína. Por ejemplo, se conocen bien técnicas para producir mutaciones de sustitución en sitios predeterminados en el ADN por los expertos en la técnica e incluyen mutagénesis con M13, mutagénesis *in vitro* del gen de T7 (USB, Cleveland, OH), mutagénesis dirigida al sitio QuickChange (Stratagene, San Diego, CA), mutagénesis dirigida al sitio mediada por PCR u otros protocolos de mutagénesis dirigida al sitio.

El término “derivados” se refiere a péptidos, oligopéptidos, polipéptidos, proteínas y enzimas que pueden comprender sustituciones, deleciones o adiciones de residuos de aminoácido que se producen y no se producen de manera natural en comparación con la secuencia de aminoácidos de una forma que se produce de manera natural de la proteína, por ejemplo, tal como se presenta en SEQ ID NO: 2. Los “derivados” de una proteína metalotioneína engloban péptidos, oligopéptidos, polipéptidos, proteínas y enzimas que pueden comprender residuos de aminoácido que se producen de manera natural alterados, glicosilados, acilados o que no se producen de manera natural en comparación con la secuencia de aminoácidos de una forma que se produce de manera natural del polipéptido. Un derivado también puede comprender uno o más sustituyentes distintos a aminoácido en comparación con la secuencia de aminoácidos de la que se deriva, por ejemplo una molécula indicadora u otro ligando, unido de manera covalente o no covalente a la secuencia de aminoácidos tal como, por ejemplo, una molécula indicadora que

se une para facilitar su detección, y residuos de aminoácido que no se producen de manera natural con relación a la secuencia de aminoácidos de una proteína que se produce de manera natural.

Los “fragmentos activos” o “fragmentos funcionales” de una metalotioneína engloban al menos 15, preferiblemente 20, 25, más preferiblemente 30 o más residuos de aminoácido contiguos de una proteína, residuos que conservan una actividad biológica y/o funcional similar en comparación con la proteína que se produce de manera natural. Un fragmento de una proteína metalotioneína comprende al menos el dominio N-terminal conservado especificado anteriormente.

El término gen/ácido nucleico que codifica para metalotioneína, tal como se define en el presente documento, se refiere a cualquier ácido nucleico o el complemento del mismo que codifica para una proteína metalotioneína que comprende la secuencia consenso MSCCGG (N/S) CGCG (T/S/A) (G/A/S) C (K/Q/S) C. El ácido nucleico puede derivarse (o bien directa o bien indirectamente (si se modifica posteriormente)) de cualquier fuente siempre que el ácido nucleico, cuando se expresa en una planta, conduzca a la expresión de un gen/ácido nucleico de metalotioneína o al aumento de la actividad y/o los niveles de una proteína metalotioneína. El ácido nucleico puede aislarse de una fuente eucariota, tal como plantas (incluyendo algas). Este ácido nucleico puede modificarse sustancialmente a partir de su forma nativa en composición y/o entorno genómico a través de manipulación humana deliberada. La secuencia de ácido nucleico es preferiblemente una secuencia de ácido nucleico homóloga, es decir una secuencia de ácido nucleico estructural y/o funcionalmente relacionada, preferiblemente obtenida de una planta, ya sea de la misma especie de planta o de una diferente. La secuencia de ácido nucleico puede aislarse de una especie de planta dicotiledónea, preferiblemente de la familia *Brassicaceae*, además preferiblemente de *Arabidopsis thaliana*. Más preferiblemente, el ácido nucleico es tal como se representa por SEQ ID NO: 1 o una parte de la misma o una secuencia de ácido nucleico que puede hibridarse con el mismo, codificando la secuencia de hibridación para proteínas que tienen actividad de proteína metalotioneína, es decir, actividad biológica similar a la de SEQ ID NO:1, o es un ácido nucleico que codifica para un aminoácido representado por SEQ ID NO: 2 o que codifica para un homólogo, derivado o fragmento activo del mismo. Este término también engloba variantes del ácido nucleico que codifican para una proteína metalotioneína debido a la degeneración del código genético; variantes alélicas del ácido nucleico que codifican para una metalotioneína; y diferentes variantes de corte y empalme del ácido nucleico que codifican para una proteína metalotioneína y variantes que están interrumpidas por una o más secuencias intermedias.

Ventajosamente, el método según la presente invención también puede ponerse en práctica usando partes de una secuencia de ADN o ácido nucleico, codificando las partes para un péptido que conserva actividad metalotioneína, es decir, una función biológica similar a la de SEQ ID NO: 2. Partes de una secuencia de ADN se refieren a un trozo de ADN derivado o preparado a partir de una molécula de ADN original (más grande), dando lugar la parte de ADN, cuando se expresa en una planta, a plantas que tienen un aumento del rendimiento de semillas. La parte puede comprender muchos genes, con o sin elementos de control adicionales, o puede contener sólo secuencias espaciadoras, etc.

La presente invención también engloba secuencias de ácido nucleico que pueden hibridarse con una secuencia de ácido nucleico que codifica para una metalotioneína, pudiendo ser también las secuencias de ácido nucleico útiles en la puesta en práctica de los métodos según la invención. El término “hibridación” tal como se define en el presente documento es un proceso en el que sustancialmente secuencias de nucleótidos complementarias homólogas se aparean entre sí. El proceso de hibridación puede producirse completamente en disolución, es decir ambos ácidos nucleicos complementarios están en disolución. Las herramientas en biología molecular que se basan en tal proceso incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; y todos los métodos basados en la misma), hibridación sustractiva, extensión con cebadores aleatorios, mapeo con nucleasa S1, extensión con cebadores, transcripción inversa, síntesis de ADNc, presentación diferencial de ARN y determinación de la secuencia de ADN. El proceso de hibridación también puede producirse con uno de los ácidos nucleicos complementarios inmovilizados en una matriz tal como perlas magnéticas, perlas de Sepharose o cualquier otra resina. Las herramientas en biología molecular que se basan en tal proceso incluyen el aislamiento de ARNm de poli (A+). El proceso de hibridación puede producirse además con unos de los ácidos nucleicos complementarios inmovilizados en un soporte sólido tal como una membrana de nitrocelulosa o nailon o inmovilizados mediante, por ejemplo, fotolitografía en, por ejemplo, un soporte de vidrio silíceo (esto último conocido como alineamientos o microalineamientos de ácido nucleico o como chips de ácido nucleico). Las herramientas en biología molecular que se basan en tal proceso incluyen análisis de transferencia en gel de ARN y ADN, hibridación de colonias, hibridación de placas, hibridación *in situ* e hibridación de microalineamientos. Para permitir que se produzca la hibridación, las moléculas de ácido nucleico generalmente se desnaturalizan térmica o químicamente para fundir una cadena doble en dos cadenas sencillas y/o para eliminar horquillas u otras estructuras secundarias a partir de ácidos nucleicos monocatenarios. La rigurosidad de hibridación está influida por condiciones tales como temperatura, concentración salina y composición del tampón de hibridación. Para aplicaciones que requieren alta selectividad, se deseará normalmente emplear condiciones relativamente rigurosas para formar los híbridos, por ejemplo, se seleccionarán condiciones de relativamente baja concentración salina y/o alta temperatura, tales como las proporcionadas por NaCl aproximadamente de 0,02 M a aproximadamente 0,15 M a temperaturas de aproximadamente 50ºC a aproximadamente 70ºC. Las condiciones de alta rigurosidad para la hibridación incluyen, por tanto, alta temperatura y/o baja concentración salina (las sales

incluyen NaCl y citrato de Na_3) pero también pueden estar influidas por la inclusión de formamida en el tampón de hibridación y/o la disminución de la concentración de compuestos tales como SDS (dodecilsulfato de sodio) en el tampón de hibridación y/o la exclusión de compuestos tales como sulfato de dextrano o polietilenglicol (que promueven la aglomeración molecular) del tampón de hibridación. Se prefieren particularmente condiciones de hibridación de rigurosidad suficientemente baja para el aislamiento de ácidos nucleicos homólogos a las secuencias de ADN de la invención definidas anteriormente. Los elementos que contribuyen a la homología incluyen el alelismo, la degeneración del código genético y las diferencias en la utilización de codones preferidos.

Las “condiciones de hibridación rigurosas” y “condiciones de lavado de hibridación rigurosas” en el contexto de experimentos de hibridación de ácidos nucleicos tales como hibridaciones de tipo Southern y Northern dependen de la secuencia y son diferentes en diferentes parámetros ambientales. Por ejemplo, secuencias más largas se hibridan específicamente a mayores temperaturas. La T_f es la temperatura a una fuerza iónica y un pH definidos, a la que el 50% de la secuencia diana se hibrida con una sonda perfectamente coincidente. La especificidad es normalmente la función de los lavados tras la hibridación. Los factores críticos de tales lavados incluyen la fuerza iónica y la temperatura de la disolución de lavado final.

Generalmente, se selecciona que las condiciones rigurosas sean aproximadamente 50ºC menores que el punto de fusión térmico (T_f) para la secuencia específica a una fuerza iónica y un pH definidos. La T_f es la temperatura a una fuerza iónica y un pH definidos, a la que el 50% de la secuencia diana se hibrida con una sonda perfectamente coincidente. La T_f depende de las condiciones de disolución y la composición de bases de la sonda, y puede calcularse usando la siguiente ecuación:

$$T_f = 79{,}8ºC + (18{,}5 \times \log[Na^+]) + (58{,}4ºC \times \%\text{ de }[G+C]) - (820 \times (\text{n.º de pb en dúplex})^{-1}) - (0{,}5 \times \%\text{ de formamida})$$

Condiciones rigurosas más preferidas son cuando la temperatura es de 20ºC por debajo de la T_f, y las condiciones rigurosas más preferidas son cuando la temperatura es de 10ºC por debajo de la T_f. También puede controlarse la unión no específica usando una cualquiera de varias técnicas conocidas tales como, por ejemplo, el bloqueo de la membrana con disoluciones que contienen proteína, adiciones de ADN, ARN heterológo y SDS al tampón de hibridación, y tratamiento con ARNasa.

Las condiciones de lavado se realizan normalmente a o por debajo de la rigurosidad de hibridación. Generalmente, condiciones rigurosas adecuadas para ensayos de hibridación de ácidos nucleicos o procedimientos de detección de amplificación génica son tal como se expusieron anteriormente. También pueden seleccionarse condiciones más o menos rigurosas.

Para los fines de definir el nivel de rigurosidad, puede hacerse referencia convenientemente a Sambrook *et al*. (2001) Molecular Cloning: a laboratory manual, 3ª edición Cold Spring Harbor Laboratory Press, CSH, Nueva York o a Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989). Un ejemplo de condiciones de baja rigurosidad es SSC 4-6x / SDS al 0,1-0,5% p/v a 37-45ºC durante 2-3 horas. Dependiendo de la fuente y la concentración del ácido nucleico implicado en la hibridación, pueden emplearse condiciones de rigurosidad alternativas tales como condiciones rigurosas medias. Ejemplos de condiciones rigurosas medias incluyen SSC 1-4x / SDS al 0,25% p/v a ≥ 45ºC durante 2-3 horas. Un ejemplo de las condiciones de alta rigurosidad incluye SSC 0,1-1x / SDS al 0,1% p/v a 60ºC durante 1-3 horas. El experto conoce diversos parámetros que pueden alterarse durante la hibridación y el lavado y que o bien mantendrán o bien cambiarán las condiciones de rigurosidad. Por ejemplo, otra condición de hibridación rigurosa es la hibridación a SSC 4x a 65ºC, seguida por un lavado con SSC 0,1x a 65ºC durante aproximadamente una hora. Un ejemplo alternativo de condiciones de hibridación rigurosas es en formamida al 50%, SSC 4x a 42ºC. Todavía otro ejemplo de condiciones rigurosas incluye la hibridación a 62ºC en SSC 6x, BLOTTO 0,05x y lavado a SSC 2x, SDS al 0,1% p/v a 62ºC.

Se describen en el presente documento métodos que se ponen en práctica usando una variante alternativa de corte y empalme de una secuencia de ácido nucleico que codifica para una metalotioneína. El término “variante alternativa de corte y empalme” tal como se usa en el presente documento engloba variantes de una secuencia de ácido nucleico en la que se han cortado, sustituido o añadido intrones y/o exones seleccionados. Tales variantes serán aquéllas en las que la actividad biológica de la proteína permanece sin afectarse, lo que puede lograrse mediante la conservación selectiva de fragmentos funcionales de la proteína. Tales variantes de corte y empalme pueden encontrarse en la naturaleza o pueden ser artificiales. Se conocen bien en la técnica métodos para producir tales variantes de corte y empalme. Por tanto, se describe en el presente documento un método para modificar las características de crecimiento de plantas, que comprende modular la expresión en una planta de una variante alternativa de corte y empalme de una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína metalotioneína y/o modular la actividad y/o los niveles de una proteína metalotioneína codificada por la variante alternativa de corte y empalme Preferiblemente, la variante de corte y empalme es una variante de corte y empalme de la secuencia representada por SEQ ID NO: 1.

Se describen en el presente documento métodos que se ponen en práctica usando variantes alélicas de una secuencia de ácido nucleico que codifica para una metalotioneína, preferiblemente una variante alélica de una secuencia representada por SEQ ID NO: 1. Las variantes alélicas existen en la naturaleza y el uso de estos alelos naturales está englobado dentro de los métodos de la presente invención. Las variantes alélicas engloban polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), así como polimorfismos de pequeña inserción/deleción (INDEL). El tamaño de los INDEL es habitualmente inferior a 100 pb. Los SNP e INDEL forman el mayor conjunto de variantes de secuencia en cepas polimórficas que se producen de manera natural de la mayoría de organismos. Son útiles en el mapeo de genes y el descubrimiento de genes y funciones génicas. Además son útiles en la identificación de loci genéticos, por ejemplo genes de plantas, implicados en la determinación de procesos tales como la velocidad de crecimiento, el tamaño de la planta y el rendimiento de la planta, el vigor de la planta, la resistencia a enfermedades, la tolerancia al estrés, etc. Hoy en día están disponibles muchas técnicas para identificar SNP y/o INDEL incluyendo (i) PCR seguida por cromatografía de líquidos de alta resolución desnaturalizante (DHPLC; por ejemplo Cho *et al*. (1999) Nature Genet. 23, 203-207); (ii) electroforesis capilar desnaturalizante constante (CDCE) combinada con PCR de alta fidelidad (por ejemplo Li-Talesoleiki *et al*. (1999) Electrophoresis 20, 1224-1232); (iii) electroforesis en gel desnaturalizante en gradiente (Fischer y Lerman (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 1579-1583); (iv) espectrometría de masas de tiempo de vuelo de desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF MS; por ejemplo Ross *et al*. (2000) Biotechniques 29, 620-629); (v) ensayos de PCR con monitorización de fluorescencia en tiempo real (Tapp *et al*. (2000) Biotechniques 28, 732-738); (vi) tecnología de gel Acrydite™ (Kenney *et al*. (1998) Biotechniques 25, 516-521); (vii) formación de huellas dactilares con didesoxi en ciclos (CddF; Langemeier *et al*. (1994) Biotechniques 17, 484-490); (viii) análisis de polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP) (Vidal-Puig y Moller (1994) Biotechniques 17, 490-496) y (ix) reacción de extensión de cebadores de minisecuenciación (Syvanen (1999) Hum. Mutat. 13, 1-10). La técnica de “detección de lesiones locales inducidas en genomas” (TILLING; McCallum *et al*. (2000) Nat. Biotechnol. 18, 455-457; Plant Physiol. 123, 439-442), que es una variante de (i) citado anteriormente, también puede aplicarse para identificar rápidamente un gen alterado en, por ejemplo, individuos vegetales mutagenizados químicamente que muestran fenotipos interesantes. También se describe el uso de estas variantes alélicas en programas de reproducción convencional particulares, tales como en reproducción asistida por marcadores; esto puede ser además de su uso en los métodos según la presente invención. Tales programas de reproducción requieren a veces la introducción de variaciones alélicas en las plantas mediante tratamiento mutagénico de una planta. Un método mutagénico adecuado es la mutagénesis EMS. La identificación de variantes alélicas puede tener lugar entonces mediante, por ejemplo, PCR. Esto va seguido por una etapa de selección para la selección de variantes alélicas superiores de la secuencia de metalotioneína en cuestión y que dan lugar a crecimiento y desarrollo modificados en una planta. La selección se lleva a cabo normalmente monitorizando el rendimiento de crecimiento de plantas que contienen diferentes variantes alélicas de la secuencia en cuestión, por ejemplo, diferentes variantes alélicas de SEQ ID NO: 1. Monitorizar el rendimiento de crecimiento puede realizarse en un invernadero o en el campo. Etapas opcionales adicionales incluyen el cruzamiento de plantas, en las que se identificó la variante alélica superior, con otra planta. Esto podría usarse, por ejemplo, para obtener una combinación de características fenotípicas interesantes. Por tanto, como pueden producirse de manera natural mutaciones en el gen de metalotioneína, pueden formar la base para la selección de plantas que muestran mayor rendimiento. Se describe en el presente documento el uso de un ácido nucleico que codifica para una metalotioneína o el uso de un ácido nucleico que puede modular la actividad y/o los niveles de una metalotioneína en programas de reproducción.

También se describe en el presente documento el uso de una secuencia de nucleótidos que puede modular la expresión de un ácido nucleico que codifica para una metalotioneína en programas de reproducción. La secuencia de ácido nucleico puede estar en un cromosoma, o una parte del mismo, que comprende al menos la secuencia de ácido nucleico que codifica para la metalotioneína y preferiblemente también uno o más miembros de la familia relacionados. En un ejemplo de un programa de reproducción de este tipo, se identifica un marcador de ADN que puede unirse genéticamente a un gen que puede modular la expresión de un ácido nucleico que codifica para una metalotioneína en una planta, pudiendo ser ese gen un gen que codifica para la propia metalotioneína o cualquier otro gen que puede influir directa o indirectamente en la expresión del gen que codifica para una metalotioneína y/o la actividad de la propia metalotioneína. Este marcador de ADN puede usarse entonces en programas de reproducción para seleccionar plantas que tienen características de crecimiento alteradas.

Los métodos también pueden ponerse en práctica introduciendo en una planta al menos una parte de un cromosoma (natural o artificial) (tal como un cromosoma bacteriano artificial (BAC)), conteniendo ese cromosoma al menos un gen/secuencia de ácido nucleico que codifica para una metalotioneína (tal como SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3), preferiblemente junto con uno o más miembros de la familia de genes relacionados. Por tanto, se proporciona un método para modificar el crecimiento y el desarrollo de plantas introduciendo en una planta al menos una parte de un cromosoma que comprende al menos un gen/ácido nucleico que codifica para una metalotioneína.

También se proporciona un método para aumentar el rendimiento de semillas de plantas, que comprende aumentar la expresión en una planta de una secuencia de ácido nucleico que codifica para una metalotioneína y/o aumentar la actividad y/o los niveles en una planta de una metalotioneína, en el que dicha secuencia de ácido nucleico y dichas proteínas incluyen variantes elegidas de:

(i) un ácido nucleico tal como se representa por SEQ ID NO: 1 o que codifica para una proteína metalotioneína tal como se representa por SEQ ID NO: 2;

(ii) un ácido nucleico que codifica para una metalotioneína que comprende la secuencia consenso MSCCGG (N/S) CGCG (T/S/A) (G/A/S) C (K/Q/S) C;

(iii) una proteína metalotioneína tal como se representa por SEQ ID NO: 2

(iv) homólogos, derivados y fragmentos activos de una proteína metalotioneína que comprende la secuencia consenso MSCCGG (N/S) CGCG (T/S/A) (G/A/S) C (K/Q/S) C.

Según la presente invención, se prevé la potenciación o el aumento de la expresión de un ácido nucleico. Están bien documentados en la técnica métodos para obtener la potenciación o el aumento de la expresión de genes o productos génicos e incluyen, por ejemplo, la sobreexpresión dirigida por un promotor (fuerte), el uso de potenciadores de la transcripción o potenciadores de la traducción. El término sobreexpresión tal como se usa en el presente documento significa cualquier forma de expresión que es adicional al nivel de expresión de tipo natural original. El ácido nucleico que va a introducirse en la planta y/o que va a sobreexpresarse está orientado en la dirección sentido con respecto al promotor al que va a unirse operativamente. Preferiblemente, el ácido nucleico que va a sobreexpresarse codifica para una metalotioneína, además preferiblemente la secuencia de ácido nucleico que codifica para la metalotioneína se aísla de una planta dicotiledónea, preferiblemente de la familia *Brassicaceae*, además preferiblemente en el que la secuencia se aísla de *Arabidopsis thaliana,* lo más preferiblemente la secuencia de ácido nucleico es tal como se representa por SEQ ID NO: 1 o una parte de la misma, o codifica para una secuencia de aminoácidos tal como se representa por SEQ ID NO: 2 o un homólogo, derivado o fragmento activo de la misma. Alternativamente, la secuencia de ácido nucleico que codifica para la metalotioneína es tal como se representa por SEQ ID NO: 3 o es una parte de la misma, o codifica para una secuencia de aminoácidos tal como se representa por SEQ ID NO: 4 o codifica para un homólogo, derivado o fragmento activo de la misma. Debe indicarse que la aplicabilidad de la invención no se limita al uso del ácido nucleico representado por SEQ ID NO: 1 ni a la secuencia de ácido nucleico que codifica para la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, sino que pueden usarse otras secuencias de ácido nucleico que codifican para homólogos, derivados o fragmentos activos de SEQ ID NO: 2, o partes de SEQ ID NO: 1, o secuencias que se hibridan con SEQ ID NO: 1, en los métodos de la presente invención.

También se describe en el presente documento la disminución de la expresión de una secuencia de ácido nucleico. Modular la expresión génica (ya sea mediante un enfoque directo o indirecto) engloba niveles alterados de transcrito de un gen. Los niveles alterados de transcrito pueden ser suficientes para inducir determinados efectos fenotípicos, por ejemplo a través del mecanismo de cosupresión. En este caso, el efecto global de la sobreexpresión de un transgén es que hay menos actividad en la célula de la proteína codificada por un gen nativo que tiene homología con el transgén introducido. Otros ejemplos de disminución de la expresión también están bien documentados en la técnica e incluyen, por ejemplo, regulación por disminución de la expresión mediante técnicas antisentido, técnicas de cosupresión, técnicas de ARNi, ARN de interferencia pequeños (ARNip), microARN (miARN), el uso de ribozimas, etc. Por tanto se describe en el presente documento un método para modular características de crecimiento de plantas, incluyendo tecnologías que se basan en la síntesis de transcritos antisentido, complementarios al ARNm de un gen de metalotioneína, o basados en interferencia de ARN. Pueden obtenerse plantas que tienen características de crecimiento modificadas expresando una secuencia de ácido nucleico que codifica para una metalotioneína en orientación o bien sentido o bien antisentido. Se conocen bien técnicas para la regulación por disminución en la técnica. Los términos “silenciamiento génico” o “regulación por disminución” de la expresión, tal como se usa en el presente documento, se refieren a la disminución de los niveles de expresión génica y/o los niveles de producto génico activo y/o los niveles de actividad del producto génico. Tales disminuciones en la expresión pueden lograrse mediante, por ejemplo, la adición de secuencias codificantes o partes de las mismas en una orientación sentido (si se desea lograr la cosupresión). Puede modificarse el crecimiento de una planta introduciendo en una planta una copia adicional (en su totalidad o en parte) de un gen de metalotioneína ya presente en una planta huésped. El gen adicional silenciará el gen endógeno dando lugar a un fenómeno conocido como cosupresión.

Los constructos genéticos que tienen como objetivo silenciar la expresión génica pueden comprender la secuencia de nucleótidos de metalotioneína, por ejemplo tal como se representa por SEQ ID NO: 1 (o una o más partes de la misma) en una orientación sentido y/o antisentido con relación a la secuencia promotora. Las copias sentido o antisentido de al menos parte del gen endógeno en forma de repeticiones directas o invertidas pueden utilizarse en los métodos según la invención. Las características de crecimiento de plantas también pueden modificarse introduciendo en una planta al menos parte de una versión antisentido de la secuencia de nucleótidos representada, por ejemplo, por SEQ ID NO: 1. Debe quedar claro que parte del ácido nucleico (una parte) podría lograr el resultado deseado. Se prefieren genes antisentido homólogos a genes antisentido heterólogos, siendo los genes homólogos genes de plantas, preferiblemente genes de plantas de la misma especie de planta, y siendo los genes heterólogos de especies distintas a plantas.

Otro método para la regulación por disminución de la expresión génica o el silenciamiento génico comprende el uso de ribozimas, por ejemplo tal como se describe en Atkins *et al*. 1994 (documento WO 94/00012), Lenee *et al*. 1995 (documento WO 95/03404), Lutziger *et al*. 2000 (documento WO 00/00619), Prinsen *et al*. 1997 (documento WO 97/3865) y Scott *et al*. 1997 (documento WO 97/38116).

El silenciamiento génico también puede lograrse mediante mutagénesis por inserción (por ejemplo, inserción de ADN-T o inserción de transposones) o mediante estrategias de silenciamiento génico tal como se describe por, entre otros, Angell y Baulcombe 1998 (documento WO 98/36083), Lowe *et al*. 1989 (documento WO 98/53083), Lederer *et al*. 1999 (documento WO 99/15682) o Wang *et al*. 1999 (documento WO 99/53050). La expresión de un gen endógeno también puede reducirse si el gen endógeno contiene una mutación. Puede aislarse un gen mutante de este tipo e introducirse en la misma especie de planta o una diferente para obtener plantas que tienen características de crecimiento modificadas.

Ventajosamente, la realización del método según la presente invención da como resultado plantas que tienen un aumento del rendimiento de semillas.

Las características de crecimiento modificadas tal como se describen en el presente documento también incluyen crecimiento modificado, rendimiento/biomasa modificados, arquitectura modificada y una división celular modificada, cada uno con relación a plantas de tipo natural correspondientes. Preferiblemente, las características de crecimiento modificadas son características de crecimiento mejoradas e incluyen arquitectura modificada, aumento del rendimiento/biomasa con la condición de que el aumento del rendimiento no sea el aumento de la acumulación de metales, respuesta al estrés modificada con la condición de que el estrés no sea estrés abiótico, y crecimiento más rápido, cada uno con relación a plantas de tipo natural correspondientes.

Las características de crecimiento tal como se describen en el presente documento comprenden una o más cual(es)quiera seleccionada(s) de: aumento del rendimiento, aumento de la biomasa, aumento del área sobre el terreno total, aumento de la altura de la planta, aumento del número de vástagos, aumento del número de primeras panículas, aumento del número de segundas panículas, aumento del número total de semillas, aumento del número de semillas llenas, aumento del rendimiento de semillas total por planta, aumento del índice de cosecha, aumento del peso de mil granos, aumento de Tmid, aumento de T45 o A90, aumento de A42, tiempo de ciclación alterado y/o una curva de crecimiento alterada. Se describen en el presente documento métodos para alterar una de las características de crecimiento mencionadas anteriormente, sin producir una penalización en una de las demás características de crecimiento, por ejemplo aumento del área de tejido verde sobre el terreno a la vez que se conserva el mismo número de semillas llenas y el mismo rendimiento de semillas.

El término “aumento del rendimiento” engloba un aumento en la biomasa en una o más partes de una planta con relación a biomasa de plantas de tipo natural correspondientes. El término engloba un aumento en el rendimiento de semillas, lo que incluye un aumento en la biomasa de la semilla (peso de semilla) y/o un aumento en el número de semillas (llenas) y/o en el tamaño de las semillas y/o un aumento en el volumen de semillas, cada uno con relación a plantas de tipo natural correspondientes. Para el maíz, el aumento del rendimiento de semillas puede reflejarse en un aumento de filas (de semillas) por mazorca y/o un aumento del número de granos por fila. Un aumento en el tamaño y/o volumen de semillas también puede influir en la composición de semillas. Un aumento en el rendimiento de semillas podría deberse a un aumento en el número y/o el tamaño de las flores. Un aumento en el rendimiento también podría aumentar el índice de cosecha, que se expresa como una razón de biomasa total con respecto a rendimiento de partes cosechables, tales como semillas; o el peso de mil granos. El aumento del rendimiento también engloba la capacidad para la plantación a mayor densidad (número de plantas por hectárea o acre).

También la división celular modificada puede contribuir al aumento del rendimiento. El término “división celular modificada” engloba un aumento o una disminución en la división celular o una citocinesis/división celular anómala, plano de división alterado, polaridad celular alterada, diferenciación celular alterada. El término también comprende fenómenos tales como endomitosis, acitocinesis, poliploidía, politenia y endorreduplicación. Puede preverse que plantas que tienen un aumento de la biomasa y la altura presenten una velocidad de crecimiento modificada en comparación con plantas de tipo natural correspondientes. El término “velocidad de crecimiento modificada” tal como se usa en el presente documento engloba, pero no se limita a, una velocidad de crecimiento más rápida en una o más partes de una planta (incluyendo biomasa verde e incluyendo semillas), en una o más etapas en el ciclo vital de una planta. El término “crecimiento mejorado” engloba vigor potenciado, floración más temprana, tiempo de ciclación modificado. Las plantas con crecimiento modificado pueden mostrar una curva de crecimiento modificada y pueden tener valores modificados para su Tmid o T90 (respectivamente el tiempo necesario para alcanzar la mitad de su área máxima o el 90% de su área, cada uno con relación a plantas de tipo natural correspondientes).

Según la presente invención, la realización de los métodos según la presente invención da como resultado plantas que tienen un aumento del rendimiento de semillas. Preferiblemente, el aumento del rendimiento de semillas incluye un aumento del número total de semillas y/o un aumento del peso total de semillas, cada uno con relación a plantas control. Por tanto, según la presente invención, se proporciona un método para aumentar el rendimiento de semillas de plantas, comprendiendo el método la introducción y sobreexpresión en una planta de una secuencia de ácido

nucleico que codifica para una metalotioneína que comprende la secuencia consenso MSCCGG (N/S) CGCG (T/S/A) (G/A/S) C (K/Q/S) C, preferiblemente en la que la metalotioneína está codificada por una secuencia de ácido nucleico representada por SEQ ID NO: 1 o una parte de la misma o por secuencias que pueden hibridarse con la misma o en la que la metalotioneína está representada por SEQ ID NO: 2 o es un polipéptido de metalotioneína que comprende la secuencia consenso MSCCGG (N/S) CGCG (T/S/A) (G/A/S) C (K/Q/S) C. Alternativamente, la metalotioneína que comprende la secuencia consenso MSCCGG (N/S) CGCG (T/S/A) (G/A/S) C (K/Q/S) C puede estar codificada por una secuencia de ácido nucleico representada por SEQ ID NO: 3, o por una parte de la misma, o por secuencias que pueden hibridarse con la misma, o en la que la metalotioneína está representada por SEQ ID NO: 4, o un homólogo, derivado o fragmento activo de la cualquiera de las mismas.

La “arquitectura modificada” puede deberse a un cambio en la división celular. El término “arquitectura” tal como se usa en el presente documento engloba el aspecto o la morfología de una planta, incluyendo una o más característica(s) estructural(es) cual(es)quiera o combinación de características estructurales de la misma. Tales características estructurales incluyen la forma, el tamaño, el número, la posición, la textura, la disposición y el patrón de cualquier célula, tejido u órgano o grupos de células, tejidos u órganos de una planta, incluyendo la raíz, la hoja, el brote, el tallo o el vástago, el peciolo, la tricoma, la flor, la inflorescencia (para plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas), las panículas, el pétalo, el estigma, el estilo, el estambre, el polen, el óvulo, la semilla, el embrión, el endospermo, el tegumento, la aleurona, la fibra, el cámbium, la madera, el duramen, el parénquima, el aerénquima, el elemento criboso, el floema o el tejido vascular, entre otros. Por tanto, la arquitectura modificada incluye todos los aspectos de crecimiento modificado de la planta.

Preferiblemente, la arquitectura modificada incluye un número modificado de primeras panículas, altura modificada de la planta y área total modificada, cada uno con relación a plantas control. Se describe en el presente documento un método para modificar la arquitectura de plantas, particularmente el número de primeras panículas, la altura de la planta y el área de la planta, comprendiendo el método modular la expresión de una secuencia de ácido nucleico que codifica para una metalotioneína y/o modular la actividad de la propia metalotioneína en una planta, preferiblemente en el que la metalotioneína está codificada por una secuencia de ácido nucleico representada por SEQ ID NO: 1 o una parte de la misma o secuencias que pueden hibridarse con la misma o en el que la metalotioneína está representada por SEQ ID NO: 2 o un homólogo, derivado o fragmento activo de la misma. Alternativamente, la metalotioneína puede estar codificada por una secuencia de ácido nucleico representada por SEQ ID NO: 3, o por una parte de la misma o por secuencias que pueden hibridarse con las secuencias mencionadas anteriormente, o en el que la metalotioneína está representada por SEQ ID NO: 4, o un homólogo, derivado o fragmento activo de la misma.

También se describen en el presente documento constructos genéticos y se proporcionan vectores para facilitar la introducción y/o expresión de las secuencias de nucleótidos útiles en los métodos según la invención. Por tanto, se describe en el presente documento un constructo génico que comprende:

(i) una secuencia de ácido nucleico que codifica para una metalotioneína;

(ii) un promotor GOS2 para dirigir la expresión de la secuencia de ácido nucleico de (i); y opcionalmente

(iii) una secuencia de terminación de la transcripción.

Pueden construirse constructos útiles en los métodos según la presente invención usando la tecnología de ADN recombinante bien conocida por los expertos en la técnica. Los constructos génicos pueden insertarse en vectores, que pueden estar disponibles comercialmente, adecuados para la transformación en plantas y adecuados para la expresión del gen de interés en las células transformadas. El constructo genético puede ser un vector de expresión en el que la secuencia de ácido nucleico se une operativamente a una o más secuencias de control que permiten la expresión en células huésped procariotas y/o eucariotas.

El constructo genético descrito en el presente documento es un vector de expresión diseñado para sobreexpresar la secuencia de ácido nucleico. La secuencia de ácido nucleico que puede dar la sobreexpresión de un ácido nucleico que codifica para una metalotioneína y/o la actividad de la propia metalotioneína puede ser una secuencia de ácido nucleico que codifica para una metalotioneína o un homólogo, derivado o fragmento activo de la misma que comprende la secuencia consenso MSCCGG (N/S) CGCG (T/S/A) (G/A/S) C (K/Q/S) C, tal como cualquiera de las secuencias de ácido nucleico descritas anteriormente en el presente documento. Una secuencia de ácido nucleico preferida es la secuencia representada por SEQ ID NO: 1 o una parte de la misma o secuencias que pueden hibridarse con la misma o una secuencia de ácido nucleico que codifica para una secuencia representada por SEQ ID NO: 2 o un homólogo, derivado o fragmento activo de la misma que comprende la secuencia consenso MSCCGG(N/S)CGCG(T/S/A)(G/A/S)C(K/Q/S)C. Para la sobreexpresión, este ácido nucleico se clona en la orientación sentido con relación a la secuencia de control a la que va a unirse operativamente.

Se transforman plantas con un vector que comprende la secuencia de interés (es decir, la secuencia de ácido

nucleico que puede sobreexpresar un ácido nucleico que codifica para una metalotioneína), estando la secuencia unida operativamente a una o más secuencias de control (al menos un promotor). Los términos “elemento regulador”, “secuencia de control” y “promotor” se usan todos en el presente documento de manera intercambiable y han de tomarse en un contexto amplio para referirse a secuencias reguladoras de ácido nucleico que pueden efectuar la expresión de las secuencias a las que se ligan. Están englobadas por los términos mencionados anteriormente, secuencias reguladoras de la transcripción derivadas de un gen genómico eucariota clásico (incluyendo la caja TATA que se requiere para la iniciación de la transcripción exacta, con o sin una secuencia de caja CCAAT) y elementos reguladores adicionales (es decir, secuencias de activación en el sentido de 5’, potenciadores y silenciadores) que alteran la expresión génica en respuesta a estímulos de desarrollo y/o externos, o de manera específica del tejido. También está incluida dentro del término una secuencia reguladora de la transcripción de un gen procariota clásico, en cuyo caso puede incluir una secuencia de caja -35 y/o secuencias reguladoras de la transcripción de caja -10. El término “elemento regulador” también engloba una molécula de fusión sintética o un derivado que confiere, activa o potencia la expresión de una molécula de ácido nucleico en una célula, un tejido o un órgano. Los términos “secuencia de control”, “secuencia reguladora”, “elemento regulador” y “promotor” se usan todos en el presente documento de manera intercambiable. El término “unido operativamente” tal como se usa en el presente documento se refiere a una unión funcional entre la secuencia promotora y el gen de interés, de manera que la secuencia promotora puede iniciar la transcripción del gen de interés.

Ventajosamente, puede usarse cualquier tipo de promotor para dirigir la expresión de la secuencia de ácido nucleico dependiendo del resultado deseado. Preferiblemente, la secuencia de ácido nucleico que puede dar sobreexpresión de un gen que codifica para una metalotioneína está unida operativamente a un promotor constitutivo. El término “constitutivo” tal como se define en el presente documento se refiere a un promotor que se expresa predominantemente en al menos un tejido u órgano y predominantemente en cualquier etapa vital de la planta. Preferiblemente, el promotor se expresa predominantemente en la totalidad de la planta. Preferiblemente, el promotor constitutivo es el promotor GOS2 del arroz, o un promotor de fuerza similar y/o un promotor con un patrón de expresión similar. Alternativamente, pueden usarse promotores específicos de tejido. Por ejemplo, en los casos en los que se prevé el aumento del rendimiento de semillas, puede contemplarse el uso de promotores preferidos para semillas, preferidos para flores, preferidos para meristemos o promotores activos en células en división. Pueden analizarse la fuerza del promotor y/o el patrón de expresión por ejemplo acoplando el promotor a un gen indicador y someter a ensayo la expresión del gen indicador en diversos tejidos de la planta. Un gen indicador adecuado bien conocido por un experto en la técnica es beta-glucuronidasa. Se presentan ejemplos de promotores constitutivos alternativos en la tabla 1, y estos promotores o derivados de los mismos son útiles para los métodos de la presente invención.

Tabla 1: Promotores constitutivos a modo de ejemplo para su uso en la realización de la presente invención

Fuente del gen	Bibliografía
Actina	McElroy *et al*, Plant Cell, 2: 163-171, 1990
35S de VMCo	Odell *et al*, Nature, 313: 810-812, 1985
19S de VMCo	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 del arroz	Buchholz *et al*. Plant Mol Biol. 25(5): 837-43, 1994
histona H3 del maíz	Lepetit *et al*, Mol. Gen. Genet 231: 276-285, 1992
actina 2	An *et al*, Plant J. 10(1); 107-121, 1996

Opcionalmente, también pueden usarse una o más secuencias terminadoras en el constructo introducido en una planta. El término “terminador” engloba una secuencia de control que es una secuencia de ADN en el extremo de una unidad de transcripción que señaliza el procesamiento en 3’ y la poliadenilación de un transcrito primario y la terminación de la transcripción. Elementos reguladores adicionales pueden incluir potenciadores transcripcionales así como traduccionales. Los expertos en la técnica conocerán secuencias terminadoras y potenciadoras que pueden ser adecuadas para su uso en la realización de la invención. Tales secuencias las conocería o puede obtenerlas fácilmente un experto en la técnica.

Los constructos genéticos de la invención pueden incluir además una secuencia de origen de replicación que se requiere para el mantenimiento y/o la replicación en un tipo celular específico. Un ejemplo es cuando se requiere que se mantenga un constructo genético en una célula bacteriana como un elemento genético episómico (por ejemplo, molécula de plásmido o cósmido). Los orígenes de replicación preferidos incluyen, pero no se limitan a, f1-ori y colE1.

El constructo genético puede comprender opcionalmente un gen marcador seleccionable. Tal como se usa en el presente documento, el término “gen marcador seleccionable” incluye cualquier gen que confiera un fenotipo a una célula en la que se expresa para facilitar la identificación y/o selección de células que se transfectan o transforman con un constructo de ácido nucleico de la invención. Pueden seleccionarse marcadores adecuados de marcadores que confieren resistencia a antibióticos o herbicidas, que introducen un nuevo rasgo metabólico o que permiten la selección visual. Los ejemplos de genes marcadores seleccionables incluyen genes que confieren resistencia a antibióticos (tales como nptII que fosforila neomicina y kanamicina, o hpt, que fosforila higromicina), a herbicidas (por ejemplo, bar que proporciona resistencia a Basta; aroA o gox que proporciona resistencia frente a glifosato), o genes que proporcionan un rasgo metabólico (tales como manA que permite que las plantas usen manosa como única fuente de carbono). Los genes marcadores visuales dan como resultado la formación de color (por ejemplo, β-glucuronidasa, GUS), luminiscencia (tales como luciferasa) o fluorescencia (proteína fluorescente verde, GFP, y derivados de la misma).

Se describe en el presente documento el constructo genético tal como se mencionó anteriormente, que comprende un gen de metalotioneína en orientación sentido acoplado a un promotor que es preferiblemente un promotor constitutivo, tal como el promotor GOS2 del arroz. Por tanto, se describe en el presente documento un constructo de vector que comprende un casete de expresión esencialmente similar a SEQ ID NO: 7, comprendiendo el casete el promotor GOS2 del arroz, el gen de metalotioneína de *Arabidopsis* presentado en SEQ ID NO: 2 y la zeína T + secuencia de terminación de la transcripción T-rubisco deltaGA.

Alternativamente, se describe en el presente documento un constructo de vector que comprende un casete de expresión esencialmente similar a SEQ ID NO: 7. Una secuencia esencialmente similar a SEQ ID NO: 7 engloba una primera secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína homóloga a SEQ ID NO: 2 o que se hibrida a SEQ ID NO: 1, uniéndose operativamente el primer ácido nucleico a un promotor GOS2 del arroz o un promotor con un patrón de expresión similar y/o uniéndose el primer ácido nucleico a una secuencia de terminación de la transcripción. Por tanto, se describe en el presente documento un constructo génico esencialmente similar a SEQ ID NO: 7, que comprende un casete de expresión en el que se ubica una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína metalotioneína, elegida del grupo que comprende:

(i) una secuencia de ácido nucleico representada por SEQ ID NO: 1 o la cadena complementaria de la misma;

(ii) una secuencia de ácido nucleico que codifica para una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2 u homólogos, derivados o fragmentos activos de la misma que comprenden la secuencia consenso MSCCGG(N/S)CGCG(T/S/A)(G/A/S)C(K/Q/S)C;

(iii) una secuencia de ácido nucleico según (i) a (ii) anteriormente que es degenerada como resultado del código genético;

(iv) una secuencia de ácido nucleico que es una variante alélica de las secuencias de ácido nucleico según (i) a (iii);

(v) una secuencia de ácido nucleico que es una variante alternativa de corte y empalme de las secuencias de ácido nucleico según (i) a (iv);

También se describen en el presente documento plantas que pueden obtenerse mediante los métodos según la presente invención, teniendo las plantas un crecimiento y desarrollo modificados y teniendo las plantas un aumento de la actividad de metalotioneína y/o un aumento de la expresión de una secuencia de ácido nucleico que codifica para una metalotioneína. Preferiblemente, las plantas son plantas transgénicas que comprenden una secuencia de ácido nucleico introducida que codifica para una metalotioneína y que tienen un aumento del rendimiento y/o la biomasa, caracterizadas porque la planta transgénica se ha seleccionado por la sobreexpresión de una secuencia de ácido nucleico que codifica para una metalotioneína y/o la actividad modulada de una metalotioneína. Además preferiblemente, la planta transgénica se ha seleccionado por el aumento de la expresión de un ácido nucleico que codifica para una metalotioneína.

Según otra realización de la presente invención, se proporciona un método para la producción de plantas transgénicas que tienen un aumento del rendimiento de semillas, que comprende la introducción y la expresión en una planta de una molécula de ácido nucleico que codifica para una metalotioneína que comprende: la secuencia consenso MSCCGG (N/S) CGCG (T/S/A) (G/A/S) C (K/Q/S) C.

Más específicamente, la presente invención proporciona un método para la producción de plantas transgénicas que tienen un aumento del rendimiento de semillas, comprendiendo el método:

(i) introducir en una planta o célula vegetal una secuencia de ácido nucleico que codifica para una metalotioneína que comprende la secuencia consenso MSCCGG (N/S) CGCG (T/S/A) (G/A/S) C (K/Q/S) C;

(ii) regenerar y/o hacer crecer una planta a partir de una célula de planta transgénica.

La propia proteína y/o el propio ácido nucleico pueden introducirse directamente en una célula vegetal o en la propia planta (incluyendo la introducción en un tejido, órgano o cualquier otra parte de la planta). Según una característica preferida de la presente invención, la secuencia de ácido nucleico se introduce preferiblemente en una planta mediante transformación. La secuencia de ácido nucleico es preferiblemente tal como se representa por SEQ ID NO: 1 o una parte de la misma o secuencias que pueden hibridarse con la misma, o es una secuencia de ácido nucleico que codifica para una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2 o un homólogo, derivado o fragmento activo de la misma que comprende la secuencia consenso MSCCGG (N/S) CGCG (T/S/A) (G/A/S) C (K/Q/S) C. Alternativamente, la secuencia de ácido nucleico es tal como se representa por SEQ ID NO: 3 o una parte de la misma o secuencias que pueden hibridarse con cualquiera de las secuencias mencionadas anteriormente. La secuencia de aminoácidos puede ser alternativamente una secuencia tal como se representa por SEQ ID NO: 4 u homólogos, derivados o fragmentos activos de la misma que comprende la secuencia consenso MSCCGG (N/S) CGCG (T/S/A) (G/A/S) C (K/Q/S) C.

El término “transformación” tal como se hace referencia en el presente documento engloba la transferencia de un polinucleótido exógeno a una célula huésped, independientemente del método usado para la transferencia. Puede transformarse tejido de la planta que puede dar una propagación clonal posterior, ya sea mediante organogénesis o embriogénesis, con un constructo genético de la presente invención y regenerarse a partir del mismo una planta completa. El tejido particular elegido variará dependiendo de los sistemas de propagación clonal disponibles y más idóneos para la especie particular que esté transformándose. Las dianas tisulares a modo de ejemplo incluyen discos foliares, polen, embriones, cotiledones, hipocótilos, megagametofitos, tejido calloso, tejido meristemático existente (por ejemplo, meristemo apical, yemas axilares y meristemos de raíz), y tejido de meristemo inducido (por ejemplo, meristemo de cotiledón y meristemo de hipocótilo). El polinucleótido puede introducirse de manera transitoria o estable en una célula huésped y puede mantenerse no integrado, por ejemplo, como un plásmido. Alternativamente, puede integrarse en el genoma del huésped. Entonces puede usarse la célula vegetal transformada resultante para regenerar una planta transformada de manera conocida por los expertos en la técnica.

La transformación de una especie de planta es ahora una técnica bastante rutinaria. Ventajosamente, puede usarse cualquiera de varios métodos de transformación para introducir el gen de interés en una célula ancestral adecuada. Los métodos de transformación incluyen el uso de liposomas, electroporación, productos químicos que aumentan la captación de ADN libre, inyección del ADN directamente en la planta, bombardeo con pistola de partículas, transformación usando virus o polen y microproyección. Pueden seleccionarse los métodos del método con calcio/polietilenglicol para protoplastos (Krens, F.A. *et al*., 1882, Nature 296, 72-74; Negrutiu I. *et al*., junio de 1987, Plant Mol. Biol. 8, 363-373); electroporación de protoplastos (Shillito R.D. *et al*., 1985 Bio/Technol 3, 1099-1102); microinyección en material vegetal (Crossway A. *et al*., 1986, Mol. Gen Genet 202, 179-185); bombardeo con partículas recubiertas con ADN o ARN (Klein T.M. *et al*., 1987, Nature 327, 70) infección con virus (no integradores) y similares. Se producen preferiblemente plantas de arroz transgénicas que expresan un gen que codifica para metalotioneína a través de una transformación mediada por *Agrobacterium* usando cualquiera de los métodos bien conocidos para la transformación de arroz, tal como los descritos en cualquiera de los siguientes: solicitud de patente europea EP 1198985 A1, Aldemita y Hodges (Planta, 199, 612-617, 1996); Chan *et al*. (Plant Mol. Biol. 22 (3) 491-506, 1993), Hiei *et al*. (Plant J. 6 (2) 271-282, 1994), incorporándose las descripciones como referencia al presente documento como si se expusieran totalmente. En el caso de la transformación de maíz, el método preferido es tal como se describe o bien en Ishida *et al*. (Nat. Biotechnol. junio de 1996; 14(6): 745-50) o bien en Frame *et al*. (Plant Physiol. mayo de 2002; 129(1): 13-22), incorporándose las descripciones como referencia al presente documento como si se expusieran totalmente.

Generalmente tras la transformación, se seleccionan células vegetales o agrupaciones de células por la presencia de uno o más marcadores que están codificados por genes que pueden expresarse en plantas transferidos conjuntamente con el gen de interés, tras lo cual se regenera el material transformado para dar una planta completa.

Tras la transferencia de ADN y la regeneración, pueden evaluarse plantas supuestamente transformadas, por ejemplo usando análisis de tipo Southern, para determinar la presencia del gen de interés, el número de copias y/o la organización genómica. Alternativa o adicionalmente, pueden monitorizarse los niveles de expresión del ADN recién introducido usando análisis de tipo Northern y/o Western, conociéndose bien ambas técnicas por los expertos habituales en la técnica.

Se describen en el presente documento plantas transgénicas que comprenden un ácido nucleico introducido que codifica para metalotioneína y que tienen crecimiento y desarrollo modificados tal como se definió anteriormente,

caracterizadas en que el crecimiento y desarrollo modificados son la consecuencia de la expresión modulada de un ácido nucleico que codifica para una metalotioneína. Las plantas transgénicas son además la expresión modulada seleccionada de un ácido nucleico que codifica para una metalotioneína. Preferiblemente, se seleccionan las plantas transgénicas por el aumento de expresión de un ácido nucleico introducido que codifica para metalotioneína.

Las plantas transformadas generadas pueden propagarse mediante una variedad de medios, tales como mediante técnicas de propagación clonal o de reproducción clásicas. Por ejemplo, puede autopolinizarse una planta transformada de primera generación (o T1) para proporcionar transformantes homocigotos de segunda generación (o T2), y propagarse adicionalmente las plantas T2 a través de técnicas de reproducción clásicas.

Los organismos transformados generados pueden adoptar una variedad de formas. Por ejemplo, pueden ser quimeras de células transformadas y células no transformadas; transformantes clonales (por ejemplo, para que todas las células transformadas contengan el casete de expresión); injertos de tejidos transformados y sin transformar (por ejemplo, en plantas, un portainjerto transformado injertado a una púa sin transformar).

Se describen en el presente documento células vegetales o plantas producidas mediante cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, y para todas las partes de la planta y propágulos de la misma. También se describe la progenie de una célula, tejido, órgano o planta completa primario transformado o transfectado que se ha producido mediante cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, siendo el único requisito que la progenie presente la(s) misma(s) característica(s) genotípica(s) y/o fenotípica(s) que las producidas en el progenitor mediante los métodos en el presente documento. Las células huésped que contienen una molécula de ácido nucleico aislada que codifica para una proteína que puede modular una metalotioneína, preferiblemente en las que la proteína es una metalotioneína. Células huésped preferidas son células vegetales. Se describen en el presente documento células huésped o plantas transgénicas que tienen características de crecimiento alteradas, caracterizadas porque dicha célula huésped o planta transgénica tiene la expresión modulada de una secuencia de ácido nucleico que codifica para una metalotioneína y/o actividad y/o nivel modulados de una metalotioneína. También se describen partes cosechables de una planta tales como, pero sin limitarse a, semillas, hojas, frutos, flores, cultivos de tallos, rizomas, tubérculos y bulbos.

El término “planta” tal como se usa en el presente documento engloba plantas completas, ancestros y progenie de las plantas y partes de planta, incluyendo semillas, brotes, tallos, raíces (incluyendo, tubérculos), y células, tejidos y órganos vegetales. Por tanto, el término “planta” también engloba cultivos en suspensión, embriones, regiones meristemáticas, tejido calloso, hojas, semillas, raíces, brotes, gametofitos, esporofitos, polen y microesporas. Las plantas que son particularmente útiles en los métodos de la invención incluyen algas, helechos y todas las plantas que pertenecen a la superfamilia *Viridiplantae*, en particular plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas incluyendo un forraje o leguminosas forrajeras, planta ornamental, cultivo de alimentos, árbol o arbusto seleccionados 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 gymnorrhiza, Burkea africana, Butea frondosa, Cadaba farinosa, Calliandra* spp, *Camellia sinensis, Canna indica, Capsicum* spp., *Cassia* spp., *Centroema pubescens, Chaenomeles* spp., *Cinnamomum cassia, Coffea arabica, Colophospermum mopane, Coronillia 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, Diheteropogon amplectens, Dioclea* spp, *Dolichos* spp., *Dorycnium rectum, Echinochloa pyramidalis, Ehrartia* spp., *Eleusine coracana, Eragrestis* spp., *Erythrina* spp., *Eucalyptus* spp., *Euclea schimperi, Eulalia villosa, Fagopyrum* spp., *Feijoa sellowiana, Fragaria* spp., *Flemingia* spp, *Freycinetia banksii, Geranium thunbergii, Ginkgo biloba, Glycine javanica, Gliricidia* spp, *Gossypium hirsutum, Grevillea* spp., *Guibourtia coleosperma, Hedysarum* spp., *Hemarthia altissima, Heteropogon contortus, Hordeum vulgare, Hyparrhenia rufa, Hypericum erectum, Hyperthelia dissoluta, Indigo incarnata, Iris* spp., *Leptarrhena pyrolifolia, Lespediza* spp., *Lettuca* spp., *Leucaena leucocephala, Loudetia simplex, Lotonus bainesii, Lotus* spp., *Macrotiloma axillare, Malus* spp., *Manihot esculenta, Medicago sativa, 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, Pogonarthria squarrosa, Populus* spp., *Prosopis cineraria, Pseudotsuga menziesii, Pterolobium stellatum, Pyrus communis, Quercus* spp., *Rhaphiolepsis umbellata, Rhopalostilis sapida, Rhus natalensis, Ribes grossularia, Ribes* spp., *Robinia pseudoacacia, Rosa* spp., *Rubus* spp., *Salix* spp., *Schyzachyrium sanguineum, Sciadopitys verticillata, Sequoia sempervirens, Sequoiadendron giganteum, Sorghum bicolor, Spinacia* spp., *Sporobolus fimbriatus, Stiburus alopecuroides, Stilosanthos humilis, Tadehagi* spp, *Taxodium distichum, Themeda triandra, Trifolium* spp., *Triticum* spp., *Tsuga heterophilla, Vaccinium* spp., *Vicia* spp., *Vitis vinifera, Watsonia pyramidata, Zantedeschia aetiopica, Zea mays,* amaranto, alcachofa, espárrago, brócoli, coles de Bruselas, col, canola, zanahoria, coliflor, apio, verduras de tipo berza, lino, col rizada, lentejas, colza oleaginosa, quingombó, cebolla, patata, arroz, soja, paja, remolacha azucarera, caña de azúcar, girasol, tomate, té de calabaza, árboles y algas, entre otros. Según una característica preferida de la presente invención, la planta es una planta de cultivo que comprende soja, girasol, canola, alfalfa, colza o algodón. Más preferiblemente, la planta según la presente invención es una planta monocotiledónea tal como caña de azúcar, lo más preferiblemente un cereal, tal como arroz, maíz,

trigo, mijo, cebada, avenas, sorgo. Sin embargo, se prevé que los métodos de la presente invención puedan aplicarse a una amplia variedad de plantas, puesto que el alto grado de conservación de secuencia entre los homólogos de metalotioneína eucariotas conocidos sugiere una función igualmente conservada en el metabolismo celular.

La presente invención también se refiere al uso de una proteína metalotioneína que comprende la secuencia consenso MSCCGG (N/S) CGCG (T/S/A) (G/A/S) C (K/Q/S) C o al uso de una secuencia de ácido nucleico que codifica para una metalotioneína de este tipo en el aumento del rendimiento de semillas en plantas. La secuencia de ácido nucleico es preferiblemente tal como se representa por SEQ ID NO: 1 o una parte de la misma o secuencias que pueden hibridarse con la misma o es una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2 o un homólogo, derivado o fragmento activo de la misma que comprende la secuencia consenso MSCCGG (N/S) CGCG (T/S/A) (G/A/S) C (K/Q/S) C. Preferiblemente, el aumento en el rendimiento de semillas comprende uno o más de número total de semillas, peso total de semillas y un mayor número de primeras panículas.

Se describe en el presente documento el uso de una secuencia de ácido nucleico que codifica para una metalotioneína y homólogos, derivados y fragmentos activos de la misma y el uso de la propia metalotioneína y de homólogos, derivados y fragmentos activos de la misma como regulador del crecimiento. Las secuencias de ácido nucleico descritas anteriormente en el presente documento (y partes de las mismas y secuencias que pueden hibridarse con las mismas) y las secuencias de aminoácidos descritas anteriormente en el presente documento (y homólogos, derivados y fragmentos activos de las mismas) son útiles en la modificación de las características de crecimiento de plantas, tal como se describió anteriormente en el presente documento. Por tanto las secuencias encontrarían uso como reguladores del crecimiento, para estimular o inhibir el crecimiento de plantas. Por tanto, se describe en el presente documento una composición que comprende una proteína representada por SEQ ID NO 2 o un homólogo, derivado o fragmento activo de la misma para su uso en el aumento del rendimiento y/o biomasa de plantas. Se describe en el presente documento una composición que comprende un ácido nucleico tal como se representa por SEQ ID NO 1 o una parte del mismo o una secuencia que se hibrida con el mismo para su uso en el aumento del rendimiento y/o la biomasa de plantas. También se describe una composición que comprende una proteína representada por cualquiera de las secuencias mencionadas anteriormente de aminoácidos u homólogos, derivados o fragmentos activos de las mismas para el uso como regulador del crecimiento.

A la inversa, las secuencias según la presente invención también pueden ser dianas interesantes para compuestos agroquímicos, tales como herbicidas o estimuladores del crecimiento. Por consiguiente, se describe en el presente documento el uso de las secuencias mencionadas anteriormente de ácido nucleico (o una porción de las mismas o secuencias que pueden hibridarse con las mismas) o una secuencia de aminoácidos tal como se describió anteriormente en el presente documento (u homólogos, derivados y fragmentos activos de las mismas) como dianas para un compuesto agroquímico, tal como un herbicida o un estimulador del crecimiento.

Los métodos según la presente invención dan como resultado plantas que tienen un aumento del rendimiento de semillas tal como se describió anteriormente en el presente documento. Estas características de crecimiento ventajosas también pueden combinarse con otros rasgos económicamente ventajosos, tales como rasgos de potenciación del rendimiento adicionales, tolerancia a diversos estreses, rasgos que modifican diversas características arquitectónicas y/o características bioquímicas y/o fisiológicas. Los métodos según la presente invención también pueden ponerse en práctica mediante la coexpresión de un gen que codifica para una proteína metalotioneína en una planta con al menos otro gen que actúa conjuntamente con el gen que codifica para una proteína metalotioneína.

Descripción de las figuras

La presente invención se describirá ahora con referencia a las siguientes figuras, en las que:

Figura 1: Alineación de diversas secuencias de metalotioneína de plantas (Cobbett y Goldsbrough, 2002). Se indican las cisteínas conservadas en las regiones N-terminal y C-terminal con un asterisco. Abreviaturas: At, *Arabidopsis vulgaris,* Bn, *Brassica napus,* Os, *Oryza sativa,* Ps *Pisum sativum,* Ms, *Medicago sativa,* Bo, *Brassica oleracea,* Ph, *Petunia hybrida, Sv, Silene vulgaris,* Ma, *Musa acuminata,* Ad, *Actinidia deliciosa,* Gh, *Gossipium hirsutum,* Pg, *Picea glauca,* Zm, *Zea mays,* Ta, *Triticum aestivum.*

Figura 2: Presentación esquemática del clon de entrada p33, que contiene CDS1585 dentro de los sitios AttL1 y AttL2 para la clonación Gateway® en la estructura principal de pDONR201. CDS1585 es el código interno para la secuencia codificante de la proteína de tipo metalotioneína de *Arabidopsis thaliana*, *AtMT2a*. Este vector contiene también un casete de resistencia a kanamicina bacteriano y un origen de replicación bacteriano.

Figura 3: Vector binario para la expresión en *Oryza sativa* del gen de tipo metalotioneína de *Arabidopsis thaliana*, *AtMT2a* (CDS1585) bajo el control del promotor GOS2 del arroz (PRO0129). Este vector contiene un ADN-T derivado del plásmido Ti, limitado por un borde izquierdo (repetición de LB, LB Ti C58) y un borde derecho

(repetición de RB, RB Ti C58)). Desde el borde izquierdo al borde derecho, este ADN-T contiene: un casete para la selección de antibióticos de plantas transformadas; un casete para el examen visual de plantas transformadas; el casete de expresión de terminación doble PRO0129 - CDS0406 -zeína y rbcS-deltaGA (SEQ ID NO 7) para la expresión del gen de tipo metalotioneína de *Arabidopsis thaliana*, *AtMT2a*. Este vector también contiene un origen de replicación de pBR322 para la replicación bacteriana y un marcador seleccionable (Spe/SmeR) para la selección bacteriana con espectinomicina y estreptomicina.

Figura 4: Lista de secuencias

Ejemplos

La presente invención se describirá a continuación con referencia a los siguientes ejemplos, que son a modo de ilustración solos.

Manipulación de ADN: a menos que se establezca de otro modo, se realizan técnicas de ADN recombinante según protocolos convencionales descritos en (Sambrook (2001) Molecular Cloning: a laboratory manual, 3ª edición Cold Spring Harbor Laboratory Press, CSH, Nueva York) o en los volúmenes 1 y 2 de Ausubel *et al*. (Current Protocols in Molecular Biology. Current Protocols. Se describen materiales y métodos convencionales para el trabajo molecular con plantas en Plant Molecular Biology Labfase (1993) de R.D.D. Croy, publicado por BIOS Scientific Publications Ltd (R.U.) y Blackwell Scientific Publications (R.U.).

Ejemplo 1: Clonación de CDS0851

Se amplificó la secuencia codificante de metalotioneína de *Arabidopsis, AtMT2a* (CDS1585) por PCR usando como molde una biblioteca de ADNc de plántulas de *Arabidopsis thaliana* (Invitrogen, Paisley, R.U.). Tras la transcripción inversa del ARN extraído de plántulas, se clonaron los ADNc en pCMV Sport 6.0. El tamaño de inserto promedio del banco era de 1,5 kb, y el número original de clones era de $1{,}59 \times 10^7$ ufc. Se determinó que el título original era de $9{,}6 \times 10^5$ ufc/ml, y tras una primera amplificación se convirtió en 6×10^{11} ufc/ml. Tras la extracción de plásmidos, se usaron 200 ng de molde en una mezcla para PCR de 50 µl. Se usaron los cebadores prm03240 (SEQ ID NO: 5) y prm03241 (SEQ ID NO: 6), que incluyen los sitios AttB para la recombinación Gateway, para la amplificación por PCR. Se realizó la PCR usando Hifi Taq ADN polimerasa en condiciones convencionales. Se amplificó un fragmento de PCR de 246 pb y se purificó usando también métodos convencionales. Entonces se realizó la primera etapa del procedimiento Gateway, la reacción de BP, durante la cual el fragmento de PCR se recombina *in vivo* con el plásmido pDONR201 para producir, según la terminología de Gateway, un “clon de entrada”, p33 (figura 1). Se adquirió el plásmido pDONR201 de Invitrogen, como parte de la tecnología Gateway®.

Ejemplo 2: Construcción de vectores para la transformación con el casete PRO0129-CDS1585

Posteriormente se usó el clon de entrada p33 en una reacción de LR con p0640, un vector de destino usado para la transformación en *Oryza sativa*. Este vector contiene como elementos funcionales dentro de los bordes del ADN-T: un marcador seleccionable de plantas; un casete de expresión de marcador examinable; y un casete Gateway destinado para recombinación *in vivo* mediante LR con la secuencia de interés ya clonada en el clon de entrada. Un promotor GOS2 del arroz para expresión constitutiva (PRO0129) está ubicado en el sentido de 5’ de este casete Gateway.

Tras la etapa de recombinación mediante LR, puede transformarse el vector de expresión resultante p34 (figura 2) puede transformarse en *Agrobacterium* cepa LBA4404 y posteriormente en plantas de *Oryza sativa*.

Ejemplo 3: Transformación de arroz con PRO0129-CDS1585

Se descascarillaron semillas secas maduras de *Oryza sativa* cultivar japónica, Nipponbare. Se realizó la esterilización incubando las semillas durante un minuto en etanol al 70%, seguido por 30 minutos en $HgCl_2$ al 0,2% y mediante 6 lavados de 15 minutos con agua destilada estéril. Entonces se germinaron las semillas estériles en un medio que contenía 2,4-D (medio de inducción de callo). Tras una incubación durante 4 semanas en la oscuridad, se cortaron los callos derivados del escutelo, embriogénicos y se propagaron en el mismo medio. Dos semanas después se multiplicaron o propagaron los callos mediante subcultivo en el mismo medio durante otras dos semanas. 3 días antes del cocultivo, se subcultivaron trozos de callo embriogénico en medio nuevo para reforzar la actividad de división celular. Se usó *Agrobacterium* cepa LBA4404 que alberga el vector binario p3076 para el cocultivo. Se cultivó la cepa de *Agrobacterium* durante 3 días a 28ºC en medio AB con los antibióticos apropiados. Entonces se recogieron las bacterias y se suspendieron en medio de cocultivo líquido a una DO_{600} de aproximadamente 1. Se transfirió la suspensión a una placa Petri y se sumergieron los callos en la suspensión durante 15 minutos. A continuación, se secaron los tejidos callosos sobre un papel de filtro, se transfirieron a medio de cocultivo solidificado y se incubaron durante 3 días en la oscuridad a 25ºC. Después de eso, se hizo crecer el callo cocultivado en medio que contenía 2,4-D durante 4 semanas en la oscuridad a 28ºC en presencia de un agente

selectivo a una concentración adecuada. Durante este periodo, se desarrollaron islas callosas resistentes de crecimiento rápido. Tras la transferencia de este material a un medio de regeneración e incubación con luz, se liberó el potencial embriogénico y se desarrollaron brotes en las siguientes cuatro a cinco semanas. Se cortaron los brotes del callo y se incubaron durante de 2 a 3 semanas en un medio que contenía auxina desde el que se transfirieron al suelo. Se hicieron crecer los brotes endurecidos con alta humedad y pocos días en un invernadero. Finalmente, se cosecharon las semillas de tres a cinco meses tras el trasplante. El método produjo transformantes de un solo locus a una tasa de más del 50% (Aldemita y Hodges, 1996; Chan *et al*., 1993; Hiei *et al*., 1994).

Ejemplo 4: Evaluación de arroz transgénico transformado con PRO0129-CDS1585

Se generaron aproximadamente de 15 a 20 transformantes T0 independientes. Se transfirieron los transformantes primarios desde cámaras de cultivo tisular a un invernadero para el crecimiento y la cosecha de las semillas T1. Se conservaron siete acontecimientos a partir de los cuales la progenie T1 se segregó 3:1 para determinar la presencia/ausencia del transgén. Para cada uno de estos acontecimientos, se seleccionaron 10 plántulas T1 que contenían el transgén (hetero y homocigotas), y 10 plántulas T1 que carecían del transgén (nulicigotas), mediante examen de marcadores visuales. Se transfirieron las plantas T1 seleccionadas a un invernadero. Cada planta recibió una etiqueta de código de barras única para relacionar inequívocamente los datos de fenotipado con la planta correspondiente. Se hicieron crecer las plantas T1 seleccionadas en el suelo en macetas de 10 cm de diámetro con los siguientes ajustes ambientales: fotoperiodo = 11,5 h, intensidad de luz diurna = 30.000 lux o más, temperatura durante el día = 28ºC o mayor, temperatura durante la noche = 22ºC, humedad relativa = 60-70%. Se hicieron crecer plantas transgénicas y las nulicigotas correspondientes unas al lado de otras en posiciones aleatorias. Desde la etapa de siembra hasta la etapa de madurez, se hicieron pasar las plantas varias veces a través de un recinto de obtención de imágenes digitales. En cada punto de tiempo, se tomaron imágenes digitales (2048x1536 píxeles, 16 millones de colores) de cada planta desde al menos 6 ángulos diferentes. Se cosecharon las primeras panículas maduras, se embolsaron, se etiquetaron con código de barras y se secaron entonces durante tres días en el horno a 37ºC. Se trillaron entonces las panículas y se recogieron todas las semillas. Se separaron las cáscaras llenas de las vacías usando un dispositivo de soplado de aire. Tras la separación, se contaron entonces ambos lotes de semillas usando una máquina contadora disponible comercialmente. Se desecharon las cáscaras vacías. Se pesaron las cáscaras llenas en una balanza analítica y se midió el área de la sección transversal de las semillas usando obtención de imágenes digitales. Este procedimiento dio como resultado el conjunto de parámetros relacionados con las semillas descrito anteriormente.

Estos parámetros se derivaron de forma automatizada a partir de las imágenes digitales usando software de análisis de imágenes y se analizaron estadísticamente. Se usó ANOVA (análisis de la varianza) de dos factores corregidos para el diseño desequilibrado como modelo estadístico para la evaluación global de las características fenotípicas de las plantas. Se llevó a cabo una prueba F con todos los parámetros medidos de todas las plantas de todos los acontecimientos transformados con ese gen. Se llevó a cabo la prueba F para comprobar un efecto del gen sobre todos los acontecimientos de transformación y para verificar un efecto global del gen, también denominado en el presente documento “efecto génico global”. Si el valor de la prueba F muestra que los datos son significativos, entonces se concluye que existe un efecto “génico”, lo que significa que no sólo la presencia o la posición del gen está provocando el efecto. El umbral para la significación para un efecto génico global se fija en el nivel de probabilidad del 5% para la prueba F.

Para comprobar un efecto de los genes dentro de un acontecimiento, es decir, para un efecto específico de línea, se realizó una prueba de la t dentro de cada acontecimiento usando conjuntos de datos de las plantas transgénicas y las plantas nulas correspondientes. “Plantas nulas” o “segregantes nulos” o “nulicigotas” son las plantas tratadas de la misma manera que la planta transgénica, pero de las que se ha segregado el transgén. Las plantas nulas también pueden describirse como las plantas transformadas negativas homocigotas. El umbral para la significación para la prueba de la t se fija en el nivel de probabilidad del 10%. Los resultados para algunos acontecimientos pueden estar por encima o por debajo de este umbral. Esto se basa en la hipótesis de que un gen podría tener sólo un efecto en determinadas posiciones en el genoma, y que la aparición de este efecto dependiente de la posición no es poco común. Esta clase de efecto génico también se denomina en el presente documento “un efecto de línea del gen”. Se obtiene el valor de p comparando el valor de t para la distribución de t o alternativamente, comparando el valor de F para la distribución de F. El valor de p proporciona entonces la probabilidad de que la hipótesis nula (es decir, que no existe ningún efecto del transgén) sea correcta.

Se midieron el crecimiento vegetativo y el rendimiento de semillas según los métodos descritos anteriormente. Los inventores hallaron sorprendentemente que el número total de semillas y el peso total de semillas y el número de primeras panículas aumentaron en las plantas de arroz transformadas con el gen de metalotioneína en comparación con las plantas control sin el gen *AtMT2a*.

Se confirmaron los datos obtenidos en el primer experimento en un segundo experimento con plantas T2. Se seleccionaron tres líneas que tenían el patrón de expresión correcto para su análisis adicional. Se examinaron lotes de semillas de las plantas positivas (tanto hetero como homocigotas) en T1, monitorizando la expresión de marcadores. Para cada acontecimiento seleccionado, se conservaron entonces los lotes de semillas heterocigotas

para la evaluación de T2. Dentro de cada lote de semillas, se hizo crecer un número igual de plantas positivas y negativas en el invernadero para su evaluación.

Se evaluó un número total de 120 plantas *Mt2a* transformadas, en la generación T2, es decir 40 plantas por acontecimiento de las que 20 eran positivas para el transgén, y 20 negativas.

Puesto que se habían llevado a cabo dos experimentos con acontecimientos solapantes, se realizó un análisis combinado además del análisis descrito anteriormente. Esto es útil para comprobar la sistematicidad de los efectos a lo largo de los dos experimentos, y si éste es el caso, acumular pruebas de ambos experimentos con el fin de aumentar la confianza de la conclusión. El método usado fue un enfoque de modelo mixto que tenía en cuenta la estructura en múltiples niveles de los datos (es decir, experimento – acontecimiento – segregantes). Se obtuvieron los valores de P comparando la prueba de razones de probabilidad con distribuciones chi cuadrado.

Ejemplo 5: Resultados de la evaluación de plantas transgénicas transformadas con PRO0129-CDS1585

Tras el análisis de las semillas tal como se describió anteriormente, los inventores hallaron que las plantas transformadas con el constructo génico de Mt2a tenían un mayor número total de primeras panículas, un mayor número total de semillas y un mayor peso total de semillas en comparación con plantas que carecían del transgén Mt2a. Los resultados positivos obtenidos para plantas en la generación T1 se obtuvieron de nuevo en la generación T2. No sólo las líneas transgénicas individuales puntuaron significativamente mejor que las líneas de control nulicigotas correspondientes, sino que también hubo un efecto global positivo significativo cuando se evaluaron todas las plantas de todos los acontecimientos T2 sometidos a prueba, lo que indica con fuerza un efecto génico global. Se facilita en la tabla 2 una visión general de los datos.

Tabla 2

	Plantas T1		Plantas T2		Análisis combinado
parámetro	% de diferencia	valor de p	% de diferencia	valor de p	valor de p
Número total de semillas	14	0,0404	16	0,0184	0,0003
Peso total de semillas	9	0,2092	24	0,0091	0,0017
Número de primeras panículas	16	0,0958	13	0,0907	0,0002

El % de aumento presenta el aumento promedio para todos los acontecimientos sometidos a prueba. Los valores de p para las plantas T1 y T2 representa el valor de p derivado de la prueba F y los valores de p para el análisis combinado se obtuvieron comparando la prueba de razones de probabilidad con distribuciones chi cuadrado.

Número total de semillas

Se midió el número total de semillas mediante recuento del número de cáscaras cosechadas de una planta. Las líneas T1 transgénicas mostraron un aumento global en el número total de semillas del 14%, siendo el aumento significativo. Este aumento se confirmó en experimentos con plantas T2, en los que se midió un aumento significativo del 16%. El análisis combinado de las plantas T1 y T2 mostró un efecto génico global (valor de p de 0,0003).

Rendimiento total de semillas

Se midió el rendimiento total de semillas (peso total de semillas) por planta pesando todas las cáscaras llenas cosechadas de una planta. En promedio, el aumento en el rendimiento de semillas para las plantas T1 fue del 9%. Estos resultados también se observaron en la generación T2. Las 3 líneas sometidas a prueba tuvieron un aumento del rendimiento promedio del 24%. Este aumento medio fue estadísticamente significativo (valor de p de 0,0091) y el análisis combinado de las plantas T1 y T2 mostró que hubo un efecto génico global (valor de p de 0,0017).

Número de primeras panículas

La panícula más alta y todas las panículas que se solaparon con la panícula más alta cuando se alinearon en vertical se consideraron como primeras panículas, y se contaron manualmente. Hubo un efecto global del transgén sobre el número de panículas: el aumento para las plantas T1 fue del 16% y del 13% para las plantas T2. Estos aumentos fueron significativos tal como se evidenció por los valores de p (respectivamente, 0,0958 y 0,0907). El análisis combinado demostró un efecto génico global (valor de p de 0,0002).

Se observó una variación entre los diferentes acontecimientos de transformación (diferentes acontecimientos de plantas cada uno transformado con el gen AtMT2a). Los expertos en la técnica saben bien que la expresión de transgenes en plantas, y así también el efecto fenotípico debido a la expresión de tal transgén, puede diferir entre diferentes líneas transgénicas obtenidas independientemente y la progenie de las mismas. Los transgenes presentes en diferentes plantas transgénicas obtenidas independientemente difieren unos de otros en el locus de inserción cromosómica así como en el número de copias del transgén insertadas en ese locus y la configuración de esas copias del transgén en ese locus. Diferencias en los niveles de expresión pueden atribuirse a la influencia desde el contexto cromosómico del transgén (el denominado efecto de posición) o de mecanismos de silenciamiento desencadenados por determinadas configuraciones de transgén (por ejemplo, las inserciones en tándem orientadas hacia el interior de transgenes son propicias para el silenciamiento a nivel transcripcional o postranscripcional). A pesar de esta variabilidad, los análisis de las plantas T1 y T2 y el análisis combinado muestran que los aumentos observados en el rendimiento estaban provocados por un verdadero efecto génico global.

Ejemplo 6: Modificación del rendimiento de granos en Zea mays:

La invención descrita en el presente documento también puede usarse en maíz. Con este objetivo, se clona el gen *Mt2a*, o el ortólogo de maíz del mismo bajo el control de un promotor adecuado como el promotor GOS2 del arroz u otro promotor constitutivo en un vector de transformación de plantas adecuado para la transformación de maíz mediada por *Agrobacterium*. Tales vectores y métodos para la transformación de maíz se han descrito en la bibliografía (documentos EP0604662, EP0672752, EP0971578, EP0955371, EP0558676, Ishida *et al*. 1996; Frame *et al*., 2002). Las plantas transgénicas producidas mediante estos métodos se hacen crecer en el invernadero para la producción de semillas T1. Se comprueba la heredabilidad mediante el análisis de segregación en la progenie. Se comprueba el número de copias del transgén mediante análisis de PCR cuantitativa en tiempo real y/o de transferencia de tipo Southern. Se determinan los niveles de expresión del transgén mediante análisis de PCR inversa y/o de tipo Northern. Se seleccionan líneas transgénicas con inserciones de una sola copia del transgén y con niveles variables de expresión del transgén para la producción de semillas T2 a través de autopolinización o cruzamiento para un germoplasma diferente. Se germinan semillas de la progenie y se hacen crecer en el campo o en el invernadero en condiciones bien adaptadas para el maíz (fotoperiodo de 16:8 h, temperatura durante el día de 26-28ºC y durante la noche de 22-24ºC) así como en condiciones deficientes en agua, deficientes en nitrógeno y NaCl en exceso. En el caso de la autopolinización, se usan como controles segregantes nulos de la misma línea parental, así como plantas de tipo natural del mismo cultivar. En el caso de cruzamiento, se cruzan plantas transgénicas, segregantes nulos y plantas de tipo natural del mismo cultivar con una planta parental elegida y se comparan plantas F1 del cruzamiento transgénico con plantas F1 de los cruzamientos con segregante nulo y de tipo natural. Se evalúan las plantas de la progenie que resultan de la autopolinización o los cruzamientos con diferentes parámetros de crecimiento y biomasa, incluyendo la altura de la planta, el grosor del tallo, el número de hojas, el área sobre el terreno total, el verdor de las hojas, el tiempo hasta la maduración, el tiempo de floración, el número de mazorcas, el tiempo de cosecha. También se comprueban las semillas de estas líneas con diversos parámetros, tales como el tamaño de grano, el rendimiento total de granos por planta y la calidad del grano (contenido en almidón, contenido en proteína y contenido en aceite). Se seleccionan las líneas que mejoran de la manera más significativa frente a los controles para cualquiera de los parámetros mencionados anteriormente, para pruebas en el campo adicionales y reproducción asistida por marcadores, con el objetivo de transferir los rasgos transgénicos validados en el campo a germoplasma comercial. Están bien establecidos en la técnica métodos para someter a prueba maíz para determinar parámetros relacionados con el crecimiento y el rendimiento en el campo, como lo son las técnicas para la introgresión de loci específicos (tales como loci que contienen transgenes) de un germoplasma a otro.

Lista de secuencias

<110> CropDesign N.V.

<120> Plantas que tienen características de crecimiento modificadas y método para producir las mismas

<130> CD-089-PCT

<150> Documento EP 03076086.2

<151> 14-04-2003

<160> 7

<170> PatentIn versión 3.2

<210> 1

<211> 336

<212> ADN

<213> *Arabidopsis thaliana*

<220>

<221> misc_feature

<223> secuencia de ADN de MT2a

<400> 1

```
ttttcattca taaatttttc ttcaatttga attttctcga gaaaaatgtc ttgctgtgga     60
ggaaactgcg gatgtggatc tggctgcaag tgcggcaacg gttgtggagg ttgcaaaatg    120
taccctgact tgggattctc cggcgagaca accacaactg agacttttgt cttgggcgtt    180
gcaccggcga tgaagaatca gtacgaggct tcaggggaga gtaacaacgc tgagaacgat    240
gcttgcaagt gtggatctga ctgcaagtgt gatccttgca cctgcaagtg aagaagcctt    300
tttaaataag cagagataat cgagtctctt taatta                 .            336
```

<210> 2

<211> 81

<212> PRT

<213> *Arabidopsis thaliana*

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> secuencia de la proteína MT2a

<400> 2

```
Met Ser Cys Cys Gly Gly Asn Cys Gly Cys Gly Ser Gly Cys Lys Cys
1               5                   10                  15

Gly Asn Gly Cys Gly Gly Cys Lys Met Tyr Pro Asp Leu Gly Phe Ser
            20                  25                  30

Gly Glu Thr Thr Thr Thr Glu Thr Phe Val Leu Gly Val Ala Pro Ala
        35                  40                  45

Met Lys Asn Gln Tyr Glu Ala Ser Gly Glu Ser Asn Asn Ala Glu Asn
    50                  55                  60

Asp Ala Cys Lys Cys Gly Ser Asp Cys Lys Cys Asp Pro Cys Thr Cys
65                  70                  75                  80

Lys
```

<210> 3

<211> 545

<212> ADN

<213> *Arabidopsis thaliana*

<220>

<221> misc_feature

<223> secuencia de ADN de MT1

<220>

<221> misc_feature

<222> (331)..(331)

<223> n es a, c, g o t

<400> 3

```
cattcataaa tttttcttca atttgaattt tctcgagaaa aatgtcttgc tgtggaggaa     60
actgcggatg tggatctggc tgcaagtgcg gcaacggttg tggaggttgc aaaatgtacc    120
ctgacttggg attctccggc gagacaacca caactgagac ttttgtcttg ggcgttgcac    180
cggcgatgaa gaatcagtac gaggcttcag gggagagtaa caacgctgag agcgatgctt    240
gcaagtgtgg atctgactgc aagtgtgatc cttgcacctg caagtgaaga agccttttta    300
aataagcaga gataatcgag tctctttaat ntaattaagt tattcaataa gtaaaccata    360
tataggatgg tgtttttagg tttggtttat gtgtaataat ggcttcagct tatcttttag    420
ccgatcattg tcttttgtgt ttgttttgat catatctttt agatgtctag caaatctgcc    480
atgtgatgag tttgtacttc cagtggaatg ataataatat tatagtttta aatcaaaaaa    540
aaaaa                                                                545
```

<210> 4

<211> 81

<212> PRT

<213> *Arabidopsis thaliana*

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> secuencia de la proteína MT1

<400> 4

Met Ser Cys Cys Gly Gly Asn Cys Gly Cys Gly Ser Gly Cys Lys Cys
1 5 10 15

Gly Asn Gly Cys Gly Gly Cys Lys Met Tyr Pro Asp Leu Gly Phe Ser
20 25 30

Gly Glu Thr Thr Thr Thr Glu Thr Phe Val Leu Gly Val Ala Pro Ala
35 40 45

Met Lys Asn Gln Tyr Glu Ala Ser Gly Glu Ser Asn Asn Ala Glu Ser
50 55 60

Asp Ala Cys Lys Cys Gly Ser Asp Cys Lys Cys Asp Pro Cys Thr Cys
65 70 75 80

Lys

<210> 5

<211> 53

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador prm03240

<400> 5

ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt cacaatgtct tgctgtggag gaa 53

<210> 6

<211> 47

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador prm03241

<400> 6

ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtt tcacttgcag gtgcaag 47

<210> 7

<211> 3032

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> casete de expresión para MT2a

<400> 7

```
aatccgaaaa gtttctgcac cgttttcacc ccctaactaa caatataggg aacgtgtgct     60
aaatataaaa tgagacctta tatatgtagc gctgataact agaactatgc aagaaaaact    120
catccaccta ctttagtggc aatcgggcta aataaaaaag agtcgctaca ctagtttcgt    180
tttccttagt aattaagtgg gaaaatgaaa tcattattgc ttagaatata cgttcacatc    240
tctgtcatga agttaaatta ttcgaggtag ccataattgt catcaaactc ttcttgaata    300
aaaaaatctt tctagctgaa ctcaatgggt aaagagagag atttttttta aaaaaataga    360
atgaagatat tctgaacgta ttggcaaaga tttaaacata taattatata attttatagt    420
ttgtgcattc gtcatatcgc acatcattaa ggacatgtct tactccatcc caatttttat    480
ttagtaatta aagacaattg acttattttt attatttatc ttttttcgat tagatgcaag    540
gtacttacgc acacactttg tgctcatgtg catgtgtgag tgcacctcct caatacacgt    600
tcaactagca acacatctct aatatcactc gcctatttaa tacatttagg tagcaatatc    660
tgaattcaag cactccacca tcaccagacc acttttaata atatctaaaa tacaaaaaat    720
aattttacag aatagcatga aaagtatgaa acgaactatt taggtttttc acatacaaaa    780
aaaaaaagaa ttttgctcgt gcgcgagcgc caatctccca tattgggcac acaggcaaca    840
acagagtggc tgcccacaga acaacccaca aaaaacgatg atctaacgga ggacagcaag    900
tccgcaacaa ccttttaaca gcaggctttg cggccaggag agaggaggag aggcaaagaa    960
aaccaagcat cctcctcctc ccatctataa attcctcccc ccttttcccc tctctatata   1020
ggaggcatcc aagccaagaa gagggagagc accaaggaca cgcgactagc agaagccgag   1080
cgaccgcctt cttcgatcca tatcttccgg tcgagttctt ggtcgatctc ttccctcctc   1140
cacctcctcc tcacagggta tgtgcccttc ggttgttctt ggatttattg ttctaggttg   1200
tgtagtacgg gcgttgatgt taggaaaggg gatctgtatc tgtgatgatt cctgttcttg   1260
gatttgggat agaggggttc ttgatgttgc atgttatcgg ttcggtttga ttagtagtat   1320
ggttttcaat cgtctggaga gctctatgga aatgaaatgg tttagggtac ggaatcttgc   1380
gattttgtga gtacctttttg tttgaggtaa aatcagagca ccggtgattt tgcttggtgt   1440
aataaaagta cggttgtttg gtcctcgatt ctggtagtga tgcttctcga tttgacgaag   1500
ctatcctttg tttattccct attgaacaaa aataatccaa ctttgaagac ggtcccgttg   1560
atgagattga atgattgatt cttaagcctg tccaaaattt cgcagctggc ttgtttagat   1620
acagtagtcc ccatcacgaa attcatggaa acagttataa tcctcaggaa caggggattc   1680
cctgttcttc cgatttgctt tagtcccaga attttttttc ccaaatatct taaaaagtca   1740
ctttctggtt cagttcaatg aattgattgc tacaaataat gcttttatag cgttatccta   1800
gctgtagttc agttaatagg taataccccct atagtttagt caggagaaga acttatccga   1860
tttctgatct ccatttttaa ttatatgaaa tgaactgtag cataagcagt attcatttgg   1920
attatttttt ttattagctc tcacccccttc attattctga gctgaaagtc tggcatgaac   1980
tgtcctcaat tttgttttca aattcacatc gattatctat gcattatcct cttgtatcta   2040
cctgtagaag tttctttttg gttattcctt gactgcttga ttacagaaag aaatttatga   2100
agctgtaatc gggatagtta tactgcttgt tcttatgatt catttccttt gtgcagttct   2160
tggtgtagct tgccactttc accagcaaag ttcatttaaa tcaactaggg atatcacaag   2220
tttgtacaaa aaagcaggct tcacaatgtc ttgctgtgga ggaaactgcg gatgtggatc   2280
tggctgcaag tgcggcaacg gttgtggagg ttgcaaaatg taccctgact tgggattctc   2340
cggcgagaca accacaactg agacttttgt cttgggcgtt gcaccggcga tgaagaatca   2400
gtacgaggct tcaggggaga gtaacaacgc tgagaacgat gcttgcaagt gtggatctga   2460
ctgcaagtgt gatccttgca cctgcaagtg aaacccagct ttcttgtaca aagtggtgat   2520
atcacaagcc cgggcggtct tctagggata acagggtaat tatatccctc tagatcacaa   2580
gcccgggcgg tcttctacga tgattgagta ataatgtgtc acgcatcacc atgggtggca   2640
gtgtcagtgt gagcaatgac ctgaatgaac aattgaaatg aaaagaaaaa aagtactcca   2700
tctgttccaa attaaaattc attttaacct tttaataggt ttatacaata attgatatat   2760
gttttctgta tatgtctaat ttgttatcat ccgggcggtc ttctagggat aacagggtaa   2820
ttatatccct ctagacaaca cacaacaaat aagagaaaaa acaaataata ttaatttgag   2880
aatgaacaaa aggaccatat cattcattaa ctcttctcca tccatttcca tttcacagtt   2940
cgatagcgaa aaccgaataa aaaacacagt aaattacaag cacaacaaat ggtacaagaa   3000
aaacagtttt cccaatgcca taatactcga ac                                 3032
```

REIVINDICACIONES

1. Método para aumentar el rendimiento de semillas en comparación con plantas de tipo natural correspondientes, que comprende introducir y sobreexpresar en una planta un ácido nucleico aislado que codifica para una metalotioneína que comprende la secuencia consenso MSC-CGG(N/S)CGCG(T/S/A)(G/A/S)C(K/Q/S)C.

2. Método según la reivindicación 1, en el que dicho aumento del rendimiento de semillas comprende el aumento del número total de semillas y/o el aumento del peso total de semillas, en comparación con plantas de tipo natural correspondientes.

3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que la expresión de dicho ácido nucleico que codifica para una proteína metalotioneína está dirigida por un promotor constitutivo, preferiblemente el promotor GOS2 del arroz.

4. Método para la producción de una planta transgénica que tiene un aumento del rendimiento de semillas según la reivindicación 1, comprendiendo el método:

(i) introducir en una planta o célula vegetal una secuencia de ácido nucleico según la reivindicación 1;

(ii) regenerar y/o hacer crecer una planta a partir de una célula de planta transgénica.

5. Uso de una secuencia de ácido nucleico que codifica para una metalotioneína según la reivindicación 1, en el aumento del rendimiento de semillas en plantas.

6. Uso de una proteína metalotioneína según la reivindicación 1, en el aumento del rendimiento de semillas en plantas.

7. Uso según la reivindicación 5 ó 6, en el que dicho aumento del rendimiento de semillas comprende el aumento del número total de semillas y/o el aumento del peso total de semillas, en comparación con plantas de tipo natural correspondientes.

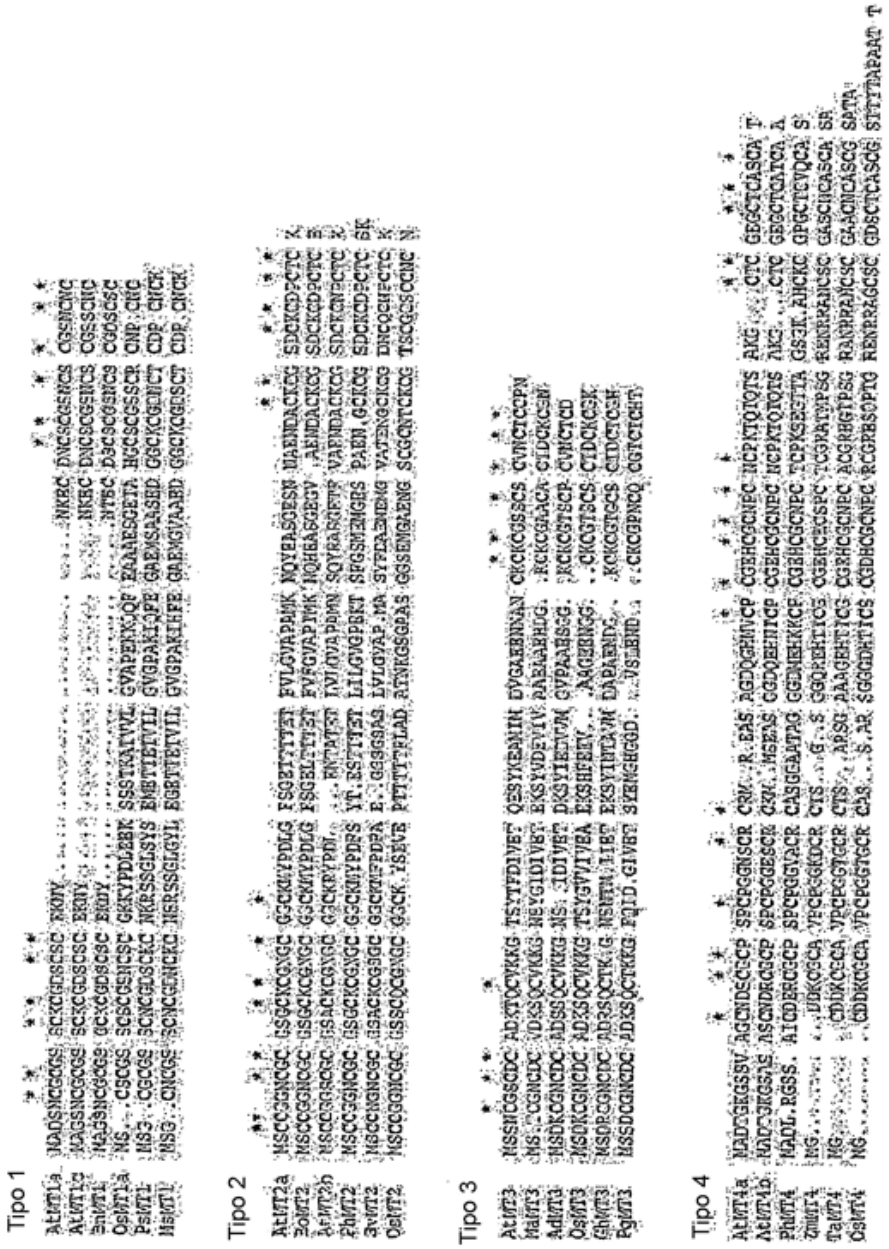

FIGURA 1

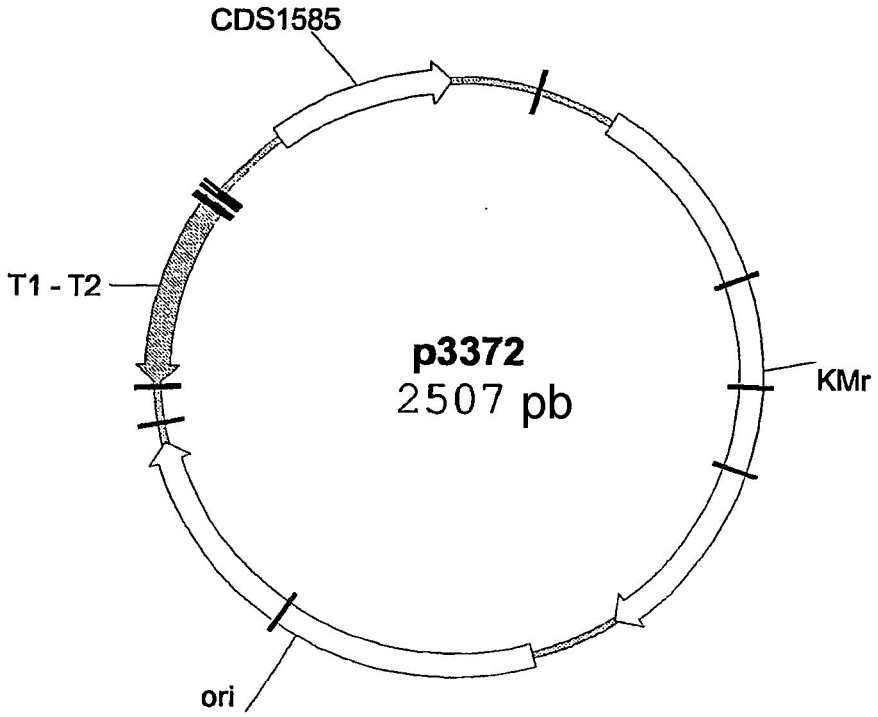

FIGURA 2

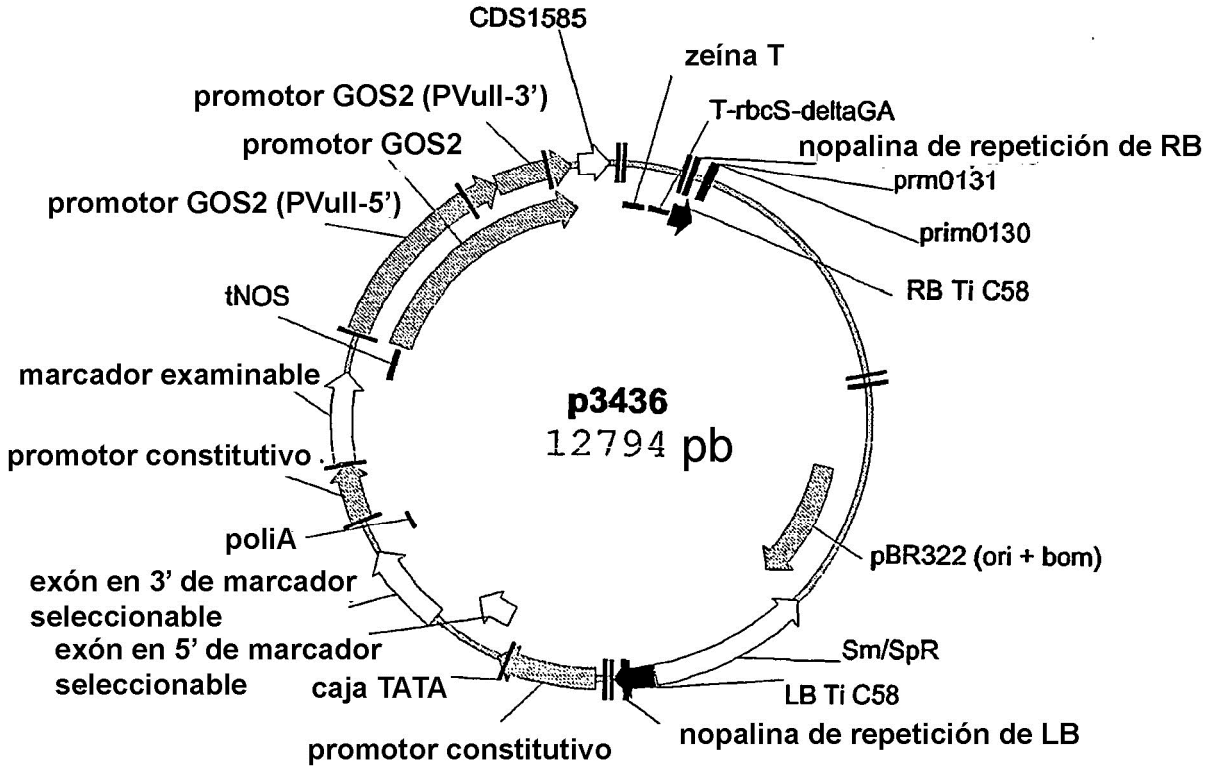

FIGURA 3

SEQ ID NO 1: Secuencia codificante de AtMT2a (CDS1585) (inicio y terminación en negrita)

ttttcattcataaatttttcttcaatttgaattttctcgagaaaa**atg**tcttgctgtggagg
aaactgcggatgtggatctggctgcaagtgcggcaacggttgtggaggttgcaaaatgtacc
ctgacttgggattctccggcgagacaaccacaactgagacttttgtcttgggcgttgcaccg
gcgatgaagaatcagtacgaggcttcaggggagagtaacaacgctgagaacgatgcttgcaa
gtgtggatctgactgcaagtgtgatccttgcacctgcaag**tga**agaagccttttaaataag
cagagataatcgagtctctttaatta

SEQ ID NO 2: Secuencia de proteína deducida de AtMT2a (CDS1585)

MSCCGGNCGCGSGCKCGNGCGGCKMYPDLGFSGETTTTETFVLGVAPAMKNQYEASGESNNA
ENDACKCGSDCKCDPCTCK

SEQ ID NO 3: ADNc de AtMT-1 de *A. thaliana*, codón de inicio y terminación en negrita)

cattcataaatttttcttcaatttgaattttctcgagaaaa**atg**tcttgctgtggaggaaac
tgcggatgtggatctggctgcaagtgcggcaacggttgtggaggttgcaaaatgtaccctga
cttgggattctccggcgagacaaccacaactgagacttttgtcttgggcgttgcaccggcga
tgaagaatcagtacgaggcttcaggggagagtaacaacgctgagagcgatgcttgcaagtgt
ggatctgactgcaagtgtgatccttgcacctgcaag**tga**agaagccttttaaataagcaga
gataatcgagtctctttaatntaattaagttattcaataagtaaaccatatataggatggtg
tttttaggtttggtttatgtgtaataatggcttcagcttatcttttagccgatcattgtctt
ttgtgtttgttttgatcatatcttttagatgtctagcaaatctgccatgtgatgagtttgta
cttccagtggaatgataataatattatagttttaaatcaaaaaaaaaaa

SEQ ID NO 4: Secuencia de proteína deducida de AtMT-1 de *A. thaliana*

MSCCGGNCGCGSGCKCGNGCGGCKMYPDLGFSGETTTTETFVLGVAPAMKNQYEASGESNNA
ESDACKCGSDCKCDPCTCK

SEQ ID NO 5: prm03240

GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCACAATGTCTTGCTGTGGAGGAA

SEQ ID NO 6: prm03241

GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCACTTGCAGGTGCAAG

SEQ ID NO 7: Casete de expresión para MT2a

aatccgaaaagtttctgcaccgttttcacccctaactaacaatatagggaacgtgtgctaa
atataaaatgagaccttatatatgtagcgctgataactagaactatgcaagaaaaactcatc
cacctactttagtggcaatcgggctaaataaaaaagagtcgctacactagtttcgttttcct

FIGURA 4

tagtaattaagtgggaaaatgaaatcattattgcttagaatatacgttcacatctctgtcat
gaagttaaattattcgaggtagccataattgtcatcaaactcttcttgaataaaaaaatctt
tctagctgaactcaatgggtaaagagagagatttttttaaaaaaatagaatgaagatattc
tgaacgtattggcaaagatttaaacatataattatataattttatagtttgtgcattcgtca
tatcgcacatcattaaggacatgtcttactccatcccaatttttatttagtaattaaagaca
attgacttatttttattatttatctttttcgattagatgcaaggtacttacgcacacactt
tgtgctcatgtgcatgtgtgagtgcacctcctcaatacacgttcaactagcaacacatctct
aatatcactcgcctatttaatacatttaggtagcaatatctgaattcaagcactccaccatc
accagaccacttttaataatatctaaaatacaaaaaataattttacagaatagcatgaaaag
tatgaaacgaactatttaggtttttcacatacaaaaaaaaaaagaattttgctcgtgcgcga
gcgccaatctcccatattgggcacacaggcaacaacagagtggctgcccacagaacaaccca
caaaaaacgatgatctaacggaggacagcaagtccgcaacaacctttttaacagcaggctttg
cggccaggagagaggaggagaggcaaagaaaaccaagcatcctcctcctcccatctataaat
tcctcccccctttcccctctctatataggaggcatccaagccaagaagagggagagcacca
aggacacgcgactagcagaagccgagcgaccgccttcttcgatccatatcttccggtcgagt
tcttggtcgatctcttccctcctccacctcctcctcacagggtatgtgcccttcggttgttc
ttggatttattgttctaggttgtgtagtacgggcgttgatgttaggaaaggggatctgtatc
tgtgatgattcctgttcttggatttgggatagaggggttcttgatgttgcatgttatcggtt
cggtttgattagtagtatggttttcaatcgtctggagagctctatggaaatgaaatggttta
gggtacggaatcttgcgattttgtgagtacctttttgtttgaggtaaaatcagagcaccggtg
attttgcttggtgtaataaaagtacggttgtttggtcctcgattctggtagtgatgcttctc
gatttgacgaagctatcctttgtttattccctattgaacaaaaataatccaactttgaagac
ggtcccgttgatgagattgaatgattgattcttaagcctgtccaaaatttcgcagctggctt
gtttagatacagtagtccccatcacgaaattcatggaaacagttataatcctcaggaacagg
ggattccctgttcttccgatttgctttagtcccagaatttttttcccaaatatcttaaaaa
gtcactttctggttcagttcaatgaattgattgctacaaataatgcttttatagcgttatcc
tagctgtagttcagttaataggtaatacccctatagtttagtcaggagaagaacttatccga
tttctgatctccatttttaattatatgaaatgaactgtagcataagcagtattcatttggat
tatttttttattagctctcacccccttcattattctgagctgaaagtctggcatgaactgtc
ctcaattttgttttcaaattcacatcgattatctatgcattatcctcttgtatctacctgta
gaagtttctttttggttattccttgactgcttgattacagaaagaaatttatgaagctgtaa
tcgggatagttatactgcttgttcttatgattcatttcctttgtgcagttcttggtgtagct
tgccactttcaccagcaaagttcatttaaatcaactagggatatcacaagtttgtacaaaaa
agcaggcttcacaatgtcttgctgtggaggaaactgcggatgtggatctggctgcaagtgcg
gcaacggttgtggaggttgcaaaatgtaccctgacttgggattctccggcgagacaaccaca
actgagacttttgtcttgggcgttgcaccggcgatgaagaatcagtacgaggcttcagggga
gagtaacaacgctgagaacgatgcttgcaagtgtggatctgactgcaagtgtgatccttgca
cctgcaagtgaaacccagctttcttgtacaaagtggtgatatcacaagcccgggcggtcttc
tagggataacagggtaattatatccctctagatcacaagcccgggcggtcttctacgatgat
tgagtaataatgtgtcacgcatcaccatgggtggcagtgtcagtgtgagcaatgacctgaat
gaacaattgaaatgaaaagaaaaaaagtactccatctgttccaaattaaaattcattttaac
cttttaataggtttatacaataattgatatatgttttctgtatatgtctaatttgttatcat
ccgggcggtcttctagggataacagggtaattatatccctctagacaacacacaacaaataa
gagaaaaaacaaataatattaatttgagaatgaacaaaaggaccatatcattcattaactct
tctccatccatttccatttcacagttcgatagcgaaaaccgaataaaaaacacagtaaatta
caagcacaacaaatggtacaagaaaaacagttttcccaatgccataatactcgaac

FIGURA 4 (continuación)