

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 272**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

C07K 14/415 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.12.2008 E 08860815 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.10.2014 EP 2231861**

54 Título: **Plantas transgénicas modificadas para el transporte de cadmio reducido, productos derivados y métodos relacionados**

30 Prioridad:

13.12.2007 US 996982 P

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

22.01.2015

73 Titular/es:

**PHILIP MORRIS PRODUCTS S.A. (100.0%)
QUAI JEANRENAUD 3
2000 NEUCHÂTEL, CH**

72 Inventor/es:

**HAYES, ALEC;
KUDITHIPUDI, CHENGALRAYAN y
VAN DER HOEVEN, RUTGER**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 527 272 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 transgénicas modificadas para el transporte de cadmio reducido, productos derivados y métodos relacionados.

CAMPO TÉCNICO

Composiciones, vectores de expresión, polinucleótidos, polipéptidos, plantas transgénicas, líneas celulares transgénicas y semillas transgénicas, y métodos para hacer y usar estas realizaciones para producir varias plantas que pueden reducir el transporte de metales pesados a partes aéreas.

ANTECEDENTES

Las plantas obtienen metales pesados esenciales, tales como Zn, Ni y Cu, absorbiendo sustratos de iones metálicos de su entorno por varios mecanismos de transporte mediados por los transportadores de transmembrana expresados en la superficie de las células de las raíces y otros tejidos vasculares. Los transportadores clasificados como ATPasas de tipo P, tales como las ATPasas de tipo P1B, son transportadores que translocan sustratos positivamente cargados a través de las membranas plasmáticas usando energía liberada de reacciones de hidrólisis de ATP exergónicas. Las ATPasas de tipo P1B también se denominan ATPasas de metales pesados ("HMA") o ATPasas de tipo CPx. Las HMA se han agrupado por especificidad de sustrato en dos clases, los grupos de Cu/Ag y Zn/Co/Cd/Pb. La primera ATPasa de tipo P1B en ser caracterizada en plantas es la AtHMA4, clonada de *Arabidopsis*. La selectividad de sustrato por las HMA no está estrictamente limitada al transporte de metales esenciales en cuanto que pueden ser reconocidos varios metales no esenciales indiscriminadamente como sustratos, dando como resultado la acumulación de muchos metales no esenciales, tales como Cd, Ph As y Hg. Lugon-Moulin et al. (*Advances in Agronomy* 83:111-180, 2004) revisa procedimientos para reducir el contenido de cadmio de plantas del tabaco.

SUMARIO DE LA INVENCION

Varios aspectos de la invención se dirigen a composiciones y métodos para producir plantas transgénicas incluyendo plantas del tabaco transgénicas, genéticamente modificadas para impedir el transporte de cadmio (Cd) desde el sistema radicular a la lámina foliar, reduciendo los niveles de expresión de transportadores de la familia de HMA. Se ha identificado un homólogo de la HMA ("NtHMA") en el tabaco, que se puede usar para construir varias construcciones de ARNi, que codifican polinucleótidos de ARNi de NtHMA de interés, que pueden facilitar la degradación de transcritos de ARN de NtHMA endógenos. Las plantas transgénicas que pueden expresar polinucleótidos de ARNi de NtHMA según la invención, se pueden usar para reducir los niveles en estado de equilibrio de los transcritos de ARN de NtHMA, y por consiguiente, para reducir el número de transportadores de NtHMA funcionalmente activos disponibles para transportar metales a través de las membranas celulares.

Otros aspectos de la invención se dirigen a vectores de expresión recombinantes que comprenden varias construcciones de ARNi de NtHMA y productos consumibles que incorporan hojas derivadas de plantas transgénicas producidas según los métodos descritos.

Según la presente invención, se proporciona en un aspecto una construcción de ARNi de NtHMA capaz de inhibir la expresión de un ARN mensajero de NtHMA al que corresponde, comprendiendo o consistiendo la construcción en:

una primera secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos 70% con una parte de la SEQ ID NO: 3 o 47;

una segunda secuencia; y

una tercera secuencia que tiene una secuencia complementaria inversa de la primera secuencia, situada en la misma orientación que la primera secuencia,

en donde la segunda secuencia está situada entre la primera secuencia y la tercera secuencia, y la segunda secuencia está operativamente unida a la primera secuencia y a la tercera secuencia.

En la construcción de ARNi de NtHMA:

(a) la primera secuencia puede tener una identidad de secuencia de al menos 95% con una secuencia seleccionada de uno o más del grupo que consiste en: exón 1 como se define en la SEQ ID NO: 5, un fragmento del exón 1 como se define en la SEQ ID NO: 5, exón 2 como se define en la SEQ ID NO: 7, un fragmento del exón 2 como se define en la SEQ ID NO: 7, exón 3 como se define en la SEQ ID NO: 9, un fragmento del exón 3 como se define en la SEQ ID NO: 9, exón 4 como se define en la SEQ ID NO: 11, un fragmento del exón 4 como se define en la SEQ ID NO: 11, exón 5 como se define en la SEQ ID NO: 13, un fragmento del exón 5 como se define en la SEQ ID NO: 13, exón 6 como se define en la SEQ ID NO: 15, un fragmento del exón 6 como se define en la SEQ ID NO: 15, exón 7 como se define en la SEQ ID NO: 17, un fragmento del exón 7 como se define en la SEQ ID NO: 17, exón 8 como se define en la SEQ ID NO: 19, un fragmento del exón 8 como se define en la SEQ ID NO: 19, exón 9 como se define en la SEQ ID NO: 21, un fragmento del exón 9 como se define en la SEQ ID NO: 21, exón 10 como se define en la SEQ ID NO: 23, un fragmento del exón 10 como se define en la SEQ ID NO: 23, exón 11 como se define en la SEQ ID NO: 25, y un fragmento del exón 11 como se define en la SEQ ID NO: 25;

- (b) la segunda secuencia puede tener una identidad de secuencia de al menos 95% con una secuencia seleccionada de uno o más del grupo que consiste en: intrón 1 como se define en la SEQ ID NO: 4, un fragmento del intrón 1 como se define en la SEQ ID NO: 4, intrón 2 como se define en la SEQ ID NO: 6, un fragmento del intrón 2 como se define en la SEQ ID NO: 6, intrón 3 como se define en la SEQ ID NO: 8, un fragmento del intrón 3 como se define en la SEQ ID NO: 8, intrón 4 como se define en la SEQ ID NO: 10, un fragmento del intrón 4 como se define en la SEQ ID NO: 10, intrón 5 como se define en la SEQ ID NO: 12, un fragmento del intrón 5 como se define en la SEQ ID NO: 12, intrón 6 como se define en la SEQ ID NO: 14, un fragmento del intrón 6 como se define en la SEQ ID NO: 14, intrón 7 como se define en la SEQ ID NO: 16, un fragmento del intrón 7 como se define en la SEQ ID NO: 16, intrón 8 como se define en la SEQ ID NO: 18, un fragmento del intrón 8 como se define en la SEQ ID NO: 18, intrón 9 como se define en la SEQ ID NO: 20, un fragmento del intrón 9 como se define en la SEQ ID NO: 20, intrón 10 como se define en la SEQ ID NO: 22, un fragmento del intrón 10 como se define en la SEQ ID NO: 22, intrón 11 como se define en la SEQ ID NO: 24, un fragmento del intrón 11 como se define en la SEQ ID NO: 24, intrón 12 como se define en la SEQ ID NO: 26, y un fragmento del intrón 12 como se define en la SEQ ID NO: 26;
- (c) la tercera secuencia puede tener una identidad de secuencia de al menos 95% con una secuencia seleccionada de uno o más del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 27, un fragmento de la SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, un fragmento de la SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, un fragmento de la SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, un fragmento de la SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, un fragmento de la SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, un fragmento de la SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, un fragmento de la SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, un fragmento de la SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, un fragmento de la SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, un fragmento de la SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, y un fragmento de la SEQ ID NO: 37;
- (d) la primera secuencia puede comprender la SEQ ID NO: 38, la segunda secuencia puede comprender la SEQ ID NO: 39, y la tercera secuencia puede comprender la SEQ ID NO: 40;
- (e) la primera secuencia puede comprender la SEQ ID NO: 42, la segunda secuencia puede comprender la SEQ ID NO: 43, y la tercera secuencia puede comprender la SEQ ID NO: 44; o
- (f) uno o dos o tres de (a), (b), (c), (d) y (e).

Además, en la construcción de ARNi de NtHMA, la primera y la segunda secuencia puede tener cada una, una longitud seleccionada del grupo que consiste en 20-30 nucleótidos, 30-50 nucleótidos, 50-100 nucleótidos, 100-150 nucleótidos, 150-200 nucleótidos, 200-300 nucleótidos, 300-400 nucleótidos, 400-500 nucleótidos, 500-600 nucleótidos y 600-700 nucleótidos.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un vector de expresión que comprende un promotor situado en la dirección 5' y operativamente unido a la construcción de ARNi de NtHMA de la invención.

En el vector de expresión, el promotor se puede seleccionar del grupo que consiste en: un promotor específico de tejido, un promotor inducible y un promotor constitutivo.

Además según la presente invención, se proporciona una planta transgénica que comprende el ARNi de la invención y que tiene niveles de Cd reducidos en al menos una parte de la planta comparado con la parte en un homólogo no transgénico.

La planta transgénica puede ser una planta de tabaco.

En otro aspecto, se proporciona un producto de tabaco consumible que incorpora hojas que comprenden el ARNi de la presente invención y recogidas de la planta transgénica de la presente invención, de modo que las hojas tienen niveles reducidos de Cd comparado con hojas recogidas de un homólogo no transgénico cultivado en condiciones idénticas, en donde el producto tiene niveles reducidos de Cd comparado con un producto que incorpora hojas recogidas del homólogo no transgénico, y en donde el producto es un cigarro, un cigarrillo o un producto de tabaco sin humo.

En el producto de la invención, una reducción del % de Cd puede ser un valor de al menos aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%.

El contenido de Cd puede tener un valor en el intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,05 ppm, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,1 ppm, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,5 ppm, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 1,0 ppm, o de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5 ppm.

En un aspecto diferente de la presente invención, se proporciona un método para reducir los niveles de Cd en al menos una parte de la planta, que comprende:

reducir niveles de un ARNm de NtHMA en la planta mediante la expresión de una construcción de ARNi, en donde la NtHMA se selecciona del grupo que consiste en:

un polinucleótido que comprende o consiste en una secuencia que tiene una identidad de secuencia de

al menos 70% con la SEQ ID NO: 1, y que codifica un transportador de NtHMA que tiene actividad de ATPasa de tipo P1B;

un polinucleótido que comprende o consiste en una secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos 70% con la SEQ ID NO: 3;

5 un polinucleótido que comprende o consiste en una secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos 70% con la SEQ ID NO: 47;

un polinucleótido que comprende o consiste en una secuencia que codifica un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos 70% con la SEQ ID NO: 2, en donde el polipéptido es un transportador NtHMA que tiene actividad de ATPasa de tipo P1B; y

10 un polinucleótido que comprende o consiste en una secuencia que codifica un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos 70% con la SEQ ID NO: 49, en donde el polipéptido es un transportador de NtHMA que tiene actividad de ATPasa de tipo P1B.

En el método de la invención, la construcción de ARNi puede comprender:

15 una primera secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos 90% con una parte de la SEQ ID NO: 3 o 47;

una segunda secuencia; y

20 una tercera secuencia que tiene una secuencia complementaria inversa de la primera secuencia, situada en la misma orientación que la primera secuencia,

en donde la segunda secuencia está situada entre la primera secuencia y la tercera secuencia, y la segunda secuencia está operativamente unida a la primera secuencia y a la tercera secuencia.

25 Después de la expresión de la construcción de ARNi, la parte de la planta puede tener un contenido de Cd reducido en al menos aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%.

30 Adicional o alternativamente, después de la expresión de la construcción de ARNi, la parte de la planta tiene un contenido de Cd en el intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,05 ppm, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,1 ppm, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,5 ppm, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 1,0 ppm, o de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5 ppm.

Otros y varios aspectos (también referidos en la presente memoria como "realizaciones") de la presente invención se describen más adelante.

35 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 es una representación esquemática de un clon genómico de NtHMA que comprende 11 exones.

40 La figura 2A ilustra una estrategia de subclonación de ejemplo para construir un vector de expresión de ARNi de NtHMA que permite la expresión constitutiva de polinucleótidos de ARNi de NtHMA de interés, como se describe en el ejemplo 2.

La figura 2B ilustra un dúplex de ARN bicatenario hipotético (como estructura de "tallo-bucle-tallo") formado por interacciones de pares de bases intramoleculares en el polinucleótidos de ARNi de NtHMA producido como un producto transcrito de una construcción de ARNi de NtHMA de ejemplo.

45 La figura 3A muestra una secuencia de ARNi de ejemplo, NtHMA (660-915), para producir polinucleótidos de ARNi de NtHMA de interés, como se describe en el ejemplo 2.

Las figuras 3B-3D muestran la reducción de Cd en la lámina foliar de múltiples líneas transgénicas de primera generación (TO) que representan 3 variedades, que se han modificado genéticamente para expresar polinucleótidos de ARNi de NtHMA (660-915), como se describe en el ejemplo 5.

50 La figura 4A muestra una secuencia de ARNi de ejemplo, NtHMA (1382-1584), para producir polinucleótidos de ARNi de NtHMA de interés, como se describe en el ejemplo 3.

Las figuras 4B-4D muestran la reducción de Cd en la lámina foliar de múltiples líneas transgénicas de primera generación (TO) que representan 3 variedades, que se han modificado genéticamente para expresar polinucleótidos de ARNi de NtHMA (1382-1584), como se describe en el ejemplo 5.

55 Las figuras 5A-C muestran los niveles de transcrito de ARN de NtHMA normalizados en varias líneas transgénicas de primera generación (TO) que se han modificado genéticamente para expresar polinucleótidos de ARNi de NtHMA de interés, determinado por análisis por PCR cuantitativo en tiempo real de extractos de lámina foliar, como se describe en el ejemplo 6.

60 La figura 6 muestra la distribución de Cd y Zn entre la lámina foliar y la raíz de varias líneas transgénicas de primera generación (TO) que se han modificado genéticamente para expresar polinucleótidos de ARNi de NtHMA de interés, como se presenta en la tabla 2 y se describe en el ejemplo 7.

La figura 7 muestra la distribución de Cd entre los tejidos de la corteza ("B"), lámina foliar ("L"), médula ("P") y raíz ("R") de varias líneas transgénicas de primera generación (TO) que se han modificado genéticamente para expresar polinucleótidos de ARNi de NtHMA de interés, como se presenta en la tabla 3 y se describe en el ejemplo 8.

65 La figura 8 muestra la distribución de Cd entre la lámina foliar ("L") y la raíz ("R") de varias líneas transgénicas de segunda generación (T1) que se han modificado genéticamente para expresar polinucleótidos de ARNi de

NtHMA de interés, como se describe en el ejemplo 9.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

5 I. Aislamiento de genes de NtHMA del tabaco y productos génicos

La figura 1 es una representación esquemática de un clon genómico de NtHMA que comprende 11 exones que codifican un transportador de metales pesados relacionado con la familia de HMA de transportadores. El ejemplo 1 describe además la identificación del clon genómico de NtHMA (_HO-18-2) y 4 clones de ADNc de NtHMA. La tabla 1 más adelante, proporciona posiciones de nucleótidos que corresponden a subregiones de exones e intrones cartografiadas en el clon genómico de NtHMA (_HO-18-2).

A. Polinucleótidos de NtHMA

El término "polinucleótido" se refiere a un polímero de nucleótidos que comprende al menos 10 base de longitud. Los polinucleótidos pueden ser de ADN, ARN o un híbrido de ARN/ARN, que comprenden ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos, combinaciones de desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos, y combinaciones de bases y/o modificaciones, que incluyen uracilo, adenina, timina, citosina, guanina, inosina, xantina, hipoxantina, isocitosina e isoguanina. El término incluye formas de ARN o ARN mono o bicatenarias. El término "ADN" incluye ADN genómico, ADNc, ADN sintetizados químicamente, ADN amplificados por PCR, y combinaciones/equivalentes de los mismos. La expresión "polinucleótido aislado" se refiere a un polinucleótido no contiguo con ningún genoma de origen, o separado de un contexto natural. La expresión incluye cualquier molécula de polinucleótido recombinante tal como construcciones de ARNi de NtHMA, vectores de expresión de ARNi de NtHMA, clones genómicos de NtHMA, y fragmentos y variantes de los mismos.

Como se muestra en la figura 1, el clon genómico de NtHMA, designado como SEQ ID NO: 1, comprende: intrón 1 (SEQ ID NO: 4), exón 1 (SEQ ID NO: 5), intrón 2 (SEQ ID NO: 6), exón 2 (SEQ ID NO: 7), intrón 3 (SEQ ID NO: 8), exón 3 (SEQ ID NO: 9), intrón 4 (SEQ ID NO: 10), exón 4 (SEQ ID NO: 11), intrón 5 (SEQ ID NO: 12), exón 5 (SEQ ID NO: 13), intrón 6 (SEQ ID NO: 14), exón 6 (SEQ ID NO: 15), intrón 7 (SEQ ID NO: 16), exón 7 (SEQ ID NO: 17), intrón 8 (SEQ ID NO: 18), exón 8 (SEQ ID NO: 19), intrón 9 (SEQ ID NO: 20), exón 9 (SEQ ID NO: 21), intrón 10 (SEQ ID NO: 22), exón 10 (SEQ ID NO: 23), intrón 11 (SEQ ID NO: 24), exón 11 (SEQ ID NO: 25), e intrón 12 (SEQ ID NO: 26). Para las secuencias, véase la Lista de secuencias más adelante. Los ejemplos de referencia se dirigen a aislar polinucleótidos que representan fragmentos genómico aislados en el locus de *NtHMA*, que comprenden la SEQ ID NO: 1, fragmentos de la SEQ ID NO: 1, o variantes de los mismos. Los ejemplos de referencia se dirigen a variantes de polinucleótidos de NtHMA aislados que comprenden una identidad de secuencia de al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% con la SEQ ID NO: 1, o fragmentos de la SEQ ID NO: 1.

Los ejemplos de referencia se dirigen a polinucleótidos aislados que tienen secuencias que complementan las de variantes de polinucleótidos de NtHMA que comprenden una identidad de secuencia de al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% con la SEQ ID NO: 1, o fragmentos de la SEQ ID NO: 1. Los ejemplos de referencia se dirigen a polinucleótidos aislados que pueden hibridar específicamente, en condiciones de moderadas a muy restrictivas, con polinucleótidos que comprenden la SEQ ID NO: 1, o fragmentos de la SEQ ID NO: 1.

Los ejemplos de referencia se dirigen a polinucleótidos aislados de ADNc de NtHMA (Clon P6663), que componen la SEQ ID NO: 3, fragmentos de la SEQ ID NO: 3, o sus variantes. Los ejemplos de referencia se dirigen a variantes de polinucleótidos de NtHMA que comprenden una identidad de secuencia de al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% con la SEQ ID NO: 3, o fragmentos de la SEQ ID NO: 3. Los ejemplos de referencia se dirigen a variantes de polinucleótidos de NtHMA aisladas que comprenden una identidad de secuencia de al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% con la SEQ ID NO: 3, o fragmentos de la SEQ ID NO: 3 y en las que las T se han sustituido por U (p. ej. ARN). Los ejemplos de referencia se dirigen a polinucleótidos aislados que pueden hibridar específicamente, en condiciones de moderadas a altamente restrictivas, con polinucleótidos que comprenden la SEQ ID NO: 3, o fragmentos de la SEQ ID NO: 3. Los ejemplos de referencia se dirigen a polinucleótidos aislados que tienen una secuencia que complementa la de las variantes de polinucleótido de NtHMA que comprenden una identidad de secuencia de al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% con la SEQ ID NO: 3, o fragmentos de la SEQ ID NO: 3.

Los ejemplos de referencia se dirigen a polinucleótidos aislados de ADNc de NtHMA (Clon P6643), que comprende la SEQ ID NO: 47, fragmentos de la SEQ ID NO: 47, o variantes de los mismos. Los ejemplos de referencia se dirigen a variantes de polinucleótido de NtHMA aisladas que comprenden una identidad de secuencia de al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% con la SEQ ID NO: 47, fragmentos de la SEQ ID NO: 47. Los ejemplos de referencia se dirigen a variantes de polinucleótido de NtHMA aisladas que comprenden una identidad de secuencia de al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% con la SEQ ID NO: 47, fragmentos de la SEQ ID NO: 47, y en las que las T se han sustituido por U (p. ej. ARN). Los ejemplos de referencia se dirigen a polinucleótidos aislados que pueden hibridar específicamente, en condiciones de moderadas a muy restrictivas, con polinucleótidos que comprenden la SEQ ID NO: 47, fragmentos de la SEQ ID NO: 47. Los ejemplos de referencia se dirigen a polinucleótidos aislados que tienen una secuencia que complementa la de las

variantes de polinucleótido de NtHMA que comprenden una identidad de secuencia de al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, y 99% con la SEQ ID NO: 47, fragmentos de la SEQ ID NO: 47.

5 Los ejemplos de referencia se dirigen a biopolímeros que son homólogos con los polinucleótidos de NtHMA y polipéptidos de NtHMA ("homólogos de NtHMA"), que se pueden identificar de diferentes especies de plantas. Por ejemplo, los homólogos de NtHMA se pueden aislar experimentalmente mediante cribado de bibliotecas adecuadas de ácidos nucleicos derivadas de diferentes especies de plantas de interés. Alternativamente, se pueden identificar homólogos de NtHMA mediante cribado de bases de datos genómicas que contienen secuencias de una o más especies que usan una secuencia derivada de polinucleótidos de NtHMA y/o polipéptidos de NtHMA. Dichas bases de datos genómicas están fácilmente disponibles para una serie de especies (p. ej., en la red (www) en tigr.org/tdb; genetics.wisc.edu; stanford.edu/about.ball; hiv-web.lan1.gov; ncbi.nlm.nih.gov; ebi.ac.uk; y pasteur.fr/other/biology). Por ejemplo, se pueden obtener secuencias de oligonucleótidos degeneradas por "retrotraducción" de fragmentos de polipéptido de NtHMA. Los polinucleótidos de NtHMA se pueden usar como sondas o cebadores para identificar/amplificar secuencias relacionadas, o para obtener secuencias de longitud completa para NtHMA relacionadas por PCR, por ejemplo, o por otras técnicas bien conocidas (p. ej., véase PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis et. al., eds., Academic Press, Inc. (1990)).

B. Polipéptidos de NtHMA

20 La expresión "polipéptido de NtHMA" se refiere a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos designada como SEQ ID NO: 2; polipéptidos que tienen homología sustancial (es decir, similitud de secuencia) o identidad sustancial con la SEQ ID NO: 2; fragmentos de la SEQ ID NO: 2; y variantes de los mismos. Los polipéptidos de NtHMA incluyen secuencias que tienen un grado suficiente o sustancial de identidad o similitud con la SEQ ID NO: 2, y que pueden funcionar transportando metales pesados a través de membranas celulares.

25 Los polipéptidos de NtHMA incluyen variantes producidas introduciendo cualquier tipo de alteraciones (p. ej., inserciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos; cambios en estados de glicosilación; cambios que afectan al repliegado o isomerizaciones, estructuras tridimensionales o estados de autoasociación), que se pueden diseñar deliberadamente o aislar de forma natural. Los polipéptidos de NtHMA pueden estar en forma lineal o ciclados usando métodos conocidos (p. ej., H. U. Saragovi, et al., *Bio/Technology* 10, 773 (1992); y R. S. McDowell, et al., *J. Amer. Chem. Soc.* 114:9245 (1992), ambos incorporados por referencia en la presente memoria). Los polipéptidos de NtHMA comprenden al menos de 8 a 10, al menos 20, al menos 30, o al menos 40 aminoácidos contiguos.

35 Los ejemplos de referencia se dirigen a polipéptidos de NtHMA aislados codificados por la secuencia del polinucleótido, SEQ ID NO: 1, que comprende la SEQ ID NO: 2, fragmentos de la SEQ ID NO: 2, o variantes de los mismos. Los ejemplos de referencia se dirigen a variantes de polipéptido de NtHMA aisladas que comprenden una identidad de secuencia de al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% con la SEQ ID NO: 2, o fragmentos de la SEQ ID NO: 2.

40 Los ejemplos de referencia se dirigen a polipéptidos de NtHMA aislados (Clon P6663), que comprenden la SEQ ID NO: 2, fragmentos de la SEQ ID NO: 2, o variantes de los mismos. Los ejemplos de referencia se dirigen a variantes de polipéptido de NtHMA aisladas que comprenden una identidad de secuencia de al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% con la SEQ ID NO: 2, o fragmentos de la SEQ ID NO: 2.

45 Los ejemplos de referencia se dirigen a polipéptidos de NtHMA aislados (Clon P6643), que comprenden la SEQ ID NO: 49, fragmentos de la SEQ ID NO: 49, o variantes de los mismos. Los ejemplos de referencia se dirigen a variantes de polipéptido de NtHMA aisladas que comprenden una identidad de secuencia de al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% con la SEQ ID NO: 49, o fragmentos de la SEQ ID NO: 49.

50 II. Composiciones y métodos relacionados para reducir la expresión génica de NtHMA y/o la actividad de transportador mediada por NtHMA

55 Las composiciones antagonistas adecuadas que pueden regular por disminución la expresión y/o actividad de NtHMA y variantes de NtHMA, incluyen polinucleótidos específicos de secuencia que pueden interferir con la transcripción de uno o más genes de NtHMA endógenos; polinucleótidos específicos de secuencia que pueden interferir con la traducción de transcritos de ARN de NtHMA (p. ej., ARNbc, ARNipi, ribozimas); polinucleótidos específicos de secuencia que pueden interferir con la estabilidad de proteína de NtHMA, la actividad enzimática de NtHMA y/o la actividad de unión de NtHMA con respecto a sustratos y/o proteínas reguladoras; anticuerpos que presentan especificidad para NtHMA; y compuestos moléculas pequeñas que pueden interferir con la estabilidad de proteína de NtHMA, la actividad enzimática de NtHMA, y/o la actividad de unión de NtHMA. Un antagonista eficaz puede reducir el transporte de metales pesados (p. ej., Cd) en las estructuras de la lámina foliar en al menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95%.

A. Definiciones

65 A lo largo de esta descripción y las reivindicaciones adjuntas, los términos "un/una" y "el/la" funcionan como referencias en singular y plural salvo que el contexto dicte claramente otra cosa. Así, por ejemplo, una referencia a

un “polinucleótido de ARNi” incluye una pluralidad de dichos polinucleótidos de ARNi, y una referencia a “la planta” incluye la referencia a una o más de dichas plantas.

El término “orientación” se refiere a un orden particular en la colocación de un polinucleótido con respecto a la posición de un polinucleótido de referencia. Un ADN lineal tiene dos posibles orientaciones: la dirección de 5' a 3' y la dirección de 3' a 5'. Por ejemplo, si una secuencia de referencia se coloca en la dirección de 5' a 3' y una segunda secuencia se coloca en la dirección de 5' a 3' dentro de la misma molécula/cadena de polinucleótido, entonces la secuencia de referencia y la segunda secuencia están orientadas en la misma dirección, o tienen la misma orientación. Típicamente, una secuencia de promotor y un gen de interés bajo regulación del promotor dado, se coloran en la misma orientación. Sin embargo, con respecto a la secuencia de referencia colocada en la dirección de 5' a 3', si una segunda secuencia se coloca en la dirección de 3' a 5' dentro de la misma molécula/cadena de polinucleótido, entonces la secuencia de referencia y la segunda secuencia están orientadas en una dirección de sentido contrario, o tienen orientación de sentido contrario. Dos secuencias que tienen orientaciones de sentido contrario una con respecto a la otra, se pueden describir alternativamente como que tienen la misma orientación, si la secuencia de referencia (dirección de 5' a 3') y la secuencia complementaria inversa de la secuencia de referencia (secuencia de referencia colocada de 5' a 3') están colocadas en la misma molécula/cadena de polinucleótido.

La expresión “vector de expresión de ARNi de NtHMA” se refiere a un vehículo de ácido nucleico que comprende una combinación de componentes de ADN para permitir el transporte y la expresión de construcciones de ARNi de NtHMA. Los vectores de expresión adecuados incluyen episomas capaces de replicación extracromosómica tales como plásmidos de ADN bicatenarios, circulares; plásmidos de ADN bicatenarios linearizados; y otros vectores de expresión funcionalmente equivalentes de cualquier origen. Un vector de expresión de ARNi de NtHMA adecuado comprende al menos un promotor situado en la dirección 5' y operativamente unido a una construcción de ARNi de NtHMA, como se define más adelante.

La “construcción de ARNi de NtHMA” se refiere a un fragmento de ADN recombinante bicatenario que codifica “polinucleótidos de ARNi de NtHMA” que tienen de interferencia de ARN. Una construcción de ARNi de NtHMA comprende una “cadena molde” con emparejamiento de bases con una “cadena codificante o del mismo sentido” complementaria. Una construcción de ARNi de NtHMA dada se puede insertar en un vector de expresión de ARNi de NtHMA en dos posibles orientaciones, sea en la misma orientación (o sentido) o en la orientación inversa (o antisentido) con respecto a la orientación de un promotor situado en un vector de expresión de ARNi de NtHMA.

La expresión “polinucleótidos de ARNi de NtHMA” puede dirigirse a ARN de NtHMA para la degradación enzimática, que implica la formación de fragmentos más pequeños de polinucleótidos de ARNi de NtHMA (“ARNip”) que se pueden unir a múltiples secuencias complementarias dentro del ARN de NtHMA objetivo. Los niveles de expresión de uno o más genes de NtHMA se pueden reducir mediante la actividad de interferencia del ARN de polinucleótidos de ARNi de NtHMA.

La expresión “cadena molde” se refiere a la cadena que comprende una secuencia que complementa la de la cadena “del mismo sentido o codificante” de un dúplex de ADN, tal como fragmento genómico de NtHMA, ADNc de NtHMA o construcción de ARNi de NtHMA, o cualquier fragmento de ADN que comprende una secuencia de ácido nucleico que puede ser transcrita por la ARN polimerasa. Durante la transcripción, la ARN polimerasa se puede translocar a lo largo de la cadena molde en la dirección de 3' a 5' durante la síntesis de ARN naciente.

Las expresiones “cadena del mismo sentido” o “cadena codificante” se refieren a la cadena que comprende una secuencia que complementa la de la cadena molde en un dúplex de ADN. Por ejemplo, la secuencia de la cadena codificante (“secuencia del mismo sentido”) para el clon genómico de NtHMA identificado se designa como la SEQ ID NO: 1. Por ejemplo, la secuencia codificante para el ADNc de NtHMA identificada como clon P6663, se designa como SEQ ID NO: 3. Por ejemplo, la secuencia codificante para el ADNc de NtHMA, identificada como clon P6643, se designa como SEQ ID NO: 46. Por ejemplo, si la cadena codificante comprende una secuencia hipotética 5'-TAATCCGGT-3', entonces la secuencia correspondiente sustancialmente idéntica dentro de un ARNm objetivo hipotético es 5'-JAAUCCGGU-3'.

La expresión “secuencia complementaria inversa” se refiere a la secuencia que complementa la “secuencia codificante” de interés (p. ej., secuencia de exón) situada dentro de la misma cadena, en la misma orientación con respecto a la secuencia codificante. Por ejemplo, si una cadena comprende una secuencia hipotética 5'-TAATCCGGT-3', entonces la secuencia complementaria inversa 5'-ACCGGATTA-3' puede estar operativamente unida a la secuencia codificante, separada por una secuencia espaciadora.

Las expresiones “transcrito de ARN de NtHMA” o “ARN de NtHMA”, en el contexto de la interferencia de ARN, se refiere a moléculas de ácido polirribonucleótido producidas dentro de una célula de planta hospedante de interés, que resulta de la transcripción de genes endógenos de la familia de HMA, incluyendo el gen de NtHMA aislado (SEQ ID NO: 1). Por lo tanto, estos términos incluyen cualquier especie de ARN o variantes de ARN producidas como productos de transcripción a partir de genes relacionados con la HMA que pueden ser distintos del gen de NtHMA aislado (SEQ ID NO: 1) pero que tienen similitud suficiente a nivel estructural y/o funcional para ser clasificados dentro de la misma familia. Por ejemplo, si una célula de planta hospedantes seleccionada para modificación

genética según los métodos descritos es el tabaco, los transcritos de ARN de NtHMA objetivo incluyen: (1) pre-ARNm y ARNm producidos a partir de la transcripción del gen NtHMA aislado (SEQ ID NO: 1); (2) pre-ARN y ARNm producidos a partir de la transcripción de cualquier gen que tenga una identidad de secuencia de al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% con la secuencia del gen de NtHMA aislada (SEQ ID NO: 1) (es decir, otros genes distintos sustancialmente idénticos al gen de NtHMA identificado y que codifica isoformas relacionadas de los transportadores HMA); y (3) pre-ARN y ARNm producidos a partir de la transcripción de alelos del gen de NtHMA (SEQ ID NO: 1). Los transcritos de ARN de NtHMA incluyen variantes de ARN producidas como resultado de reacciones de corte y empalme de ARN alternativas de ARN heteronucleares ("ARNhn") de un gen de NtHMA particular, variantes de ARNm que resultan de dichas reacciones de corte y empalme de ARN alternativas, y cualesquiera variantes de ARN intermedias.

Los términos "homología" o "identidad" o "similitud" se refieren al grado de similitud de secuencia entre dos polipéptidos o entre dos moléculas de ácido nucleico comparados por alineamiento de secuencia. El grado de homología entre dos secuencias de ácido nucleico discretas que se comparan es una función del número de nucleótidos idénticos o que se corresponden en posiciones comparables. El porcentaje de identidad se puede determinar por inspección visual y cálculo matemático. Alternativamente, el porcentaje de identidad de dos secuencias de ácido nucleico se puede determinar comparando la información de las secuencias usando un programa de ordenador GAP, versión 6.0 descrito por Devereux et al. (*Nucl. Acids Res.* 12:387, 1984) y disponible en la University of Wisconsin Genetics Computer Group (UWGCG). Los parámetros por defecto típicos para el programa GAP incluyen: (1) una matriz de comparación unaria (que contiene un valor de 1 para las identidades y 0 para no identidades) para nucleótidos y la matriz de comparación ponderada de Gribskov y Burgess, *Nucl. Acids Res.* 14:6745, 1986, como describen Schwartz y Dayhoff, eds., *Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation*, pág. 353-358, 1979; (2) una penalización de 3.0 para cada hueco y una penalización adicional de 0,10 para cada símbolo en cada hueco; y (3) sin penalizaciones para huecos finales. Se pueden usar alternativamente varios programas de comparación de secuencias conocidos para los expertos en la técnica.

La expresión "en la dirección 5'" se refiere a una dirección/posición relativa con respecto a un elemento de referencia a lo largo de una secuencia de polinucleótido lineal, que indica una dirección/posición hacia el extremo 5' de la secuencia de polinucleótido. "En la dirección 5'" se puede usar de forma intercambiable con el "extremo 5' de un elemento de referencia".

La expresión "operativamente unido" se refiere a la unión de distintos elementos de ADN, fragmentos o secuencias para producir una unidad de transcripción funcional o un vector de expresión funcional.

El término "promotor" se refiere a un elemento/secuencia de ácido nucleico, típicamente situado en la dirección 5' y operativamente unido a un fragmento de ADN bicatenario, tal como una construcción de ARNi de NtHMA. Por ejemplo, un promotor adecuado permite la activación transcripcional de una construcción de ARNi de NtHMA por reclutamiento del complejo de transcripción, incluyendo la ARN polimerasa y varios factores, para iniciar la síntesis de ARN. Los "promotores" pueden derivar enteramente de regiones próximas a un gen natural de interés, o pueden estar compuestos de varios elementos derivados de diferentes promotores naturales y/o segmentos de ADN sintéticos. Los promotores adecuados incluyen promotores específicos de tejido reconocidos por factores específicos de tejido presentes en diferentes tejidos o tipos de células (p. ej., promotores específicos de raíz, promotores específicos de brote, promotores específicos del xilema), o presentes durante diferentes etapas del desarrollo, o presentes en respuesta a diferentes condiciones medioambientales. Dichos promotores adecuados incluyen promotores constitutivos que pueden ser activados en la mayoría de los tipos de células sin requerir inductores específicos. Los ejemplos de promotores adecuados para controlar la producción del polipéptido de ARNi de NtHMA incluyen el virus del mosaico de la coliflor 35S (CaMV/35S), SSU, OCS, lib4, usp, STLS1, B33, nos o promotores de ubiquitina o faseolina. Los expertos en la técnica son capaces de generar múltiples variaciones de promotores recombinantes, como se describe en una serie de referencias, tales como Okamura y Goldberg, *Biochemistry of Plants*, Vol. 15: pág. 1-82 (1989).

Los promotores específicos de tejido son elementos de control transcripcional que son solo activos en células o tejidos particulares en momentos específicos durante el desarrollo de la planta, tal como en tejidos vegetativos o tejidos reproductivos. La expresión específica de tejido puede ser ventajosa, por ejemplo, cuando se prefiere la expresión de polinucleótidos en determinados tejidos. Los ejemplos de promotores específicos de tejido bajo el control del desarrollo incluyen promotores que pueden iniciar la transcripción solo (o principalmente solo) en determinados tejidos, tales como tejidos vegetativos, p. ej., raíces u hojas, o tejidos reproductivos, tales como frutos, óvulos, semillas, polen, pistilos, flores o cualquier tejido embrionario. Los promotores específicos de tejido reproductivo pueden ser, p. ej., específicos de antera, específicos de óvulo, específicos embrionarios, específicos de endosperma, específicos de tegumento, específico de semilla y recubrimiento de semilla, específico de polen, específico de pétalos, específico de sépalos, o combinaciones de los mismos.

Los promotores específicos de hoja adecuados incluyen promotor de la piruvato ortofosfato diquinasa (PPDK) de planta C4 (maíz), promotor de cab-m1Ca+2 del maíz, el promotor del gen relacionado con myb de *Arabidopsis thaliana* (Atmyb5), los promotores de la ribulosa bifsosfato carboxilada (RBCS) (p. ej., los genes del tomate RBCS1,

RBCS2 y RBCS3A expresados en hojas y plántulas de crecimiento con luz, RBCS1 y RBCS2 expresados en frutos del tomate en desarrollo, y/o promotor de la ribulosa bifsosfato carboxilasa expresada casi exclusivamente en células mesófilas en láminas foliares y vainas foliares en niveles altos).

- 5 Los promotores específicos de senescencia adecuados incluyen un promotor del tomate activo durante la maduración del fruto, senescencia y abscisión de las hojas, un promotor del maíz del gen que codifica una cisteína proteasa. Se pueden usar promotores específicos de antera adecuados. Dichos promotores son conocidos en la técnica o se pueden descubrir por técnicas conocidas; véase, p. ej., Bhalla y Singh (1999) "Molecular control of male fertility in Brassica", Proc. 10th Annual Rapeseed Congress, Canberra, Australia; van Tunen et al. (1990) "Pollen- and anther-specific chi promoters from petunia: tandem promoter regulation of the chiA gene". *Plant Cell* 2:393-40; Jeon et al. (1999), "Isolation and characterization of an anther-specific gene, RA8, from rice" (*Oryza sativa* L.). *Plant Molecular Biology* 39:35-44; y Twell et al. (1993) "Activation and developmental regulation of an Arabidopsis anther-specific promoter in microspores and pollen of *Nicotiana tabacum*". *Sex. Plant Reprod.* 6:217-224.
- 10
- 15 Se pueden seleccionar promotores de raíz adecuados preferidos conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Hire et al. (1992) *Plant Mol. Biol.* 20(2):207-218 (gen de glutamina sintasa específico de raíz de soja); Keller y Baumgartner (1991) *Plant Cell* 3(10):1051-1061 (elemento de control específico de raíz en el gen de GRP 1.8 de judía); Sanger et al. (1990) *Plant Mol. Biol.* 14(3):433-443 (promotor específico de raíz del gen de la manopina sintasa (MAS) de *Agrobacterium tumefaciens*); y Miao et al. (1991) *Plant Cell* 3(1):11-22 (clon de ADNc de longitud completa que codifica la glutamina sintasa citosólica (GS), que es expresada en raíces y nódulos de raíz de la soja. Véase también Bogusz et al. (1990) *Plant Cell* 2(7):633-641, donde se describen dos promotores específicos de raíz aislados de genes de hemoglobina de la no leguminosa fijadora de nitrógeno *Parasponia andersonii* y la no leguminosa no fijadora de nitrógeno *Trema tomentosa* relacionada.
- 20
- 25 Los promotores de semilla preferidos adecuados incluyen tanto los promotores específicos de semilla (aquellos promotores activos durante el desarrollo de la semilla tales como los promotores de proteínas de almacenamiento de semillas) como los promotores de germinación de semillas (aquellos promotores activos durante la germinación de semillas). Véase, p. ej., Thompson et al. (1989) *BioEssays* 10: 108, incorporado en la presente memoria por referencia. Dichos promotores de semilla preferidos incluyen, pero no se limitan a Cim1 (mensaje inducido por citoquinina); cZ19B1 (zeína del maíz de 19 kDa); milpa (mioinositol-1-fosfato sintasa); mZE40-2, también conocido como Zm-40 (patente de EE.UU. nº 6.403.862); nuclc (patente de EE.UU. nº 6.407.315); y celA (celulosa sintasa) (véase el documento WO 00/11177). La gamma-zeína es un promotor específico de endosperma. La Glob-1 es un promotor específico embrionario. Para dicotiledóneas, los promotores específicos de semillas incluyen, pero no se limitan a beta-faseolina de judía, napina, beta-conglicina, lectina de soja, cruciferina y similares. Para monocotiledóneas, los promotores específicos de semillas incluyen, pero no se limitan a un promotor de zeína del maíz de 15 kDa, un promotor de zeína de 22 kDa, un promotor de zeína de 27 kDa, un promotor de g-zeína, un promotor de gamma-zeína de 27 kDa (tal como el promotor gzw64A, véase, número de acceso en Genbank S78780), un promotor céreo, un promotor de shrunken 1, un promotor de shrunken 2, un promotor de globulina 1 (véase, número de acceso en Genbank L22344), un promotor de ltp2 (Kalla, et al., *Plant Journal* 6:849-860 (1994); patente de EE.UU. nº 5.525.716), un promotor de cim1 (véase la patente de EE.UU. nº 6.225.529) promotores de end1 y end2 del maíz (véase la patente de EE.UU. nº 6.528.704 y solicitud 10/310.191, presentada el 4 de diciembre, 2002); promotor de nuc1 (patente de EE.UU. nº 6.407.315); promotor de Zm40 (patente de EE.UU. nº 6.403.862); eep1 y eep2; lec1 (solicitud de patente de EE.UU. nº de serie 09/718.754); promotor de tiorredoxina H (solicitud de patente provisional de EE.UU. nº 60/514.123); promotor de mlip15 (patente de EE.UU. nº 6.479.734);
- 30
- 35
- 40
- 45 promotor de PCNA2; y el promotor de shrunken-2. (Shaw et al., *Plant Phys* 98:1214-1216, 1992; Zhong Chen et al., *PNAS USA* 100:3525-3530, 2003).

Los ejemplos de promotores inducibles incluyen promotores sensibles al ataque de patógenos, condiciones anaerobias, temperatura elevada, luz, sequía, temperatura fría, o concentración salina alta. Los promotores inducibles por patógenos incluyen los de proteínas relacionadas con patogénesis (proteínas PR, proteínas SAR, beta-1,3-glucanasa, quitinasa). Véase, por ejemplo, Redolfi et al. (1983) *Neth. J. Plant Pathol.* 89:245-254; Uknes et al. (1992) *Plant Cell* 4:645-656; y Van Loon (1985) *Plant Mol. Virol.* 4:111-116. Véase también la solicitud titulada "Inducible Maize Promoters", solicitud de patente de EE.UU. nº de serie 09/257.583, presentada el 25 de febrero, 1999.

50

55

Además de los promotores de plantas, otros promotores adecuados pueden tener origen bacteriano (p. ej., el promotor de la octipino sintasa, el promotor de la nopalina sintasa y otros promotores derivados de plásmidos Ti), o se pueden obtener de promotores víricos (p. ej., promotores de ARN 35S y 19S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), promotores constitutivos del virus del mosaico del tabaco, promotores 19S y 35S virus del mosaico de la coliflor (CaMV), o promotor 35S del virus del mosaico de escrofularia).

60

El término "potenciador" se refiere a una molécula de ácido nucleico, o una secuencia de ácido nucleico, que puede reclutar proteínas reguladoras transcripcionales tales como activadores transcripcionales, para potenciar la activación transcripcional aumentando la actividad del promotor. Dichos potenciadores pueden derivarse de regiones próximas a un promotor natural de interés (fuentes homólogas) o pueden derivarse de contextos no naturales (fuentes heterólogas) y operativamente unidos a cualquier promotor de interés dentro de los vectores de expresión

65

de ARNi de NtHMA para potenciar la actividad y/o especificidad de tejido de un promotor. Algunos potenciadores pueden operar en cualquier orientación con respecto a la orientación de una unidad de transcripción. Por ejemplo, se pueden situar potenciadores en la dirección 5' o dirección 3' de una unidad transcripcional que comprende un promotor y una construcción de ARNi de NtHMA. Los expertos en la técnica son capaces de unir operativamente

5
B. Vectores de expresión de ARNi que comprenden construcciones de ARNi de NtHMA que codifican polinucleótidos de ARNi de NtHMA

10 La interferencia de ARN ("ARNi") o silenciamiento de ARN es un procedimiento conservado evolutivamente por el cual se pueden dirigir ARNm específicos para la degradación enzimática. Se debe introducir un ARN bicatenario (ARNbc) o producir mediante una célula (p. ej., virus de ARNbc o polinucleótidos de ARNi de NtHMA) para iniciar la ruta del ARNi. El ARNbc se puede convertir en múltiples dúplex de ARNip de 21-23 pb de longitud ("ARNip" (ARN interferente pequeño)) mediante RNasas II, que son endonucleasas específicas de ARN ("Dicer"). Los ARNip posteriormente pueden ser reconocidos por complejos de silenciamiento inducidos por ARN ("RISC") que

15 promueven el desenrollado del ARNip a través de un procedimiento dependiente de ATP. La cadena de sentido contrario desenrollada del ARNip guía el RISC activado al ARNm al que va dirigido (p. ej., variantes de ARN de NtHMA) que comprenden una secuencia complementaria de la cadena de sentido contrario del ARNip. El ARNm al que va dirigido y la cadena de sentido contrario pueden formar una hélice de forma A, y el surco mayor de la hélice de forma A puede ser reconocido por el RISC activado. El ARNm diana puede ser escindido por el RISC activado en

20 un solo sitio definido por el sitio de unión del extremo 5' de la cadena de ARNsi. El RISC activado se puede reciclar para catalizar otro suceso de escisión.

25 La figura 2A ilustra la construcción de un vector de expresión de ARNi de NtHMA de ejemplo. En la figura 2A "S I" indica etapa I y "S II" indica etapa II del proceso de construcción. Varias realizaciones se dirigen a vectores de expresión de ARNi de NtHMA que comprenden construcciones de ARNi de NtHMA que codifican polinucleótidos de ARNi de NtHMA que presentan actividad de interferencia de ARN reduciendo el nivel de expresión de los ARNm de NtHMA, pre-ARNm de NtHMA y variantes de ARN de NtHMA relacionadas. Los vectores de expresión comprenden un promotor situado en la dirección 5' y operativamente unido a una construcción de ARNi de NtHMA, como se define más adelante. Los vectores de expresión de ARNi de NtHMA comprenden un promotor nuclear mínimo

30 adecuado, una construcción de ARNi de NtHMA de interés, una región reguladora en dirección 5' (5'), una región reguladora en dirección 3' (3'), incluyendo señales de terminación de la transcripción y poliadenilación, y otras secuencias conocidas para los expertos en la técnica, tales como varios marcadores de selección.

35 Los polinucleótidos de NtHMA se pueden producir en varias formas, incluyendo como estructuras bicatenarias de tipo horquilla ("ARNbc-i"). El ARNbc-i de NtHMA se puede convertir enzimáticamente en ARNip de NtHMA bicatenarios. Una de las cadenas del dúplex de ARNip de NtHMA se puede asociar con una secuencia complementaria dentro del ARNm de NtHMA diana y variantes de ARN de NtHMA relacionadas. Los dúplex de ARNip/ARNm son reconocidos por RISC que puede escindir los ARN de NtHMA en múltiples sitios de una forma dependiente de la secuencia, dando como resultado la degradación del ARNm de NtHMA diana y variantes de ARN de NtHMA diana.

40

45 La figura 2B ilustra la formación de un dúplex de ARN bicatenario hipotético formado (como estructura de "tallo-bucle-tallo") como un producto transcrito a partir de una construcción de ARNi de NtHMA de ejemplo. En la figura 2B, se muestra una construcción 10 de ARNi de NtHMA hipotética, que comprende 3 fragmentos de ADN bicatenarios, tal como los fragmentos 1-3. La flecha I indica la formación de la construcción de ARNi, la flecha II la transcripción y la flecha III la formación de ARNbc. El fragmento 1 se sitúa en dirección 5' y operativamente unido al fragmento 2, el cual se sitúa en dirección 5' y operativamente unido al fragmento 3, para el cual las cadenas/secuencias de ADN 4, 6 y 8 están unidas entre sí en tándem para formar la cadena 11, como se muestra. Alternativamente, una construcción de ARNi de NtHMA comprende "una secuencia codificante" 5, que se sitúa en

50 dirección 5' y operativamente unida a "una secuencia espaciadora" 7, que se sitúa en dirección 5' y operativamente unida a "una secuencia complementaria inversa" 9. Las cadenas/secuencias 5, 7 y 9 pueden estar unidas entre sí en tándem, para formar la cadena/secuencia 12. Alternativamente, una construcción de ARNi de NtHMA comprende "una secuencia codificante" 8, que se sitúa en dirección 5' y operativamente unida a "una secuencia espaciadora" 6, que se sitúa en dirección 5' y operativamente unida a "una secuencia complementaria inversa" 4. Las cadenas/secuencias 8, 6 y 4 pueden estar unidas entre sí en tándem, para formar la cadena/secuencia 11. La

55 cadena 12 es complementaria de la cadena 11. La cadena 11 es una cadena molde que puede ser transcrita en un polinucleótido de ARNi de NtHMA 13. El polinucleótido de ARNi de NtHMA 13 forma una estructura de tipo horquilla ("tallo-bucle-tallo"), en la que el tallo 16 es una región complementaria que resulta de las interacciones de pares de bases intramoleculares del polinucleótido de ARNi de NtHMA 15 y el bucle 17 representa una región no complementaria codificada por una secuencia espaciadora, tal como cadenas/secuencias 6 o 7.

60

65 Cualquier polinucleótido de ARN de NtHMA de interés se puede producir seleccionando una composición de secuencia, tamaño de bucle y longitud de tallo adecuados para producir el dúplex de horquilla de NtHMA. Un intervalo adecuado para diseñar longitudes de tallo de un dúplex de horquilla incluye longitudes de tallo de 20-30 nucleótidos, 30-50 nucleótidos, 50-100 nucleótidos, 100-150 nucleótidos, 150-200 nucleótidos, 200-300 nucleótidos, 300-400 nucleótidos, 400-500 nucleótidos, 500-600 nucleótidos y 600-700 nucleótidos. Un intervalo adecuado para

diseñar longitudes de bucle de un dúplex de horquilla incluye longitudes de bucle de 4-25 nucleótidos, 25-50 nucleótidos, o más largas si la longitud del tallo del dúplex de horquilla es sustancial. En algunos contextos, las estructuras de horquilla con regiones en dúplex mayores de 21 nucleótidos pueden promover el silenciamiento dirigido por ARNip eficaz, independientemente de la secuencia y longitud del bucle.

5 Las construcciones de ARNi de NtHMA de ejemplo para la regulación por disminución del nivel de expresión del gen de NtHMA (SEQ ID NO: 1) y otros genes relacionados de NtHMA incluyen las siguientes:

10 Varias realizaciones se dirigen a vectores de expresión de ARNi de NtHMA que comprenden una construcción de ARNi de NtHMA que comprende uno o más de: intrón 1 (SEQ ID NO: 4), exón 1 (SEQ ID NO: 5), intrón 2 (SEQ ID NO: 6), exón 2 (SEQ ID NO: 7), intrón 3 (SEQ ID NO: 8), exón 3 (SEQ ID NO: 9), intrón 4 (SEQ ID NO: 10), exón 4 (SEQ ID NO: 11), intrón 5 (SEQ ID NO: 12), exón 5 (SEQ ID NO: 13), intrón 6 (SEQ ID NO: 14), exón 6 (SEQ ID NO: 15), intrón 7 (SEQ ID NO: 16), exón 7 (SEQ ID NO: 17), intrón 8 (SEQ ID NO: 18), exón 8 (SEQ ID NO: 19), intrón 9 (SEQ ID NO: 20), exón 9 (SEQ ID NO: 21), intrón 10 (SEQ ID NO: 22), exón 10 (SEQ ID NO: 23), intrón 11 (SEQ ID NO: 24), exón 11 (SEQ ID NO: 25), e intrón 12 (SEQ ID NO: 26), fragmentos de los mismos y variantes de los mismos.

20 Varias realizaciones se dirigen a vectores de expresión de ARNi de NtHMA que comprenden: una construcción de ARNi de NtHMA que tiene una identidad de secuencia de al menos 95%, 96%, 97%, 98% y 99% con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: exón 1 (SEQ ID NO: 5), un fragmento del exón 1 (SEQ ID NO: 5), exón 2 (SEQ ID NO: 7), un fragmento del exón 2 (SEQ ID NO: 7), exón 3 (SEQ ID NO: 9), un fragmento del exón 3 (SEQ ID NO: 9), exón 4 (SEQ ID NO: 11), un fragmento del exón 4 (SEQ ID NO: 11), exón 5 (SEQ ID NO: 13), un fragmento del exón 5 (SEQ ID NO: 13), exón 6 (SEQ ID NO: 15), un fragmento del exón 6 (SEQ ID NO: 15), exón 7 (SEQ ID NO: 17), un fragmento del exón 7 (SEQ ID NO: 17), exón 8 (SEQ ID NO: 19), un fragmento del exón 8 (SEQ ID NO: 19), exón 9 (SEQ ID NO: 21), un fragmento del exón 9 (SEQ ID NO: 21), exón 10 (SEQ ID NO: 23), un fragmento del exón 10 (SEQ ID NO: 23), exón 11 (SEQ ID NO: 25), y un fragmento del exón 11 (SEQ ID NO: 25).

30 Varias realizaciones se dirigen a vectores de expresión de ARNi de NtHMA que comprenden: una construcción de ARNi de NtHMA que codifica polinucleótidos de ARNi de NtHMA capaces de auto-reasociación para formar una estructura de horquilla, en la que la construcción de ARNi comprende (a) una primera secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos 95%, 96%, 97%, 98% y 99% con la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 47; (b) una segunda secuencia que codifica un elemento espaciador del polinucleótido de ARNi de NtHMA que forma un bucle de la estructura de horquilla; y (c) una tercera secuencia que comprende una secuencia complementaria inversa de la primera secuencia, situada en la misma orientación que la primera secuencia, en donde la segunda secuencia está situada entre la primera secuencia y la tercera secuencia, y la segunda secuencia está operativamente unida a la primera secuencia y a la tercera secuencia.

40 Varias realizaciones se dirigen a vectores de expresión de ARNi de NtHMA que comprenden: una construcción de ARNi de NtHMA que codifica polinucleótidos de ARNi de NtHMA capaces de auto-reasociación para formar una estructura de horquilla, en la que la construcción de ARNi comprende (a) una primera secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos 95%, 96%, 97%, 98% y 99% con la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 47; (b) una segunda secuencia que codifica un elemento espaciador del polinucleótido de ARNi de NtHMA que forma un bucle de la estructura de horquilla; y (c) una tercera secuencia que comprende una secuencia complementaria inversa de la primera secuencia (SEQ ID NO: 46 o SEQ ID NO: 48), colocada en la misma orientación que la primera secuencia, en donde la segunda secuencia está situada entre la primera secuencia y la tercera secuencia, y la segunda secuencia está operativamente unida a la primera secuencia y a la tercera secuencia.

50 Varias realizaciones se dirigen a vectores de expresión de ARNi de NtHMA que comprenden: una construcción de ARNi de NtHMA que comprende una primera secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos 95%, 96%, 97%, 98% y 99% con la SEQ ID NO: 3 o partes de la SEQ ID NO: 3. Varias realizaciones se dirigen a vectores de expresión de ARNi de NtHMA que comprenden una construcción de ARNi de NtHMA que comprende una primera secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos 95%, 96%, 97%, 98% y 99% con la SEQ ID NO: 47 o partes de la SEQ ID NO: 47.

55 Varias realizaciones se dirigen a vectores de expresión de ARNi de NtHMA que comprenden: una construcción de ARNi de NtHMA que comprende una segunda secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos 95%, 96%, 97%, 98% y 99% con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: intrón 1 (SEQ ID NO: 4), un fragmento del intrón 1 (SEQ ID NO: 4), intrón 2 (SEQ ID NO: 6), un fragmento del intrón 2 (SEQ ID NO: 6), intrón 3 (SEQ ID NO: 8), un fragmento del intrón 3 (SEQ ID NO: 8), intrón 4 (SEQ ID NO: 10), un fragmento del intrón 4 (SEQ ID NO: 10), intrón 5 (SEQ ID NO: 12), un fragmento del intrón 5 (SEQ ID NO: 12), intrón 6 (SEQ ID NO: 14), un fragmento del intrón 6 (SEQ ID NO: 14), intrón 7 (SEQ ID NO: 16), un fragmento del intrón 7 (SEQ ID NO: 16), intrón 8 (SEQ ID NO: 18), un fragmento del intrón 8 (SEQ ID NO: 18), intrón 9 (SEQ ID NO: 20), un fragmento del intrón 9 (SEQ ID NO: 20), intrón 10 (SEQ ID NO: 22), un fragmento del intrón 10 (SEQ ID NO: 22), intrón 11 (SEQ ID NO: 24), un fragmento del intrón 11 (SEQ ID NO: 24), intrón 12 (SEQ ID NO: 26), y un fragmento del intrón 12 (SEQ ID NO: 26). Alternativamente, la segunda secuencia de la construcción de ARNi de NtHMA se puede generar de forma aleatoria sin usar una secuencia de intrón derivada del gen de NtHMA (SEQ ID NO: 1).

5 Varias realizaciones se dirigen a vectores de expresión de ARNi de NtHMA que comprenden una construcción de ARNi de NtHMA que comprende una tercera secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos 95%, 96%, 97%, 98% y 99% con la SEQ ID NO: 46 o partes de la SEQ ID NO: 46. Varias realizaciones se dirigen a vectores de expresión de ARNi de NtHMA que comprenden una construcción de ARNi de NtHMA que comprende una tercera secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos 95%, 96%, 97%, 98% y 99% con la SEQ ID NO: 48 o partes de la SEQ ID NO: 48.

10 Varias realizaciones se dirigen a vectores de expresión de ARNi de NtHMA que comprenden una construcción de ARNi de NtHMA que comprende una tercera secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos 95%, 96%, 97%, 98% y 99% con una secuencia complementaria inversa seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 27 (exón 1), un fragmento de la SEQ ID NO: 27 (exón 1), SEQ ID NO: 28 (exón 2), un fragmento de la SEQ ID NO: 28 (exón 2), SEQ ID NO: 29 (exón 3), un fragmento de la SEQ ID NO: 29 (exón 3), SEQ ID NO: 30 (exón 4), un fragmento de la SEQ ID NO: 30 (exón 4), SEQ ID NO: 31 (exón 5), un fragmento de la SEQ ID NO: 31 (exón 5),
 15 SEQ ID NO: 32 (exón 6), un fragmento de la SEQ ID NO: 32 (exón 6), SEQ ID NO: 33 (exón 7), un fragmento de la SEQ ID NO: 33 (exón 7), SEQ ID NO: 34 (exón 8), un fragmento de la SEQ ID NO: 34 (exón 8), SEQ ID NO: 35 (exón 9), un fragmento de la SEQ ID NO: 35 (exón 9), SEQ ID NO: 36 (exón 10), un fragmento de la SEQ ID NO: 36 (exón 10), SEQ ID NO: 37 (exón 11), y un fragmento de la SEQ ID NO: 37 (exón 11).

20 Varias realizaciones se dirigen a vectores de expresión de ARNi de NtHMA que comprenden una construcción de ARNi de NtHMA que comprende: la SEQ ID NO: 38 ("secuencia/fragmento codificante"), la segunda secuencia comprende la SEQ ID NO: 39 ("secuencia/fragmento espaciador") y la tercera secuencia comprende la SEQ ID NO: 40 ("secuencia/fragmento de sentido contrario").

25 Varias realizaciones se dirigen a vectores de expresión de ARNi de NtHMA que comprenden una construcción de ARNi de NtHMA que comprende: la SEQ ID NO: 42 ("secuencia/fragmento codificante"), la segunda secuencia comprende la SEQ ID NO: 43 ("secuencia/fragmento espaciador") y la tercera secuencia comprende la SEQ ID NO: 44 ("secuencia/fragmento de sentido contrario").

30 Alternativamente, las secuencias descritas se pueden usar para construir varios polinucleótidos de NtHMA que no forman estructuras de horquilla. Por ejemplo, se puede formar un ARN bicatenario largo de NtHMA por (1) transcripción de una primera cadena del ADNc de NtHMA por unión operativa a un primer promotor, y (2) transcripción de la secuencia complementaria inversa de la primera cadena del fragmento de ADNc de NtHMA por unión operativa a un segundo promotor. Cada cadena del polinucleótido de NtHMA se puede transcribir desde el mismo vector de expresión o de diferentes vectores de expresión. El dúplex de ARN de NtHMA que tiene actividad de interferencia de ARN se puede convertir enzimáticamente en ARNip para reducir los niveles de ARN de NtHMA.
 35

C. Vectores de expresión para reducir la expresión génica de NtHMA por cosupresión.

40 Se proporcionan varias composiciones y métodos para reducir los niveles de expresión endógenos de miembros de la familia de genes de NtHMA mediante la promoción de la cosupresión de la expresión del gen de NtHMA. El fenómeno de la cosupresión se produce como resultado de introducir múltiples copias de un transgén en una célula de planta hospedante. La integración de múltiples copias de un transgén puede dar como resultado la expresión reducida del transgén y el gen endógeno al que va dirigido. El grado de cosupresión depende del grado de identidad de secuencia entre el transgén y el gen endógeno al que va dirigido. El silenciamiento tanto del gen endógeno como del transgén se puede producir por la metilación extensiva de los locus silenciados (es decir, el promotor endógeno y el gen endógeno de interés) que puede evitar la transcripción. Alternativamente, en algunos casos, la cosupresión del gen endógeno y el transgén se puede producir por silenciamiento génico postranscripcional ("PTGS"), en el que se pueden producir transcritos pero las tasas potenciadas de degradación evitan la acumulación de transcritos. El mecanismo para la cosupresión por PTGS se cree que se parece a la interferencia de ARN, en cuanto que parece que el ARN es tanto un iniciador importante como una diana en estos procesos, y puede ser mediado, al menos en parte, por la misma maquinaria molecular, posiblemente a través de la degradación guiada por ARN de los ARNm.
 50

La cosupresión de miembros de la familia de genes de NtHMA se puede conseguir por integración de múltiples copias del ADNc de NtHMA o fragmentos del mismo, como transgenes, en el genoma de una planta de interés. La planta hospedante se puede transformar con un vector de expresión que comprende un promotor operativamente unido al ADNc de NtHMA o fragmentos del mismo. Varias realizaciones se dirigen a vectores de expresión para promover la cosupresión de genes endógenos de la familia de NtHMA que comprenden: un promotor operativamente unido al ADNc de NtHMA identificado como clon P6663 (SEQ ID NO: 3), o un fragmento del mismo, o ADNc de NtHMA identificado como clon P6643 (SEQ ID NO: 47) o un fragmento del mismo. Varias realizaciones se dirigen a vectores de expresión para promover la cosupresión de genes endógenos de la familia de NtHMA que comprenden: un promotor operativamente unido a ADNc de NtHMA o un fragmento del mismo, que tiene una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 95%, 96%, 97%, 98%, y 99% con la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 47.
 55
 60

65 Varias realizaciones se dirigen a métodos para reducir el nivel de expresión de genes endógenos de la familia de NtHMA integrando múltiples copias de ADNc de NtHMA o un fragmento del mismo en un genoma de planta, que

comprende: transformar una célula de planta hospedante con un vector de expresión que comprende un promotor operativamente unido a la SEQ ID NO: 3 o un fragmento de la misma; o SEQ ID NO: 47 o un fragmento de la misma. Varias realizaciones se dirigen a métodos para reducir el nivel de expresión de genes endógenos de la familia de NtHMA integrando múltiples copias de ADNc de NtHMA o un fragmento del mismo, en el genoma de planta, que comprende: transformar una célula de planta hospedante con un vector de expresión que comprende un promotor operativamente unido a ADNc de NtHMA o un fragmento del mismo, que tiene una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 95%, 96%, 97%, 98% y 99% con la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 47.

D. Vectores de expresión para reducir la expresión génica de NtHMA por inhibición de la traducción mediante agentes de sentido contrario

Se proporcionan varias composiciones y métodos para reducir el nivel de expresión endógeno de la familia de genes de NtHMA por inhibición de la traducción de ARNm de NtHMA. Una célula de planta hospedante se puede transformar con un vector de expresión que comprende: un promotor operativamente unido a ADNc de NtHMA o un fragmento del mismo, situado en una orientación de sentido contrario con respecto al promotor que permite la expresión de polinucleótidos de ARN que tiene una secuencia complementaria con una parte del ARNm de NtHMA. Varios vectores de expresión para inhibir la traducción del ARNm de NtHMA comprenden: un promotor operativamente unido a ADNc de NtHMA identificado como clon P6663 (SEQ ID NO: 3), o un fragmento del mismo; o ADNc de NtHMA identificado como clon P6643 (SEQ ID NO: 47) o un fragmento del mismo, en el que el ADNc de NtHMA o el fragmento del mismo, se sitúa en orientación de sentido contrario con respecto al promotor. Varios vectores de expresión para inhibir la traducción del ARNm de HMA comprenden: un promotor operativamente unido a un ADNc de NtHMA o un fragmento del mismo, que tiene una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 95%, 96%, 97%, 98% y 99% con la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 47, en el que el ADNc de NtHMA o el fragmento del mismo, se sitúa en orientación de sentido contrario con respecto al promotor. Las longitudes de los polinucleótidos de ARN de NtHMA de sentido contrario pueden variar, incluyendo 15-20 nucleótidos, 20-30 nucleótidos, 30-50 nucleótidos, 50-75 nucleótidos, 75-100 nucleótidos, 100-150 nucleótidos, 150-200 nucleótidos, y 200-300 nucleótidos.

Varias realizaciones se dirigen a métodos para reducir el nivel de expresión de genes endógenos de la familia de NtHMA por inhibición de la traducción del ARNm de NtHMA, que comprenden: transformar una célula de planta hospedante con un vector de expresión que comprende un promotor operativamente unido a ADNc de NtHMA identificado como clon P6663 (SEQ ID NO: 3), o un fragmento del mismo; o ADNc de NtHMA identificado como clon P6643 (SEQ ID NO: 47) o un fragmento del mismo, en el que el ADNc de NtHMA o el fragmento del mismo, se sitúa en orientación de sentido contrario con respecto al promotor. Varias realizaciones se dirigen a métodos para reducir el nivel de expresión de genes endógenos de la familia de NtHMA por inhibición de la traducción de ARNm de NtHMA, que comprende: transformar una célula de planta hospedante con un vector de expresión que comprende un promotor operativamente unido a un ADNc de NtHMA o un fragmento del mismo, que tiene una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 95%, 96%, 97%, 98% y 99% con la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 47, en el que el ADNc de NtHMA o el fragmento del mismo, se sitúa en orientación de sentido contrario con respecto al promotor.

E. Otras composiciones y métodos para reducir la expresión del gen de NtHMA

Los expertos en la técnica conocen métodos para obtener variantes conservativas y variantes más divergentes de polinucleótidos y polipéptidos de NtHMA. Cualquier planta de interés se puede modificar genéricamente mediante varios métodos conocidos para inducir mutagénesis, incluyendo mutagénesis dirigida al sitio, mutagénesis dirigida por oligonucleótidos, mutagénesis inducida químicamente, mutagénesis inducida por irradiación, y otros métodos equivalentes. Por ejemplo, la mutagénesis dirigida al sitio se describe en, p. ej., Smith (1985) "In vitro mutagenesis," *Ann. Rev. Genet.* 19:423-462, y referencias en la misma tales como Botstein y Shortle (1985) "Strategies and Applications of in vitro Mutagenesis," *Science* 229:1193-1201; y en Carter (1986) "Site-directed mutagenesis," *Biochem. J.* 237:1-7. La mutagénesis dirigida por oligonucleótido se describe, p. ej., en Zoller y Smith (1982) "Oligonucleotide-directed Mutagenesis using M13-derived Vectors: an Efficient and General Procedure for the Production of Point mutations in any DNA Fragment," *Nucleic Acids Res.* 10:6487-6500. La mutagénesis usando bases modificadas se describe, p. ej., en Kunkel (1985) "Rapid and Efficient Site-specific Mutagenesis without Phenotypic Selection," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492, y en Taylor et al. (1985) "The Rapid Generation of Oligonucleotide-directed Mutations at High Frequency using Phosphorothioate-modified DNA," *Nucl. Acids Res.* 13: 8765-8787. La mutagénesis usando ADN dúplex discontinuo se describe, p. ej., en Kramer et al. (1984) "The Gapped Duplex DNA Approach to Oligonucleotide-directed Mutation Construction," *Nucl. Acids Res.* 12: 9441-9460. La mutagénesis de apareamiento erróneo puntual se describe, p. ej., en Kramer et al. (1984) "Point Mismatch Repair," *Cell* 38:879-887. La mutagénesis por rotura de doble cadena se describe, p. ej., en Mandecki (1986) "Oligonucleotide-directed Double-strand Break Repair in Plasmids of Escherichia coli: A Method for Site-specific Mutagenesis," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:7177-7181, y en Arnold (1993) "Protein Engineering for Unusual Environments," *Current Opinion in Biotechnology* 4:450-455. La mutagénesis usando cepas del hospedante deficientes en reparación se describe, p. ej., en Carter et al. (1985) "Improved Oligonucleotide Site-directed Mutagenesis using M13 Vectors," *Nucl. Acids Res.* 13: 4431-4443. La mutagénesis por síntesis génica total se describe, p. ej., en Nambiar et al. (1984) "Total Synthesis and Cloning of a Gene Coding for the Ribonuclease S Protein", *Science* 223: 1299-1301. El barajado de ADN se describe, p. ej., en Stemmer (1994) "Rapid Evolution of a Protein in vitro by DNA Shuffling," *Nature* 370:389-391, y en Stemmer (1994) "DNA shuffling by random

fragmentation and reassembly: In Vitro Recombination for Molecular Evolution," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10747-10751.

Alternativamente, los genes de NtHMA pueden ser dirigidos para la inactivación mediante introducción de transposones (y elementos IS) en los genomas de plantas de interés. Estos elementos genéticos móviles se pueden introducir por fertilización cruzada sexual y se pueden cribar los mutantes de inserción por la pérdida de actividad de NtHMA, tal como el transporte reducido de Cd. El gen de NtHMA alterado en una planta original se puede introducir en otras plantas mediante cruzamiento de la planta original con plantas no sometidas a mutagénesis inducida por transposones, p. ej., por fertilización cruzada sexual. Se puede usar cualquier técnica de reproducción conocida por los expertos en la técnica. En una realización, se pueden inactivar uno o más genes relacionados con NtHMA por inserción de uno o más transposones. Las mutaciones pueden dar como resultado la alteración homocigótica de uno o más genes de NtHMA, la alteración heterocigótica de uno o más genes de NtHMA, o una combinación de alteraciones tanto homocigóticas como heterocigóticas si se altera más de un gen de NtHMA. Los elementos transponibles adecuados se pueden seleccionar de dos amplias clases, designadas como clase I y clase II. Los elementos transponibles de clase I adecuados incluyen retrotransposones, retroposones y elementos similares a SINE. Dichos métodos son conocidos por los expertos en la técnica, como se describen en Kumar y Bennetzen (1999), *Plant Retrotransposons in Annual Review of Genetics* 33:479.

Alternativamente, los genes de NtHMA pueden ser dirigidos para la inactivación por un método denominado lesiones locales dirigidas inducidas en el genoma ("TILLING"), que combina mutaciones puntuales de alta densidad con detección sensible rápida de mutaciones. Típicamente, las semillas de plantas se exponen a mutágenos, tales como metanosulfonato de etilo (EMS) o alquilatos de EMS guanina, que típicamente conduce al apareamiento erróneo. Los agentes y métodos adecuados son conocidos para los expertos en la técnica como describen McCallum et al., (2000), "Targeting Induced Local Lesions IN Genomics (TILLING) for Plant Functional Genomics", *Plant Physiology* 123:439-442; McCallum et al., (2000) "Targeted screening for induced mutations", *Nature Biotechnology* 18:455-457; y Colbert et al., (2001) "High-Throughput Screening for Induced Point Mutations", *Plant Physiology* 126:480-484.

Alternativamente, los genes de NtHMA pueden ser dirigidos para la inactivación por introducción de ribozimas derivados de una serie de ARN circulares pequeños que son capaces de autoescisión y replicación en plantas. Estos ARN se pueden replicar solos (ARN viroides) o con un virus auxiliar (ARN satélite). Los ejemplos de ARN adecuados incluyen los derivados del viroide del aguacate sunblotch y ARN satélites derivados del virus de la mancha anular del tabaco, virus del rayado transitorio de la alfalfa, virus del moteado de terciopelo del tabaco, virus del moteado de solanum nodiflorum, virus del moteado del trébol subterráneo. Los expertos en la técnica conocen varios ribozimas específicos de ARN diana como se describe en Haseloff et al. (1988) *Nature*, 334:585-591.

III. Plantas transgénicas, líneas celulares y semillas que comprenden polinucleótidos de ARNi de NtHMA y métodos relacionados

Varias realizaciones se dirigen a plantas transgénicas genéticamente modificadas para reducir el nivel de expresión del gen de NtHMA por varios métodos que se pueden usar para el silenciamiento de la expresión del gen de NtHMA, y de esta forma, producir plantas transgénicas en las que el nivel de expresión de los transportadores NtHMA se puede reducir dentro del tejido de la planta de interés. Se pueden alterar las tasas de transporte de metales pesados y patrones de distribución de transporte de metales pesados, en particular, transporte de cadmio, en plantas transgénicas producidas de acuerdo con los métodos y composiciones descritos. Las plantas adecuadas para modificación genética incluyen monocotiledóneas y dicotiledóneas.

Varias realizaciones se dirigen a plantas transgénicas del tabaco genéticamente modificadas para reducir la expresión génica de NtHMA por varios métodos, conocidos para los expertos en la técnica, que se pueden usar para la regulación por disminución de la expresión génica de NtHMA, y por lo tanto, producir plantas de tabaco transgénicas en las que el nivel de expresión de los transportadores NtHMA se puede reducir dentro de los tejidos de la planta de interés. Se han proporcionado varios vectores de expresión para producir líneas transgénicas de tabaco de cualquier variedad, que presentan niveles reducidos de expresión génica de NtHMA. Las composiciones y métodos descritos se pueden aplicar a cualquier especie de planta de interés, incluyendo plantas del género *Nicotiana*, varias especies de *Nicotiana*, incluyendo *N. rustica* y *N. tabacum* (p. ej., LA B21, LN KY171, TI 1406, Basma, Galpao, Perique, Beinhart 1000-1, y Petic). Otras especies incluyen *N. acaulis*, *N. acuminata*, *N. acuminata* var. *multiflora*, *N. africana*, *N. alata*, *N. amplexicaulis*, *N. arentsii*, *N. attenuata*, *N. benavidesii*, *N. benthamiana*, *N. bigelovii*, *N. bonariensis*, *N. cavicola*, *N. clevelandii*, *N. cordifolia*, *N. corymbosa*, *N. debneyi*, *N. excelsior*, *N. forgetiana*, *N. fragrans*, *N. glauca*, *N. glutinosa*, *N. goodspeedii*, *N. gossei*, *N. hybrid*, *N. ingulba*, *N. kawakamii*, *N. knightiana*, *N. langsdorffii*, *N. linearis*, *N. longiflora*, *N. maritima*, *N. megalosiphon*, *N. miersii*, *N. noctiflora*, *N. nudicaulis*, *N. obtusifolia*, *N. occidentalis*, *N. occidentalis* subsp. *hesperis*, *N. otophora*, *N. paniculata*, *N. pauciflora*, *N. petunioides*, *N. plumbaginifolia*, *N. quadrivalvis*, *N. raimondii*, *N. repanda*, *N. rosulata*, *N. rosulata* subsp. *ingulba*, *N. rotundifolia*, *N. setchellii*, *N. simulans*, *N. solanifolia*, *N. spegazzinii*, *N. stocktonii*, *N. suaveolens*, *N. sylvestris*, *N. thyrsoiflora*, *N. tomentosa*, *N. tomentosiformis*, *N. trigonophylla*, *N. umbratica*, *N. undulafa*, *N. velutina*, *N. wigandoides*, y *N. x sanderae*. Las plantas adecuadas para la transformación incluyen cualquier tejido de planta capaz de transformación por diferentes métodos de transformación de plantas conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo electroporación, bombardeo con microproyectiles, una transferencia mediada por *Agrobacterium* como se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n.º 4.459.355 que describe un método para la

transformación de plantas susceptibles, incluyendo dicotiledóneas, con una cepa de *Agrobacterium* que contiene un plásmido Ti; patente de EE.UU. n° 4.795.855 que describe la transformación de plantas leñosas con un vector de *Agrobacterium*; patente de EE.UU. n° 4.940.838 que describe un vector de *Agrobacterium* binario; patente de EE.UU. n° 4.945.050; y patente de EE.UU. n° 5.015.580.

5 Varias realizaciones se dirigen a plantas de tabaco transgénicas genéticamente modificadas para expresar de forma exógena una construcción de ARNi que codifica polinucleótidos de ARNi de NtHMA que facilitan la degradación de transcritos de ARN de NtHMA, y por consiguiente, que reducen el número de transcritos de ARN disponibles para la traducción en transportadores NtHMA. Los ejemplos de referencia se dirigen a plantas transgénicas que comprenden un vector de expresión que permite la expresión de polinucleótidos de NtHMA producidos según los métodos descritos. Los ejemplos de referencia se dirigen a líneas celulares derivadas de plantas transgénicas producidas según los métodos descritos. Los ejemplos de referencia se dirigen a semillas transgénicas derivadas de plantas transgénicas producidas según los métodos descritos.

15 Varias realizaciones se dirigen a métodos para reducir los niveles de expresión génica de NtHMA en plantas, comprendiendo el método reducir el nivel de expresión de un gen de NtHMA, lo cual se puede llevar a cabo por varios métodos conocidos por los expertos en la técnica. Como ejemplos, esta descripción describe: (1) método de interferencia de ARN para reducir el nivel en equilibrio de variantes de ARN de NtHMA endógenas disponibles para la traducción por expresión de polinucleótidos de ARNi de NtHMA; (2) método de cosupresión para reducir la transcripción del gen o genes de NtHMA por integración de múltiples copias del ADNc de NtHMA o fragmentos del mismo, como transgenes, en un genoma de planta; (3) método de sentido contrario para reducir la traducción de NtHMA por la expresión de polinucleótidos de sentido contrario que se pueden dirigir al ARN de NtHMA; y (4) varios métodos para la inducción de mutagénesis.

25 Varias realizaciones se dirigen a plantas de tabaco transgénicas genéticamente modificadas para reducir el nivel de expresión génica de NtHMA por varios métodos, conocidos por los expertos en la técnica, y modificadas además para reducir la expresión de un segundo gen endógeno de interés (es decir, no relacionado con NtHMA) o para potenciar la expresión de un gen exógeno de interés (es decir, no relacionado con NtHMA). Por ejemplo, puede ser conveniente la regulación por disminución de un segundo gen endógeno de interés que codifica una enzima implicada en la biosíntesis de alcaloides. En otras situaciones, puede ser conveniente la potenciación en el nivel de expresión de un transgén que codifica una proteína de interés, tal como una hormona humana para uso terapéutico. Los expertos en la técnica son capaces de producir diferentes plantas transgénicas que se pueden modificar, por ejemplo, para que expresen de forma exógena polinucleótidos de ARNi de NtHMA y al menos un producto génico recombinante de interés, tal como un factor de crecimiento humano recombinante o polinucleótidos de ARNi que se dirigen a un segundo gen de interés no relacionado con la familia de NtHMA.

35 La producción de plantas transgénicas según los métodos descritos proporciona una serie de ventajas. Las plantas transgénicas, incluyendo plantas del tabaco transgénicas, se pueden cultivar en suelos que contienen concentraciones de Cd variables, o en suelos que contienen concentraciones de Cd menores de las deseables. Estas plantas transgénicas y semillas derivadas pueden proporcionar más opciones para cultivarlas en una variedad más amplia de entornos de suelo, lo que pueden aumentar la cantidad de suelos cultivables disponibles por el profesional (p. ej. agricultor). Además, estas plantas transgénicas, que presentan un contenido reducido de Cd, comparado con los homólogos no transgénicos, se pueden consumir directamente como productos comestibles. El consumo de partes comestibles de estas plantas transgénicas puede ser una opción más saludable comparado con el consumo de los homólogos no transgénicos. Las plantas adecuadas que pueden ser genéticamente modificadas según los métodos descritos, incluyen plantas cultivables para uso agrícola, incluyendo arroz, maíz, calabaza, soja, lechuga, patatas, remolachas, hierbas, trigo, cebada, zanahorias, etc. El % de reducción de Cd en estas plantas transgénicas, incluyendo la parte de la lámina foliar, puede ser aproximadamente al menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99%, cuando se compara con homólogos no transgénicos. El contenido de Cd de estas plantas transgénicas, incluyendo la parte de lámina foliar, es un valor en el intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,05 ppm, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,1 ppm, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,5 ppm, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 1,0 ppm, and de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5 ppm.

55 IV. Productos consumibles que incorporan hojas de tabaco genéticamente modificadas para contener un contenido reducido de Cd

Varias realizaciones proporcionan plantas transgénicas, en las que el nivel de expresión de miembros de la familia de genes de NtHMA está sustancialmente reducido para reducir o impedir el transporte de Cd en la lámina foliar. La lámina foliar derivada de plantas de tabaco transgénicas, producidas según los métodos descritos, se puede incorporar en varios productos consumibles que contienen Cd en un nivel sustancialmente inferior al de productos consumibles hechos incorporando hojas de tabaco derivadas de plantas del mismo genotipo que se cultivaron en condiciones idénticas, pero no modificadas genéticamente con respecto al nivel de expresión reducido de miembros de la familia de genes de NtHMA ("homólogos no transgénicos").

65 En algunas realizaciones, estas plantas transgénicas que presentan contenido de Cd reducido comparado con homólogos no transgénicos, se pueden incorporar en productos consumibles, incluyendo diferentes artículos

fumables, tales como cigarros, cigarrillos y productos de tabaco sin humo (es decir, no combustible). Los artículos fumables y productos de tabaco sin humo, producidos incorporando hojas de tabaco derivadas de plantas de tabaco genéticamente modificadas para contener niveles de Cd reducidos según los métodos descritos, pueden proporcionar opciones más saludables comparados con los homólogos no transgénicos.

Los productos de tabaco sin humo que incorporan plantas de tabaco genéticamente modificadas según los métodos descritos se pueden fabricar en cualquier formato adecuado para la comodidad en una cavidad oral del consumidor. Los productos de tabaco sin humo contienen tabaco en cualquier forma, incluyendo como partículas secas, trozos, gránulos, polvos o una suspensión (es decir, extracto de tabaco), depositado sobre, mezclado en, rodeado por, o combinado de otra forma, con otros ingredientes en cualquier formato, tales como escamas, películas, tiras, espumas o perlas. Los productos de tabaco sin humo pueden estar envueltos con un material, que puede ser comestible (es decir, disgregables por vía oral) o no comestibles. El contenido de líquido de los productos de tabaco sin humo puede estar encerrado en una forma tal como perlas, para evitar la interacción con una envoltura soluble en agua. La envoltura puede tener forma como una bolsa para encerrar parcial o completamente las composiciones que incorporan tabaco, o para funcionar como un adhesivo para mantener juntos una pluralidad de tiras, perlas o escamas de tabaco. Una envoltura también puede encerrar una composición de tabaco moldeable que se acomoda a la forma de la boca de un consumidor. Una envoltura disgregable por vía oral puede encerrar tabaco sin humo, p. ej., como tabaco seco o tabaco soluble, y se puede formar en un equipo de termoconformado continuo o de conformado/llenado/sellado horizontal u otro equipamiento de envasado adecuado, usando películas comestibles (que pueden contener o no tabaco). Los materiales de ejemplo para construir una envoltura incluyen composiciones en película que comprenden HPMC, CMC, pectina, alginatos, pululano y otros polímeros formadores de película comestibles, comercialmente viables. Otros materiales de envoltorio pueden incluir cápsulas preformadas producidas de gelatina, HPMC, almidón/carragenano, u otros materiales disponibles en el comercio. Dichos materiales de envoltorio pueden incluir tabaco como ingrediente. Los envoltorios que no son disgregables por vía oral pueden estar compuestos de tejidos o telas no tejidas, de papel revestido o no revestido, o de películas de plástico perforadas o porosas de otra forma. Los envoltorios pueden incorporar agentes de sabor y/o color. Los productos sin humo se pueden montar junto con un envoltorio usando cualquier método conocido para expertos en la técnica del envasado comercial, incluyendo métodos tales como envasado blíster y envasado en barras, en los que se puede formar un pequeño envase mediante una máquina de envasado de conformación/llenado/sellado vertical.

El % de reducción de Cd en estos artículos fumables y productos sin humo, producidos incorporando hojas de tabaco derivadas de plantas de tabaco genéticamente modificadas para contener niveles de Cd reducidos, es un valor de al menos aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% y 100%, cuando se compara con productos consumibles derivados de homólogos no transgénicos. En algunas realizaciones, el contenido de Cd de estos artículos fumables y productos sin humo, producidos incorporando hojas de tabaco derivadas de plantas de tabaco genéticamente modificadas para contener niveles de Cd reducidos, es un valor en un intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,05 ppm, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,1 ppm, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,5 ppm, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 1,0 ppm, and de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5 ppm.

El grado de acumulación de Cd en plantas puede ser sustancialmente variable dependiendo de varios parámetros atribuidos a la complejidad del genotipo y el entorno de crecimiento. Por ejemplo, las concentraciones de Cd en hojas de tabaco cultivadas en el campo pueden ser extremadamente variable dependiendo de factores tales como la agroclimatología, parámetros del suelo y variedad cultivada. Además, los patrones de distribución de Cd relativos dentro de diferentes partes de una planta de tabaco pueden variar según la especie, el órgano/tejido y condiciones de cultivo (es decir, cultivado en el campo frente a cultivo hidropónico). Como promedio, las concentraciones de Cd medidas en hojas de tabaco (incluyendo nervio medio y venas) cultivadas en el campo, puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,5 a 5 ppm (partes por millón, o ug/g de peso seco de hojas de tabaco). Sin embargo, muchos niveles de Cd publicados típicamente no definen el estado de madurez del tabaco, la variedad del tabaco, o las partes de la hoja particulares (es decir, posición del tallo de retirada de la hoja) recogida para el análisis. En algunas variedades, las hojas inferiores pueden acumular niveles de Cd mayores que las hojas medias o superiores. A nivel intracelular, el Cd se puede encontrar en diferentes componentes celulares de una célula vegetal, incluyendo la pared celular, citoplasma, cloroplasto, núcleo y vacuolas.

Además, el contenido de Cd medido en las hojas de tabaco puede variar sustancialmente dependiendo de los niveles de Cd en el entorno del suelo donde se cultivan las plantas de tabaco. Las hojas de tabaco cultivadas en áreas contaminadas con Cd pueden acumular Cd desde aproximadamente 35 ppm o mayor, comparado con las hojas de homólogos genéticamente idénticos cultivados en áreas no contaminadas, que pueden acumular Cd en un intervalo de aproximadamente 0,4 a aproximadamente 8 ppm. Las vacuolas dentro de las hojas de las plantas cultivadas en áreas contaminadas con Cd pueden acumular concentraciones muy altas de Cd. Los expertos en la técnica conocen métodos para modificar las composiciones descritas para que sean adecuadas para una especie dada de planta de interés.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

Clonación y cartografía de exones de un clon genómico de NtHMA de *Nicotiana* de longitud entera

5 Se identificaron independientemente dos clones genómicos parciales que representaban diferentes partes de un gen de NtHMA endógeno, denominados "CHO_OF96xf01.ab1" y "CHO_OF261xo09c1.ab1." Basándose en la información de secuencia obtenida de los clones genómicos parciales, posteriormente se identificaron un clon genómico de longitud entera (_HO-18-2) y 4 ADNc de NtHMA de longitud entera, que incluían el clon P6663 (SEQ ID NO: 3) y el clon P6643 (SEQ ID NO: 47). Se cartografiaron las regiones de exones e intrones del clon genómico de longitud entera (_HO-18-2) (17.921 pb). Como se muestra en la figura 1, el gen de NtHMA endógeno de longitud entera clonado a partir de *Nicotiana* comprende 11 exones que consisten en 3392 nucleótidos en total.

EJEMPLO 2

15 Construcción del vector de expresión de ARNi de NtHMA PBI121-NtHMA (660-915) que codifica polinucleótidos de ARNi

La tabla 1 proporciona una lista de posiciones de nucleótidos cartografiadas de cada exón en el clon genómico de NtHMA (SEQ ID NO: 1).

Tabla 1

Exón	Nucleótidos	Posición
Exón 1	1-303	724-1026
Exón 2	304-561	3245-3502
Exón 3	562-659	7364-7461
Exón 4	660-915	11525-11780
Exón 5	916-1056	11866-12007
Exón 6	1057-1381	12317-12644
Exón 7	1382-1584	13108-13310
Exón 8	1585-1787	13456-13658
Exón 9	1788-3285	14278-15775
Exón 10	3286-3618	16097-16429
Exón 11	3619-4392	16650-17423

25 El clon genómico parcial CHO_OF96xf01.ab1 incluye una parte del intrón 4, exón 4, intrón 5, exón 5, intrón 6, y una parte del exón 6, como se muestra en la figura 1 y está listado en la tabla 1. El clon genómico parcial CHO_OF261xo09c1 incluye una parte del intrón 7, exón 7, intrón 8, exón 8, e incluye una parte del exón 9, como se muestra en la figura 1. Para producir plantas transgénicas que puedan producir establemente polinucleótidos de ARNi de NtHMA de interés que puedan facilitar la degradación de transcritos de ARN endógenos que codifican polipéptidos de NtHMA, dos conjuntos de vectores de expresión de ARNi de NtHMA, el vector de expresión de ARNi PBI121-NtHMA (660-915) como se describe con más detalle más adelante, y el vector de expresión de ARNi PBI121-NtHMA (1382-1584) como se describe con más detalle en el ejemplo 3.

35 La figura 2 ilustra una estrategia de subclonación de ejemplo para construir un vector de expresión de ARNi de NtHMA que permite la expresión constitutiva de polinucleótidos de ARNi de NtHMA de interés. Basándose en la cartografía de exones y análisis de secuencia del clon genómico CHO_OF96xf01.ab1, se diseñaron construcciones de ARNi.

40 La figura 3A muestra una secuencia de ARNi de ejemplo, NtHMA (660-915), para producir polinucleótidos de ARNi de NtHMA de interés. En la figura 3A, la construcción de ARNi de ARNi de NtHMA (SEQ ID NO: 41) comprende un fragmento codificante (272 pb) (SEQ ID NO: 38) compuesto del exón 4 (272 pb), que está situado en la dirección 5' y operativamente unido a un fragmento espaciador (80 pb) (SEQ ID NO: 39) compuesto del intrón 5, que está situado en la dirección 5' y operativamente unido a un fragmento complementario inverso (272 pb) (SEQ ID NO: 40) compuesto del exón 4 situado en una orientación de sentido contrario. Las construcciones de ARNi que codifican polinucleótidos de ARNi de NtHMA de interés se insertaron en el vector de clonación PBKCMV, y se situaron en la dirección 3' y operativamente unidos a un promotor de citomegalovirus (CMV). Se incorporaron sitios *XbaI* y *HindIII* en los extremos 5' y 3' del fragmento codificante de NtHMA de 352 pb, que incluía el fragmento de intrón de 80 pb usando cebadores de PCR modificados para incorporar estos sitios de enzimas de restricción (PMG783F: ATTCTAGACTGCTGCTATGTCATCACTGG [SEQ ID NO: 50] y PMG783R: ATAAGCTTAGCCTGAAGAATTGAGCAA [SEQ ID NO: 51]). Igualmente, se incorporaron sitios *SpeI* y *SacI* en los extremos 5' y 3' del correspondiente fragmento complementario inverso de NtHMA usando cebadores de PCR (PMG 785F: ATGAGCTCTGGTTATGTAGGCTACTGCTGCT [SEQ ID NO: 52] y PMG 786R: ATACTAGTATTTGTAGTGCCAGCCCAGA [SEQ ID NO: 53]) para producir el plásmido de ARNi PBKCMV-NtHMA. Los vectores de expresión de ARNi PBI121-NtHMA se construyeron mediante (a) escisión del ORF de β -glucuronidasa del vector de expresión binario ("pBI121" de CLONTECH), y (b) sustitución con la construcción de ARNi de NtHMA, escindida del plásmido de ARNi PBKCMV-NtHMA, en sitios *XbaI/SacI* del plásmido PBI121 en

lugar del ORF de β -glucuronidasa eliminado. Los vectores de expresión de ARNi PBI121-NtHMA comprenden: (i) fragmento codificante de 352 pb *XbaI-HindIII* NtHMA que incluye (ii) fragmento de intrón de 80 pb, operativamente unido al (iii) fragmento complementario inverso de 272 pb *SpeII-SacI* NtHMA.

5 EJEMPLO 3

Construcción del vector de expresión de ARNi de NtHMA PBI121-NtHMA (1382-1584) que codifica polipéptidos de ARNi

La figura 4A muestra una secuencia de ARNi de ejemplo, NtHMA (1382-1584), para producir polinucleótidos de ARNi de NtHMA de interés. Basándose en la cartografía de exones y análisis de secuencia del clon genómico CHO_OF261x09c1, se diseñó una construcción de ARNi (SEQ ID NO: 41) que incluye un fragmento codificante (191 pb) (SEQ ID NO: 42) que comprende secuencias del exón 7, que está situado en la dirección 5' y operativamente unido a un fragmento de ADN espaciador (139 pb) (SEQ ID NO: 43) que comprende secuencias del intrón 8, que está situado en la dirección 5' y operativamente unido a un fragmento complementario inverso (196 pb) (SEQ ID NO: 44) que comprende secuencias del exón 7 situado en una orientación de sentido contrario. Estas construcciones de ARNi que codifican polinucleótidos de ARNi de NtHMA de interés se insertaron en el vector de clonación PBKCMV, y se situaron en la dirección 3' y operativamente unidos a un promotor de citomegalovirus (CMV). Se incorporaron sitios *XbaI* y *HindIII* en los extremos 5' y 3' del fragmento codificante de 330 pb de NtHMA, que incluía el fragmento de intrón de 139 pb usando cebadores de la PCR modificados para incorporar estos sitios de enzimas de restricción (PMG754F: ATTCTAGATGAGAGCAAGTCAGGTCATCC [SEQ ID NO: 54] y PMG754R: ATAAGCTTTTCAAACATCCACCGCATTA [SEQ ID NO: 55]). Igualmente, se incorporaron los sitios *PstI* y *SacI* en los extremos 5' y 3' del correspondiente fragmento complementario inverso de NtHMA usando los cebadores de PCR, PMG757F: ATGAGCTCGCATTGAGAGCAAGTCAGGTC [SEQ ID NO: 56] y PMG757R: ATCTGCAGCCTGTGGTACATCCAGCTCTT [SEQ ID NO: 57]) para producir el vector de expresión de ARNi PBKCMV-NtHMA.

Los vectores de expresión de ARNi PBI121-NtHMA se construyeron mediante (a) escisión del ORF de β -glucuronidasa del vector de expresión binario ("pBI121" de CLONTECH), y (b) sustitución con la construcción de ARNi de NtHMA, escindida del plásmido de ARNi PBKCMV-NtHMA, en sitios *XbaI/SacI* del plásmido PBI121 en lugar del ORF de β -glucuronidasa eliminado. Los vectores de expresión de ARNi PBI121-NtHMA comprenden: (i) fragmento codificante de 330 pb *XbaI-HindIII* de NtHMA que incluye (ii) el fragmento de intrón de 139 pb, operativamente unido al (iii) fragmento complementario inverso de 169 pb *SpeII-SacI* de NtHMA. Los vectores de expresión de ARNi PBI121-NtHMA, tales como los descritos en los ejemplos 2 y 3, se pueden introducir en cualquier célula de planta hospedante de interés por varios métodos conocidos por los expertos en la técnica.

35 EJEMPLO 4

Transformación de las variedades de tabaco of Burley (TN90), curado al humo (K326) y negro (VA359) con vectores de expresión de ARNi de NtHMA

Semillas de tabaco de 3 variedades diferentes, Burley (TN90), curado al humo (K326) y negro (VA359), se esterilizaron y germinaron en una placa petri que contenía medio basal MS complementado con mezcla conservante de planta 5 ml/l (PPM). Los plántones, aproximadamente a los 7 a 10 días después de germinación, se seleccionaron para la transformación con varios vectores de expresión de ARNi de NtHMA. Se inoculó una sola colonia de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 en un medio LB líquido que contenía kanamicina 50 mg.l⁻¹ (monosulfato de kanamicina), y se incubaron durante 48 h a 28°C con agitación recíproca (150 ciclos.min⁻¹). Las células bacterianas cultivadas se recogieron por centrifugación (6000xg, 10 min) y se suspendieron hasta una densidad final DO₆₀₀ de 0,4-0,7, con 20 ml de medio MS líquido que contenía sacarosa 20 g⁻¹. El día 7-10 los explantes de plántones se sumergieron en una suspensión bacteriana durante 5 min y se transfirieron a papeles de filtro estéril. Se pusieron 50 explantes sobre partes alícuotas de 40 ml de medio agar REG (medio basal MS complementado con NAA 0,1 mg.l⁻¹ y BAP 1 mg.l⁻¹) en placas petri de 10 mm x 20 mm. Los explantes se cocultivaron con *Agrobacterium* a 25°C. Después de 3 días de cocultivo, los explantes se lavaron y se transfirieron a medio RCPK (medio REG con kanamicina 100 mg.l⁻¹, carbenicilina 500 mg.l⁻¹ y 5 ml de PPM) para seleccionar los transformantes. Los explantes se subcultivaron cada 2 semanas. Después de 8-12 semanas de crecimiento en condiciones selectivas, las plantas que sobrevivieron, que representaban los transformantes que han integrado las construcciones de expresión de ARNi de NtHMA en sus genomas, se transfirieron a medio de enraizamiento (medio basal MS complementado con kanamicina 100 mg.l⁻¹). Las plantas enraizadas se transfirieron a macetas para promover el crecimiento posterior.

EJEMPLO 5

Reducción de Cd en la lámina foliar de la primera generación de transgénicos genéticamente modificados para expresar polinucleótidos de ARNi de NtHMA

Para determinar el efecto de la expresión de polinucleótidos de ARNi de NtHMA en el transporte de Cd desde la raíz a las partes aéreas de las plantas transgénicas, se determinaron los niveles de Cd para varias líneas transgénicas que se habían modificado genéticamente para expresar los polinucleótidos de ARNi NtHMA (660-915) o (1382-1584).

Se transformaron aproximadamente 40 plantas transgénicas independientes, que representaban tres variedades de tabaco, con vectores de expresión de ARNi PBI121-NtHMA. Inicialmente, los transformantes se cultivaron en

bandejas que flotan que contenían medio Hoagland durante 4 semanas. Las plantas positivas por PCR para NPTII se seleccionaron y se pusieron en macetas de 25,4 cm (10") con un sistema hidropónico que contenía medio Hoagland que contenía CdCl₂ 5 µM. Después de 4-8 semanas, se recogieron dos muestras de hojas centrales y se liofilizaron para el análisis de metales o se congelaron en nitrógeno líquido para el análisis de la expresión génica.

5 Se pesaron aproximadamente 500 mg de tabaco y se digirieron en 10 ml de HNO₃ concentrado por sistema de digestión 5 por sistema de reacción acelerado por microondas (CEM corporation, Mathews, NC). Las concentraciones de metales pesados se analizaron usando espectrofotometría de masas de emisión de plasma acoplado inductivamente ("ICP-MS," Agilent 7500A; Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Como control de tabaco no transgénico, se preparó una muestra certificada que consistía en hojas de tabaco de Virginia, CTA-VTL-2, en

10 condiciones comparables (Dybczynski et al., 1997).

Las figuras 3B-3D muestran la reducción de Cd en la lámina foliar de múltiples líneas transgénicas de primera generación (T0), que representan tres variedades, que se han modificado genéticamente para expresar los polinucleótidos de ARNi de NtHMA (660-915). En cada gráfica las unidades del eje y son µg/mg de tejido.

15

Las figuras 4B-4D muestran la reducción de Cd en la lámina foliar de múltiples líneas transgénicas de primera generación (T0), que representan tres variedades, que se han modificado genéticamente para expresar los polinucleótidos de ARNi de NtHMA (1382-1584). En cada gráfica las unidades del eje y son µg/mg de tejido.

20 EJEMPLO 6

Reducción en transcritos de ARN de NtHMA en hojas de tabaco transgénico por la expresión de polinucleótidos de ARNi de NtHMA

Para determinar el efecto de la expresión de polinucleótidos de ARNi de NtHMA en los niveles en estado estacionario de transcritos de ARN de NtHMA endógenos, se midió el cambio relativo de transcritos de ARN de NtHMA aislando el ARN celular total de partes de la lámina foliar de varias líneas transgénicas, que representan tres variedades de tabaco.

25

El ARN total se aisló de hojas centrales de plantas T0 usando el reactivo TRI® (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Para eliminar las impurezas de ADN, el ARN purificado se trató con DNasa exenta de RNasa (TURBO DNA-free, Ambion, Austin TX). Para sintetizar la primera cadena de ADNc, se llevó a cabo la transcripción inversa de aproximadamente 10 µg de ARN total usando el kit High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Para medir el nivel de transcritos de NtHMA en las muestras, se llevó a cabo una RT-PCR de 2 etapas cuantitativa de acuerdo con la técnica química basada en la sonda de Taqman MGB. La mezcla de RT contenía mezcla de dNTP 4 mM, 1X cebadores aleatorios, 1X tampón de RT, 10 g de ADNc, 50 U de transcriptasa inversa Multiscribe (Applied Biosystems), 2 U de inhibidor de RNasa Superase-In (Ambion), y agua exenta de nucleasa. La mezcla de PCR contenía 1X mezcla Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), cebador directo 400 nM, cebador inverso 400 nM, sonda Taqman MGB 250 nM, 2 ng de ADNc, y agua exenta de nucleasas. La RT-PCR se llevó a cabo usando un sistema ABI 7500 Real-Time System (Applied Biosystems, Foster City, CA) y en las condiciones de amplificación: 50°C durante 2 min; 95°C durante 10 min; 40 ciclos de 95°C durante 15 s; y 60°C

30

35

40

45

durante 1 min. Para normalizar los niveles de transcritos de ARN de NtHMA medidos, se seleccionó la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) como un control de transcrito de ARN endógeno, cuyo nivel de expresión no es sensible a la actividad de interferencia del ARN específico de secuencia de los polinucleótidos de ARNi de NtHMA que se analizan. El número de veces de cambio del nivel de transcritos de ARN de NtHMA causado por la expresión del polinucleótidos de ARNi de NtHMA se calculó determinando la relación de (a)/(b), en la que (a) representa el valor normalizado del nivel de transcritos de ARN de NtHMA determinado para muestras derivadas de plantas transgénicas con un vector de expresión de ARNi de NtHMA, y (b) representa el valor normalizado del nivel de transcrito de ARN de NtHMA determinado para muestras derivadas de plantas transgénicas transformadas con un vector de expresión de control deficiente en la construcción de ARNi de ARNi de NtHMA.

Las figuras 5A-C muestran los niveles de transcritos de ARN de NtHMA normalizados en diferentes líneas transgénicas de primera generación (T0) que se han modificado genéticamente para expresar polinucleótidos de ARNi de NtHMA de interés, determinado por análisis de PCR cuantitativo en tiempo real de extractos de lámina foliar. La figura 5A muestra que para múltiples líneas transgénicas de K326 derivadas de forma independiente, los niveles de transcritos de ARN se redujeron mediante la actividad de interferencia de ARN de los polinucleótidos de ARNi de NtHMA (660-915). La figura 5B muestra que para múltiples líneas transgénicas de TN90 derivadas de forma independiente los niveles de transcritos de ARN se redujeron mediante la actividad de interferencia de ARN de los polinucleótidos de ARNi de NtHMA (660-915). La figura 5C muestra que para múltiples líneas transgénicas de VA359 derivadas de forma independiente, los niveles de transcritos de ARN se redujeron mediante la actividad de interferencia de ARN de los polinucleótidos de ARNi de NtHMA (660-915). La reducción del nivel de transcritos de ARN de NtHMA está de acuerdo con la reducción del contenido de Cd medido en las hojas centrales para las mismas líneas transgénicas ensayadas. "PBI121" representa un vector de expresión deficiente en la construcción de ARNi que codifica polinucleótidos de ARNi de NtHMA (660-915).

50

55

60

EJEMPLO 7

Distribución de Cd y Zn en líneas transgénicas genéticamente modificadas para expresar los polinucleótidos de ARNi de NtHMA

65

Para determinar el efecto de la expresión de los polinucleótidos de ARNi de NtHMA (660-915) en la distribución de Cd y Zn en la lámina foliar y la raíz, se analizó el contenido de metales de las plantas transgénicas de tres variedades. Se seleccionaron 5 líneas transgénicas de cada variedad, es decir, curado al humo (K326), Burley (TN90) y negro (VA359), por presentar contenido de Cd en el intervalo más bajo en la lámina foliar. Se recogieron 5
hojas centrales y raíces de estas plantas transgénicas y de plantas de control para el análisis de metales por ICP-MS. Después de 8 semanas, todas las plantas se cultivaron en medio Hoagland complementado con CdCl₂ 5 µM antes de la recolección.

La tabla 2 lista los niveles de Cd y Zn medidos en la lámina foliar y la raíz de varias líneas transgénicas, que representan tres variedades de tabaco, como se proporciona más adelante. En la tabla 2, la distribución de Cd entre la lámina foliar y la raíz se modificaron sustancialmente por la expresión de los polinucleótidos de ARNi de NtHMA (660-915) para las tres variedades, curado al humo (K326), Burley (TN90) y negro (VA359). Para las líneas transgénicas de K326, el % de reducción de Cd estaba en el intervalo de 97,16-98,54% comparado con los niveles de Cd observados en las plantas de control de K326. Para las líneas transgénicas de TN90, el % de reducción de Cd estaba en el intervalo de 85,12-90,96% comparado con los niveles de Cd observados en las plantas de control de TN90. Para las líneas transgénicas de VA359, el % de reducción de Cd estaba en el intervalo de 93,24-99,07% comparado con los niveles de Cd observados en las plantas de control de VA359. La línea transgénica de VA359 NtHMA-11 presentaba el nivel más bajo de Cd (1,62 µg/g) y el mayor % de reducción de Cd (99,07%), cuando se comparaba frente a dos líneas de control deficientes en el transgén de ARNi de NtHMA ("VA359 PBI121") que presentaban niveles de Cd de 158,3 - 205,96 mg/g. Análisis de la raíz comparables de las líneas transgénicas mostraron que se podía acumular una cantidad sustancial de Cd en la raíz, dando como resultado un número de veces de aumento de los niveles de Cd en la raíz en el intervalo de 6,90 - 15,38, con respecto a los niveles de Cd observados en los controles respectivos.

En contraste con la significativa reducción de Cd en la lámina foliar de las líneas transgénicas, el contenido de Zn de la lámina foliar no se redujo sustancialmente, aunque se observó cierta reducción en la mayoría de las líneas transgénicas, causada por la expresión de los polinucleótidos de ARNi de NtHMA (660-915). El contenido de Zn en la raíz (última columna de la tabla 3) aumentó en todas las líneas transgénicas, dando como resultado un aumento de 4-6 veces en las líneas transgénicas de las variedades K326 y VA359, y un aumento de 3-5 veces en la variedad de TN90.

La figura 6 muestra la distribución de Cd y Zn entre la lámina foliar y la raíz de varias líneas transgénicas de primera generación que se han modificado genéticamente para expresar polinucleótidos de ARNi de NtHMA de interés, como se presenta en la tabla 2. En cada gráfica de la figura 6, las unidades del eje y son µg/mg de tejido.

Tabla 2

Variedad transgénica	Hoja		Raíz	
	Cd	Zn	Cd	Zn
K326 06T458	7,09	22,2	703	201
K326 06T459	4,97	24,1	696	225
K326 06T473	3,7	34	929	215
K326 06T480	3,93	38,6	989	224
K326 06T482	2,55	36,3	520	126
K326 Control	174,7	36,3	64,3	35,7
TN90 06T428	26,3	48,6	626	184
TN90 06T430	16,08	37,2	684	213
TN90 06T444	15,98	28,1	738	234
TN90 06T445	20,72	32,6	618	186
TN90 06T455	17,87	24,4	582	157
TN90 PB1121	181,2	35,5	62,6	44,3
TN90 Control	172,4	32,3	72,9	46,6
VA359 06T493	7,59	23,1	543	148
VA359 06T498	1,62	26,2	706	175
VA359 06T506	5,72	28,8	351	109
VA359 06T542	7,03	27,1	738	136
VA359 06T543	11,78	29,3	547	106
VA359 PBI121	206	47,5	35,3	27,6
VA359 Control	158,5	32,6	37,6	26,2

EJEMPLO 8

Distribución de Cd en varios tejidos de líneas transgénicas genéticamente modificadas para expresar polinucleótidos de ARNi de NtHMA

Para determinar el efecto de la expresión de polinucleótidos de ARNi de NtHMA (1382-1584) en la distribución de Cd en diferentes tejidos (es decir, la corteza, lámina, médula y raíz), se analizó el contenido de metales de varias líneas transgénicas que representan dos variedades Burley (TN90) y curado al humo (K326). Se recogieron plantas

transgénicas completamente maduras para el análisis de metales por ICP-MS. Después de 8 semanas, todas las plantas se cultivaron en CdCl_2 5 μM en medio Hoagland antes de la recolección.

5 La tabla 3 lista el contenido de Cd en los tejidos de la corteza, lámina, médula y raíz de varias líneas transgénicas, como se proporciona más adelante. En la tabla 3, los niveles de Cd se redujeron sustancialmente en los tejidos de la corteza, lámina, médula y raíz de todas las líneas transgénicas ensayadas cuando se comparaban con las plantas de control. El "control" representa las plantas no transgénicas. El "PBI121" representa plantas transgénicas transformadas con un vector de expresión deficiente en la construcción de ARNi de ARNi de NtHMA. La extensión de la reducción de Cd en la corteza, médula y lámina foliar de las líneas transgénicas de K326 era significativamente mayor que la observada en las líneas transgénicas de YN90. La expresión de los polinucleótidos de ARNi (1382-1584) en plantas transgénicas de K326 dio como resultado una reducción de Cd de 9-11 veces en la corteza, una reducción de Cd de 6-13 veces en la médula y una reducción de Cd de 31-32 veces en la lámina foliar. La expresión de los polinucleótidos de ARNi (1382-1584) en plantas transgénicas de TN90 dio como resultado una reducción de Cd de 4-7 veces en la corteza, una reducción de Cd de 5-8 veces en la médula y una reducción de Cd de 6-20 veces en la lámina foliar. En cambio, se observaron aumentos modestos (5-6 veces) del contenido de Cd en la raíz de estas líneas transgénicas cuando se comparaban con las plantas de control.

La figura 7 muestra la distribución de Cd entre la corteza ("B"), lámina foliar ("L"), médula ("P") y raíz ("R") de varias líneas transgénicas de primera generación que se han modificado genéticamente para expresar polinucleótidos de ARNi de NtHMA de interés, como se presenta en la tabla 3. En cada gráfica de la figura 7, las unidades del eje y son $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tejido.

Tabla 3

Variedad de semilla transgénica	Cd en corteza	Cd en lámina	Cd en médula	Cd en raíz
TN90 06T619	7,36	31,1	4,67	557
TN90 06T658	3,76	8,89	2,89	727
TN90 Control	30,9	151	25,3	115
TN90 PBI121	23,1	201	20	124
K326 06T682	2,02	4,32	1,97	1020
K326 06T696	2,53	4,48	4,25	1030
K326 Control	19,5	133	25,3	145
K326 PBI121	25,5	143	26,2	253

25 EJEMPLO 9
Reducción de Cd en la lámina foliar de líneas transgénicas de segunda generación genéticamente modificadas para expresar polinucleótidos de ARNi de NtHMA
Para determinar el efecto de la expresión de polinucleótidos de ARNi de NtHMA (660-915) en el contenido de Cd en la lámina foliar, se determinó el contenido de metal de dos líneas transgénicas (T1) de la variedad VA359 cultivadas en suelo que contenía concentraciones variables de Cd durante 4 semanas. Se seleccionaron dos líneas transgénicas 06T498 y 06T506, como positivas para kanamicina por PCR. Varias macetas de 25,4 cm (10") llenas con mezcla de arena:suelo se saturaron con CdCl_2 0, 0,1, 0,5, o 5 μM . Se cultivaron tres plantas por tratamiento por línea transgénica durante 4 semanas añadiendo medio Hoagland al platillo de la maceta. Se observaron el número total de hojas, índice del área foliar, peso foliar, peso del tallo y peso de la raíz. Dos muestras de hojas centrales y raíces se liofilizaron y se sometieron a análisis de metales pesados.

La figura 8 muestra la distribución de Cd entre la lámina foliar ("L") y la raíz ("R") de varias líneas transgénicas de segunda generación (T1) que se han modificado genéticamente para expresar polinucleótidos de ARNi de NtHMA de interés. En cada gráfica de la figura 8, las unidades del eje y son $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tejido. A partir de la figura 8 se puede ver que el contenido de Cd de las plantas transgénicas era sistemáticamente menor que el de las plantas de control en todas las concentraciones de Cd ensayadas (0, 0,1, 0,5, o 5 μM). Se observó una reducción del contenido de Cd de la lámina foliar (2-4,7 veces) en varias líneas transgénicas ensayadas. El nivel de Cd para la línea 06T498 era solo ~20% de las plantas de control con CdCl_2 5 μM . Se observó un aumento del contenido de Cd en la raíz (4-16 veces) en varias líneas transgénicas ensayadas. El mayor contenido de Cd en la raíz (un aumento de 16 veces) se observó para la línea 06T498 con CdCl_2 5 μM . Por lo tanto, el contenido reducido de metales pesados en la lámina foliar/brotes en las líneas transgénicas que expresaban polinucleótidos de ARNi de NtHMA (660-915), sugería la que traslocación de una cantidad sustancial de metales pesados desde la raíz a la lámina foliar/brotes se podía interrumpir por la interferencia de ARNi. Los resultados están de acuerdo con la reducción de Cd observada en la lámina foliar de las líneas transgénicas de primera generación, en cuanto que las líneas transgénicas de segunda generación también demostraban (a) niveles de Cd reducidos en la lámina foliar, y (b) Cd aumentado en las raíces. Las líneas transgénicas no demostraron diferencias fenotípicas en el aspecto general, crecimiento y desarrollo relativo al de las plantas de control.

55 EJEMPLO 10
Polinucleótidos de NtHMA
Un polinucleótido de NtHMA en general contendrá enlaces fosfodiéster, aunque en algunos casos, están incluidos

análogos de ácidos nucleicos que pueden tener cadenas principales alternas, que comprenden, p. ej., enlaces fosforamidato, fosforotioato, fosforoditioato o O-metilfosforoamidita (véase Eckstein, *Oligonucleótidos and Analogues: A Practical Approach*, Oxford University Press); y cadenas principales y enlaces de ácidos nucleicos peptídicos. Otros ácidos nucleicos análogos incluyen aquellos con cadenas principales positivas; cadenas principales no iónicas y cadenas principales sin ribosa, incluyendo las descritas en las patentes de EE.UU. n° 5.235.033 y 5.034.506, y los capítulos 6 y 7, ASC Symposium Series 580, *Carbohydrate Modifications in Antisense Research*, Sanghui & Cook, eds. También están incluidos los ácidos nucleicos que contienen uno o más azúcares carbocíclicos, en una definición de ácidos nucleicos. Las modificaciones de la cadena principal de ribosa-fosfato se pueden hacer por una variedad de razones, p. ej., para aumentar la estabilidad y la semivida de dichas moléculas en entornos fisiológicos o como sondas en un biochip. Se pueden hacer mezclas de ácidos nucleicos naturales y análogos; alternativamente, se pueden hacer mezclas de diferentes análogos de ácidos nucleicos y mezclas de ácidos nucleicos naturales y análogos.

Una variedad de referencias describen dichos análogos de ácidos nucleicos, incluyendo, por ejemplo, fosforamidato (Beaucage et al., *Tetrahedron* 49(10):1925 (1993) y referencias citadas en el mismo; Letsinger, *J. Org. Chem.* 35:3800 (1970); Sprinzl et al., *Eur. J. Biochem.* 81:579 (1977); Letsinger et al., *Nucl. Acids Res.* 14:3487 (1986); Sawai et al., *Chem. Lett.* 805 (1984), Letsinger et al., *J. Am. Chem. Soc.* 110:4470 (1988); y Pauwels et al., *Chemica Scripta* 26:141 (1986)), fosforotioato (Mag et al., *Nucleic Acids Res.* 19:1437 (1991); y patente de EE.UU. n° 5.644.048), fosforoditioato (Briu et al., *J. Am. Chem. Soc.* 111:2321 (1989), enlaces de O-metilfosforoamidita (véase, Eckstein, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, Oxford University Press), y cadenas principales y enlaces de ácidos nucleicos peptídicos (véase Egholm, *J. Am. Chem. Soc.* 114:1895 (1992); Meier et al., *Chem. Int. Ed. Engl.* 31:1008 (1992); Nielsen, *Nature*, 365:566 (1993); Carlsson et al., *Nature* 380:207 (1996), todos los cuales se incorporan por referencia). Otros ácidos nucleicos análogos incluyen los que tienen cadenas principales positivas (Denpcy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:6097 (1995); cadenas principales no iónicas (patentes de EE.UU. n° 5.386.023, 5.637.684, 5.602.240, 5.216.141 y 4.469.863; Kiedrowski et al., *Angew. Chem. Intl. Ed. English* 30:423 (1991); Letsinger et al., *J. Am. Chem. Soc.* 110:4470 (1988); Letsinger et al., *Nucleoside & Nucleotide* 13:1597 (1994); capítulos 2 y 3, ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research", Ed. Y. S. Sanghui y P. Dan Cook; Mesmaeker et al., *Bioorganic & Medicinal Chem. Lett.* 4:395 (1994); Jeffs et al., *J. Biomolecular NMR* 34:17 (1994); *Tetrahedron Lett.* 37:743 (1996)) y cadenas principales sin ribosa, incluyendo las descritas en las patentes de EE.UU. n° 5.235.033 y 5.034.506, y capítulos 6 y 7, ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research", Ed. Y. S. Sanghui y P. Dan Cook. También están incluidos los ácidos nucleicos que contienen uno o más azúcares carbocíclicos, en una definición de ácidos nucleicos (véase, Jenkins et al., *Chem. Soc. Rev.* (1995) pp 169-176). Se describen varios análogos de ácidos nucleicos en Rawls, C & E News Jun. 2, 1997 página 35. Estas referencias se incorporan en la presente memoria expresamente por referencia.

Otros análogos incluyen ácidos nucleicos peptídicos (PNA) que son análogos de ácidos nucleicos peptídicos. Estas cadenas principales son sustancialmente no iónicas en condiciones neutras, a diferencia de la cadena principal de fosfodiéster muy cargada de ácidos nucleicos naturales. Esto da como resultados dos ventajas. Primero, la cadena principal de PNA presenta cinéticas de hibridación mejoradas. Los PNA tienen cambios mayores de temperaturas de fusión (T_m) para las pares de bases con apareamiento erróneo frente a las apareadas perfectamente. El ADN y ARN típicamente presenta una caída en la T_m de 2-4°C para un apareamiento erróneo interno. Con la cadena principal de PNA no iónica, la caída está cerca de 7-9°C. Igualmente, debido a su naturaleza no iónica, la hibridación de las bases unidas a estas cadenas principales es relativamente insensible a la concentración salina. Además, los PNA no son degradados por enzimas celulares, y por lo tanto pueden ser más estables.

Entre los usos de los polinucleótidos de NtHMA descritos, y combinaciones de fragmentos de los mismos, está el uso de fragmentos como sondas o cebadores o en el desarrollo de moléculas de ARNi. Dichos fragmentos en general comprenden al menos aproximadamente 17 nucleótidos contiguos de una secuencia de ADN. En otras realizaciones, un fragmento de ADN comprende al menos 30, o al menos 60 nucleótidos contiguos de una secuencia de ADN. Los parámetros básicos que afectan a la elección de las condiciones de hibridación y guía para diseñar condiciones adecuadas se exponen en Sambrook et al. 1989, y se describen con detalle antes. Usando el conocimiento del código genético en combinación con las secuencias de aminoácidos expuestas antes, se pueden preparar conjuntos de oligonucleótidos degenerados. Dichos oligonucleótidos son útiles como cebadores, p. ej., en las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR), en las que fragmentos de ADN se aíslan y amplifican. En algunas realizaciones, se pueden usar cebadores degenerados como sondas para genotecas no humanas. Dichas genotecas incluirían, pero no se limitan a bibliotecas de ADNc, genotecas e incluso EST electrónico (marcador de secuencia expresada) o bibliotecas de ADN. Por lo tanto, se usarían secuencias homólogas identificadas por este método como sondas para identificar homólogos no humanos de la secuencia de NtHMA identificada en la presente memoria.

Los ejemplos de referencia también incluyen polinucleótidos y oligonucleótidos que hibridan en condiciones restrictivas reducidas, típicamente condiciones moderadamente restrictivas y habitualmente condiciones muy restrictivas (también denominadas "altamente restrictivas"), con un polinucleótido de NtHMA descrito en la presente memoria. Los parámetros básicos que afectan a la elección de las condiciones de hibridación y la guía para diseñar condiciones adecuadas se exponen en Sambrook, J., E. F. Fritsch, y T. Maniatis (1989, *Molecular Cloning: A*

Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., capítulos 9 y 11; y Current Protocols in Molecular Biology, 1995, F. M. Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., secciones 2.10 y 6.3-6.4, incorporados en la presente memoria por referencia), y las pueden determinar fácilmente los expertos en la técnica, basándose, por ejemplo, en la longitud y/o composición de bases del polinucleótido. Un modo de conseguir condiciones moderadamente restrictivas implica el uso de una solución de prelavado que contiene 5xSSC, SDS al 0,5%, EDTA 1,0 mM (pH 8,0), tampón de hibridación de aproximadamente 50% de formamida, 6xSSC, y una temperatura de hibridación de aproximadamente 55°C (u otras soluciones de hibridación similares, tales como las que contienen aproximadamente 50% de formamida, con una temperatura de hibridación de aproximadamente 42°C), y condiciones de lavado de aproximadamente 60°C en 0,5xSSC, SDS al 0,1%. En general, las condiciones altamente restrictivas se definen como condiciones de hibridación como antes, pero con lavado a aproximadamente 68°C, 0,2xSSC, SDS al 0,1%. SSPE (1x SSPE es NaCl 0,15 M, NaH₂PO₄ 10 mM, y EDTA 1,25 mM, pH 7,4) se puede sustituir por SSC (1x SSC es NaCl 0,15 M y citrato sódico 15 mM) en los tampones de hibridación y lavado; se llevan a cabo lavados durante 15 min después de completarse la hibridación. Debe entenderse que la temperatura de lavado y la concentración salina de lavado se pueden ajustar según sea necesario para lograr el grado deseado de restricción aplicando los principios básicos que gobiernan las reacciones de hibridación y estabilidad de dúplex, como conocen los expertos en la técnica y se describe con más detalle más adelante (véase, p. ej., Sambrook et al., 1989). Cuando se hibrida un ácido nucleico con un polinucleótido diana de secuencia desconocida, la longitud del híbrido se supone que es la del ácido nucleico de hibridación. Cuando se hibridan ácidos nucleicos de secuencia conocida, la longitud del híbrido se puede determinar alineando las secuencias de ácidos nucleicos e identificando la región o regiones de complementariedad de secuencias óptima. La temperatura de hibridación para los híbridos que se prevé que sean menores de 50 pares de bases de longitud debe ser de 5 a 10°C menos que la temperatura de fusión (T_m) del híbrido, donde la T_m se determina según las siguientes ecuaciones. Para los híbridos de menos de 18 pares de bases de longitud, T_m (°C)=2(n° de bases A+T)+4(n° de bases G+C). Para híbridos de más de 18 pares de bases de longitud, T_m (°C)=81,5+16,6(log₁₀ [Na+])+0,41 (% G+C)-(600/N), donde N es el número de bases en el híbrido, y [Na+] es la concentración de iones sodio en el tampón de hibridación ([Na+] para 1x SSC=0,165 M). Típicamente, cada uno de dichos ácidos nucleicos de hibridación tiene una longitud que es al menos 25% (habitualmente al menos 50%, 60%, o 70%, y lo más habitualmente 80%) de la longitud de un polinucleótido de la descripción con el que hibrida, y tiene una identidad de secuencia de al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97,5%, o al menos 99%) con un polinucleótido de la descripción con el que hibrida.

EJEMPLO 11

Polipéptidos de NtHMA

Un polipéptido de la descripción se puede preparar cultivando células hospedante transformadas o recombinantes en condiciones de cultivo adecuadas para expresar un polipéptido de la descripción. El polipéptido expresado resultante después se puede purificar de dicho cultivo usando procedimientos de purificación conocidos. La purificación del polipéptido también puede incluir una columna de afinidad que contiene agentes que se unirán al polipéptido; una o más etapas de la columna sobre resinas de afinidad tales como concanavalina A-agarosa, heparin-toyopearl® o Cibacrom blue 3GA Sepharose®; una o más etapas que implican cromatografía por interacción hidrófoba usando resinas tales como de éter fenílico, éter butílico o éter propílico; o cromatografía de inmunoafinidad. Alternativamente, el polipéptido de la descripción también se puede expresar en una forma que facilitará la purificación. Por ejemplo, se puede expresar como un polipéptido de fusión, tal como los del polipéptido de unión a maltosa (MBP), glutatión-S-transferasa (GST) o tiorredoxina (TRX). Están disponibles en el comercio kits para la expresión y purificación de dichos polipéptidos de fusión, en New England BioLab (Beverly, Mass.), Pharmacia (Piscataway, N.J.), e InVitrogen, respectivamente. El polipéptido también se puede marcar con un epítipo y purificar posteriormente usando un anticuerpo específico dirigido a dicho epítipo. Finalmente, se puede usar una o más etapas de cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (RP-HPLC) que usa medio de RP-HPLC hidrófobo, p. ej., gel de sílice que tiene grupos metilo u otros grupos alifáticos colgantes, para purificar más el polipéptido. Algunas o todas las etapas de purificación anteriores, en diferentes combinaciones, también se pueden usar para proporcionar un polipéptido recombinante sustancialmente homogéneo. Por lo tanto, el polipéptido así purificado carece sustancialmente de otros polipéptidos de mamífero y se define, de acuerdo con la invención, como un "polipéptido sustancialmente purificado", dichos polipéptidos purificados incluyen polipéptido de NtHMA, fragmento, variante y similares. La expresión, aislamiento y purificación de los polipéptidos y fragmentos de la descripción se pueden llevar a cabo por cualquier técnica, incluyendo pero sin limitar los métodos descritos en la presente memoria.

También se puede usar una columna de afinidad tal como un anticuerpo monoclonal generado contra polipéptidos de la descripción, para purificar por afinidad polipéptidos expresados. Estos polipéptidos se pueden separar de una columna de afinidad usando técnicas convencionales, p. ej., en un tampón de elución muy salino y después dializar en un tampón de menor salinidad para usar o cambiando el pH u otros componentes dependiente de la matriz de afinidad usada, o separarlos de forma competitiva usando el sustrato natural del resto de afinidad, tal como un polipéptido derivado de la descripción.

Un polipéptido de la descripción también se puede producir por síntesis química convencional. Los métodos para construir los polipéptidos de la descripción o fragmentos de los mismos por medios sintéticos son conocidos para los expertos en la técnica. Las secuencias de polipéptido construidas de forma sintética, por compartir características

conformaciones y/o estructurales primarias, secundarias o terciarias con los polipéptidos naturales, puede tener propiedades biológicas en común con los mismos, incluyendo la actividad biológica.

EJEMPLO DE REFERENCIA 1

5 Anticuerpos anti-NtHMA

En un ejemplo de referencia, se proporcionan en la presente memoria anticuerpos que son inmunorreactivos con los polipéptidos de la descripción. Los polipéptidos de NtHMA, fragmentos, variantes, polipéptidos de fusión y similares, como se exponen en la presente memoria, se pueden usar como "inmunógenos" en la producción de anticuerpos inmunorreactivos con estos. Dichos anticuerpos se unen específicamente a los polipéptidos por los sitios de unión al antígeno del anticuerpo. Los anticuerpos que se unen específicamente son aquellos que reconocerán específicamente y se unirán con los polipéptidos de la familia de NtHMA, homólogos, y variantes, pero no con otras moléculas. En una realización, los anticuerpos son específicos para polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos de NtHMA de la descripción, como se expone en la SEQ ID NO: 2 y no tienen reacciones cruzadas con otros polipéptidos.

Más específicamente, los polipéptidos, fragmentos, variantes, polipéptidos de fusión, y similares, contienen determinantes o epítomos antigénicos que desencadenan la formación de anticuerpos. Estos determinantes o epítomos antigénicos pueden ser lineales o conformacionales (discontinuos). Los epítomos lineales están compuestos de una sola sección de aminoácidos del polipéptido, mientras que los epítomos conformacionales o discontinuos están compuestos de secciones de aminoácidos de diferentes regiones de la cadena de polipéptido que se ponen próximos tras el plegamiento del polipéptido. Se pueden identificar epítomos por cualquiera de los métodos conocidos en la técnica. Además, los epítomos de los polipéptidos de la descripción se pueden usar como reactivos de investigación en ensayos, y para purificar anticuerpos de unión específica de sustancias tales como sueros policlonales o líquidos sobrenadantes de hibridomas cultivados. Dichos epítomos o variantes de los mismos se pueden producir usando técnicas bien conocidas en la técnica, tales como la síntesis en fase sólida, escisión química o enzimática de un polipéptido, o usando tecnología de ADN recombinante.

Se pueden preparar tanto anticuerpos policlonales como monoclonales contra los polipéptidos de la descripción mediante técnicas convencionales. Véase, por ejemplo, *Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, Kennet et al. (eds.), Plenum Press, New York (1980); y *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow and Land (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1988); Kohler y Milstein, (patente de EE.UU. nº 4.376.110); la técnica de hibridoma de linfocitos B humanos (Kosbor et al., *Immunology Today* 4:72, 1983; Cole et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:2026, 1983); y la técnica del hibridoma de EBV (Cole et al., 1985, *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pág. 77-96). También están contempladas en la presente memoria las líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos monoclonales específicos para los polipéptidos de la descripción. Dichos hibridomas se pueden producir e identificar por técnicas convencionales. Para la producción de anticuerpos, se pueden inmunizar varios animales hospedantes mediante inyección con un polipéptido de NtHMA, fragmento, variante o mutantes de los mismos. Dichos animales hospedantes pueden incluir, pero no se limitan a conejos, ratones y ratas, por nombrar algunos. Se pueden usar varios adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica. Dependiendo de las especies hospedantes, dichos adyuvantes incluyen, pero no se limitan a Freund (completo e incompleto), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles plurónicas, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianina de lapa californiana, dinitrofenol y adyuvantes humanos potencialmente útiles como BCG (bacilo de Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*. Los anticuerpos monoclonales se pueden recuperar por técnicas convencionales. Dichos anticuerpos monoclonales pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, IgD, y cualquier subclase de las mismas.

Los anticuerpos de la descripción también se pueden usar en ensayos para detectar la presencia de los polipéptidos o fragmentos de la descripción, in vitro o in vivo. Los anticuerpos también se pueden usar en la purificación de polipéptidos o fragmentos de la descripción por cromatografía de inmunoafinidad.

EJEMPLO 12

ARN bicatenarios

En una realización, la descripción proporciona moléculas de ácido ribonucleico bicatenarias (ARNbc) para inhibir la expresión del gen de NtHMA en una célula (p. ej., una célula de planta), en donde el ARNbc comprende una cadena de sentido contrario que comprende una región de complementariedad que es complementaria a al menos una parte de un ARNm formado en la expresión del gen de NtHMA, y en donde la región de complementariedad es de menos de 30 nucleótidos de longitud, y en donde dicho ARNbc, tras el contacto con una célula que expresa el gen de NtHMA, inhibe la expresión de dicho gen de NtHMA en al menos 20%. El ARNbc comprende dos cadenas de ARN que son suficientemente complementarias para la hibridación para formar una estructura de dúplex. Una cadena del ARNbc (la cadena de sentido contrario) comprende una región de complementariedad que es sustancialmente complementaria, y típicamente completamente complementaria, con una secuencia diana, derivada de la secuencia de un ARNm formado durante la expresión del gen de NtHMA, la otra cadena (la cadena codificante) comprende una región que es complementaria de la cadena de sentido contrario, de modo que dos cadenas hibridan y forman una estructura de dúplex cuando se combinan en condiciones adecuadas. La estructura de dúplex es de entre aproximadamente 15 y 30 (p. ej., entre aproximadamente 18 y 25), típicamente entre aproximadamente 19 y 24 (p.

ej., entre 21 y 23) pares de bases de longitud. Igualmente, la región de complementariedad de la secuencia diana es de entre 15 y 30 (p. ej., entre aproximadamente 18 y 25), típicamente entre aproximadamente 19 y 24 (p. ej., entre 21 y 23) pares de bases de longitud. El ARNbc de la descripción puede comprender además uno o más extremos salientes de nucleótidos monocatenarios. El ARNbc se puede sintetizar por métodos convencionales conocidos en la técnica como se describe con más detalle más adelante, p. ej., usando un sintetizador de ADN automático, tal como los disponibles en el comercio, por ejemplo, de Biosearch, Applied Biosystems, Inc. En otro aspecto, se puede usar un vector de expresión para expresar una molécula de ARNi in vivo.

El ARNbc de la descripción puede contener uno o más apareamientos erróneos con la secuencia diana. En una realización el ARNbc de la descripción contiene más de 3 apareamientos erróneos. Si la cadena de sentido contrario del ARNbc contiene apareamientos erróneos con una secuencia diana, es típico que la zona de apareamientos erróneos no esté situada en el centro de la región de complementariedad. Si la cadena de sentido contrario del ARNbc contiene apareamientos erróneos con la secuencia diana, es típico que el apareamiento erróneo esté restringido a 5 nucleótidos desde cualquiera de los extremos, por ejemplo, 5, 4, 3, 2 o 1 nucleótido desde cualquiera del extremo 5' o 3' de la región de complementariedad. Por ejemplo, para una cadena de ARNbc de 23 nucleótidos que es complementaria con una región del gen de NtHMA, el ARNbc preferiblemente no contiene ningún apareamiento erróneo dentro de los 13 nucleótidos centrales. Los métodos descritos en la descripción se pueden usar para determinar si un ARNbc contiene un apareamiento erróneo con una secuencia diana que se eficaz para inhibir la expresión del gen de NtHMA.

En una realización, al menos un extremo del ARNbc tiene un extremo saliente de nucleótidos monocatenario de 1 a 4 (p. ej., 1 o 2 nucleótidos). Los ARNbc que tienen extremo saliente de al menos un nucleótido tienen propiedades inhibitorias. El ARNbc también puede tener un extremo romo, típicamente situado en el extremo 5' de la cadena de sentido contrario.

En otra realización más, el ARNbc se modifica químicamente para potenciar la estabilidad. Los ácidos nucleicos de la descripción se pueden sintetizar y/o modificar por métodos bien establecidos en la técnica, tales como los descritos en "Current protocols in nucleic acid chemistry", Beaucage, S. L. et al. (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y., USA, que se incorpora en la presente memoria por referencia. Las modificaciones químicas pueden incluir, pero no se limitan a modificaciones en 2', introducción de bases no naturales, unión covalente a un ligando, y sustitución de enlaces fosfato con enlaces tiofosfato. En esta realización, la integridad de la estructura de dúplex se refuerza por al menos uno, y típicamente dos uniones químicas. Las uniones químicas se pueden lograr por cualquiera de una variedad de técnicas bien conocidas, por ejemplo introduciendo enlaces covalentes, iónicos o de hidrógeno; interacciones hidrófobas, interacciones de van der Waals o de apilado; mediante coordinación de metal-ion, o mediante el uso de análogos de purina.

En otra realización más, los nucleótidos en una o ambas de las dos cadenas individuales se pueden modificar para prevenir o inhibir la activación de enzimas celulares, tales como, por ejemplo, sin limitación, determinadas nucleasas. Las técnicas para inhibir la activación de enzimas celulares son conocidas en la materia, incluyendo, pero no limitadas a modificaciones 2'-amino, modificaciones 2'-fluoro, modificaciones 2'-alquilo, modificaciones de la cadena principal no cargada, modificaciones de morfolino, modificaciones de 2'-O-metilo y fosforoamidato (véase, p. ej., Wagner, *Nat. Med.* (1995) 1:1116-8). Por lo tanto, al menos un grupo 2'-hidroxilo de los nucleótidos en un ARNbc es sustituido por un grupo químico. Además, al menos un nucleótido puede ser modificado para formar un nucleótido cerrado. Dicho nucleótido cerrado contiene un puente de metileno o etileno que conecta el oxígeno 2' de la ribosa con el carbono 4' de la ribosa. Los oligonucleótidos que contienen el nucleótido cerrado se describen en Koshkin, A. A., et al., *Tetrahedron* (1998), 54: 3607-3630) y Obika, S. et al., *Tetrahedron Lett.* (1998), 39: 5401-5404). La introducción de un nucleótido cerrado en un oligonucleótido mejora la afinidad para las secuencias complementarias y aumenta la temperatura de fusión en varios grados (Braasch, D. A. y D. R. Corey, *Chem. Biol.* (2001), 8:1-7).

La conjugación de un ligando a un ARNbc puede potenciar su absorción celular. En algunos casos, se conjuga un ligando hidrófobo con el ARNbc para facilitar la permeación directa de la membrana celular. Alternativamente, un ligando conjugado con el ARNbc es un sustrato para la endocitosis mediada por receptor. Estos procedimientos se han usado para facilitar la permeación celular de oligonucleótidos de sentido contrario. En algunos casos, la conjugación de un ligando catiónico a oligonucleótidos a menudo da como resultado resistencia mejorada a las nucleasas. Los ejemplos representativos de ligados catiónicos son propilamonio y dimetilpropilamonio. Es interesante que se ha descrito que los oligonucleótidos de sentido contrario retenían su alta afinidad de unión con el ARNm cuando se dispersaba el ligando catiónico por el oligonucleótido. Véase, M. Manoharan *Antisense & Nucleic Acid Drug Development* 2002, 12, 103, y referencias citadas en el mismo.

EJEMPLO DE REFERENCIA 2

Métodos para identificar agentes moduladores de NtHMA

La descripción proporciona métodos para identificar agentes que pueden modular el nivel de expresión y/o actividad de NtHMA. Los candidatos ("un agente de ensayo") que se puede seleccionar para identificar la actividad moduladora específica de NtHMA incluyen moléculas pequeñas, compuestos químicos, peptidomiméticos, anticuerpos, péptidos, polinucleótidos (p. ej., ARNi, ARNip, moléculas de sentido contrario o ribozimas), y agentes desarrollados por diseño basado en ordenador. La modulación de NtHMA incluye un aumento o disminución de la

actividad o expresión. Por ejemplo, un método para identificar candidatos que pueden modular la expresión y/o actividad de NtHMA, comprende: poner en contacto una muestra que contiene un polipéptido o polinucleótido de NtHMA con un agente de ensayo en condiciones que permitan que el agente de ensayo y el polipéptido o polinucleótido de NtHMA interaccionen, y medir la expresión y/o actividad del polipéptido de NtHMA en presencia o ausencia del agente de ensayo.

En un ejemplo de referencia, una célula que contiene un polinucleótidos de NtHMA se pone en contacto con un agente de ensayo en condiciones tales que la célula y el agente de ensayo se dejan interaccionar. Dichas condiciones típicamente incluyen las condiciones de cultivo celular normales de acuerdo con el tipo de célula particular que se está usando, conocidas en la técnica. Puede ser conveniente permitir que el agente de ensayo y la célula interaccionen en condiciones asociadas con mayor temperatura o en presencia de reaccionantes que facilitan la absorción del agente de ensayo por la célula. Un control se trata de forma similar pero en ausencia del agente de ensayo. Alternativamente, la actividad o expresión de NtHMA se puede medir antes de poner en contacto con el agente de ensayo (p. ej., la medición estándar o de control) y después otra vez tras el contacto con el agente de ensayo. Después la célula tratada se compara con el control y una diferencia en la expresión o actividad de NtHMA comparado con el control, es indicativa de un agente que modula la actividad o expresión de NtHMA.

Cuando se mide la expresión de NtHMA, la detección de la cantidad de ARNm que codifica el polipéptido de NtHMA en la célula se puede cuantificar, por ejemplo, por PCR o transferencia Northern. Cuando se mide un cambio en la cantidad de polipéptido de NtHMA en la célula, se puede usar la detección de NtHMA mediante anticuerpos anti-NtHMA para cuantificar la cantidad de polipéptido de NtHMA en la célula usando técnicas conocidas. Alternativamente, la actividad biológica (p. ej., transporte de metales pesados) se puede medir antes y después del contacto con el agente de ensayo.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Philip Morris Products S.A.

<120> Plantas transgénicas modificadas para el transporte reducido de cadmio, productos derivados y métodos relacionados

<130> P/61020.WO01/MAR

<150> US 60/996,982

<151> 2007-12-13

<160> 57

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 17921

<212> ADN

<213> *Nicotiana tabacum*

<400> 1

gcgtgagcta	tgagaaagcg	ccacgcttcc	cgaagggaga	aaggcggaca	ggtatccggt	60
aagcggcagg	gtcggaacag	gagagcgcac	gagggagctt	ccagggggaa	acgcctggta	120
tctttatagt	cctgtcgggt	ttcgccacct	ctgacttgag	cgtcgatttt	tgtgatgctc	180
gtcagggggg	cggagcctat	ggaaaaacgc	cagcaacgcg	gcctttttac	ggttcctggc	240
cttttgctgg	ccttttgctc	acatgttctt	tcctgcgtta	tcccctgatt	ctgtggataa	300
ccgtattacc	gcctttgagt	gagctgatac	cgctcgccgc	agccgaacga	ccgagcgcag	360
cgagtcagtg	agcggaggaag	cggaagagcg	cccaatacgc	aaaccgcctc	tccccgcgcg	420
ttggccgatt	cattaatgca	gctggcacga	caggtttccc	gactggaaag	cgggcagtga	480
gcgcaacgca	attaatgtga	gttagctcac	tcattaggca	ccccaggctt	tacactttat	540
gcttccggct	cgatgtttgt	gtggaattgt	gagcggataa	caatttcaca	caggaaacag	600
ctatgacat	gattacgcca	agctatttag	gtgacgcggt	agaatactca	agctatgcat	660
caagcttggg	accgagctcg	gatccactag	taacggccgc	cagtgtgctg	gaattcgccc	720
ttatcacctc	tttccaaaac	aaaagtatat	ccaatatatt	ccagaactag	aaattccttt	780
ttcatctatt	atcttctcct	cctccttaga	gaaggagaaa	aatggtggaa	agtgaaaaaa	840
tgaatgaaac	aaagaagtg	agcaagagct	attttgatgt	tttgggaatt	tgctgtactt	900
cagaagttgt	tctagttgaa	aaaatttctca	agaatcttga	aggggttaaa	gaggtttcag	960
taattgtcac	aacaaagact	gtcattgtta	ttcatgattc	tcttctcatt	tctccgcaac	1020
aaattggtaa	gaaagatagt	tacacacctt	tattactctc	tcagttctat	tttttacgtg	1080
atactatttt	cttttaata	tgttctgaaa	agaacgttac	ctttttatat	attgatgtaa	1140
tttcacttta	aacttcatat	ttttttctt	aaatagtatt	gttttatagt	cataaaaata	1200
ttattataag	tctttcttaa	gttttggtggc	ttgttaataa	aattcacata	aaatgaaata	1260
aagcggtagg	agtaccattc	ttcatctttt	cttaattaac	tgacatttcc	tttctttttt	1320
gtaagtttat	atatattaag	taaagtgatt	tttctcttaa	gaaatcgcca	aaaaaaaaaa	1380
ggaaagagaa	gagaagagac	aagaaggggg	agacaaatgg	aatcagaaac	ggttttgatt	1440

tgttcaagtg atatttggtg gtagttgttt caagcactgt tctttctggt tgmtggcatt 1500
 tgctagaatt aagtgtatat attaatttgg gaaaatcttt aaagtgggta tttttagttt 1560
 tattagattg agtaaccaag acggaaaaaa catgaactat ttttcttttg aaatttctag 1620
 tcaagaacat gcataaaaaat tctcttttaa aacgactctc ataaaaattc atgtgggcga 1680
 gtttacgcag cacatggacc catagtctcc gcctaactaa gtattttaag tatgtatttt 1740
 ctaaaattca tctaattttt tctgttggcg cacatgctcc acaaagatg aattgtgcat 1800
 ttgtttgaat attgagttat tactcaaagg aatatggatc aattccactt tttttctctt 1860
 ttctttaata ttgtacccat atcttaaaaa ttctagctcc gcctccgact tgccccatcg 1920
 atccgcccc a gccctcagtg ggatagagta ggtgaggagt atagtttata aatgtttttt 1980
 ctctaacaat taggttttgg aataaattct gagattcaat ggtctatttg aaacctgtaa 2040
 ttactactcc ctccgtttca tattagatga ttactttcct ttttagtcta ttccaaaaca 2100
 aataacacat ttctaatttt ggaaataatt caattttaaa atctttcatt ttaccattt 2160
 accttaatga atgtttttat agccacacaa atgtcatgac cccacaaatt ttttaccctt 2220
 taaactttta agaccacaaa ttttaaaagt ttcttctttt ttcttaact atatgccaaag 2280
 taaaactaac tcatcttgaa acggaggagt actataagaa tagttatata tgatttggcc 2340
 ccacaaatta cataattgtg gcaagaaatc caagtttcta gttgttgata atttagtgat 2400
 ggaggcgatc tctgttgaac cgttagagaa aatattttga ctcatgtcgc tttgcatcta 2460
 ctgtgttgaa gagtagttgc taggaactaa caagtaatt gtagtttctt tgtttttttt 2520
 ttttctttc ttgatgaatt actgtacttt attttcccat tttttaacg tctgttactt 2580
 atggtcagtt ttcaagtgtg aaaaattagc cagaaagaat aattcaaca acttaacctt 2640
 ttcttttctt cattcttgcg atctttccta aatataattt gtagagtctc ttttctactt 2700
 cagtcttatt gcatttcttg cacacctaac agtagtggt aataaattgg acctagctaa 2760
 caaaaggtaa ctcttatctg caagtttaat tggtagagta acatgaaact tgttataatc 2820
 ttttaattg cagccgataa tatatgtatg ttttacattg gttgtgtgta tataatgtaa 2880
 attctttaca gcatgtttga ctaacctgca aaaattagtt tttttttttt caaaagtatt 2940
 tttggtgaga agcagtttgt gtttggctaa gtaatttgaa aaatacttct gagcaacaat 3000
 tagtgtttgt ccaagctttt aaaaactgct ttttaattgta tttttgtcaa aagagctttt 3060
 taaaaaagta ttttttagag agaaactact tttttctgct tctccaaaat tgtttctgct 3120
 tctcctcaa aacacttttt ttctttctaa aagcttgtac aaacacttca actaaaaaaa 3180
 atatattagc acttatatta tctttataat tattgaagtt accatctatc ttttgggat 3240
 gtagttaag cattgaatca agcaagatta gaagcaagca taagagtga aggagagaaa 3300
 aactaccaa agaaatggcc aagtccattt gcaattggca gtgaaatatt gcttggactc 3360
 tcatctttga agtacttttt tgcacctttc caatggtag cacttgcagc tgttgagtt 3420
 gggattcctc caattatttt tagagggtg gctgccgtgc gaaacctcac tcttgacatc 3480

gacattcttg ttttaatagc aggtactttg cttttccttt tctttctttt taactttttg 3540
aaaagcaaaa agagatactc ctttttgccc caatttatat ggcggatatt aattaacaa 3600
aaaaatctaa gaaaaatag aatactttaa aaatttatgg tttgaaataa atcttaggca 3660
tctaaataca aggttaaaat aataatttta aagttaaaaa attcaagaaa gaaaggaaga 3720
cttctaaaat ttgtggcaag aaataaatct tagagatttg tgttataaat catctcacta 3780
aggctaaaat aataatttta aagttaaatt acttttaatt atgaaaaggat gatagatttt 3840
tgggaaaaga tagaaaagaa aactgtgcta tataaattga gacagagaga gtaatttacc 3900
ataagagtat ttgaagttga tttggttata gaattaacat gtgctcctac ttttagctttg 3960
tgattgaaat ttggctattg cttaatttc ttagctaatt ggatgcttct aatgtgatgc 4020
ttgaatcctt attcttgata atgcttttg attcattatt tcattaaaaa gcatgcacca 4080
tagggcatgc aattaatat tgtatttaag aatgcacttt taactaacc accaagattgg 4140
agtgggaggg atgattcttg ggtgttagat gctaatttg gaccacccta gtgactttaa 4200
ataacgaaag catgaaaaac aattattgga tgcttgatat actttatggt ataataattt 4260
caggtgacct agaactacac aaataaactt cttttccat attggaatag gatgatttag 4320
attcaagat ggaattagtg attctatcac agattatctt ttatttaatg atatcaata 4380
tgaaaagaga aaaaaaaaaag gtgtctagga aatagtcaga aagatagtat gacatatatt 4440
attgatacaa attaactcagc tcaacacaaa ggctagcata tatttaacaa atagttatag 4500
actttagtg ttgtacctt agttaagaga ctaaacacta ccaaaagggt gcatgggagc 4560
agtaggtact cctctattgt catccaggcg ccttgatata aattaattag atcccaaac 4620
gaggatcaga taccaataa aaaacaaaaa gaaactatct ttagtgtttg ttgatttaca 4680
tggcgtagaa aaataaagga caatataata aaaaccttg aatatcagtt aagatgcctt 4740
aatttcaaat cagtgagta tattccgact tccgtattaa tttcgctcta atcaagtctt 4800
ttaaagatt aaataatgaa aagttttat agtcacgaaa acattatgac cacaaaattt 4860
tgtcctttaa gctttttaga ccataaattt caaaaaaaaa aatttgactg aaatatttaa 4920
taccacatat ttttaaaaaa ttattttttt cttacattta gtgtcaagta aaattagatg 4980
tgataggaaa aaagaatttc gatttcgtct agtaaggaaa gtacaaaatt gcttatgtaa 5040
ctcgtaatat atcagaaatg gtttcccagg tgtaaagcac aaacaacgga gccacatca 5100
gtaatgtgta aatgtgtaac gtttactctc ttttttctt caaataattg caaagaaaat 5160
gactttctg caagtcttc ttgcccctt tatagaaggat gacgttgact cgtaccagat 5220
tttcttgca tagtattaat cagtagtaat atcagtcacg gcgaggttta aaatttagtc 5280
tattagtaac gtaaataatt tttaaattgt catatttagt taatctaaaa tatcatgcaa 5340
ttttttatat caagtttgat atgttgacgt aaataataga acaataattt ataaacttga 5400
ttaaattgca ttgataataa atcaaaatat ttttgaacg attaaaatct cacagttaat 5460
tttgcatctt gcataaaaaa atatccatca ttttcttg attatcattt gatgccgtct 5520
tagtttctt taaaaaatt tagaatttat atcaaatatg attttttaat tactcgaact 5580

tacaagcaga	ctaagtttga	tattttccta	attcaacgat	atacggttac	tacggaaggc	5640
atttactaga	aatactctga	gatgttactg	caattattat	tattattatt	ttaaaaagag	5700
aaaaaataa	cttttaaagc	tccatgtgaa	attatgtata	ttttattata	gcatgaagtg	5760
accccathtt	ttatctcata	aataacattg	atcccatatt	tttctactgt	atcatcacta	5820
tcatgaaaa	tacatctaga	ttactgagat	gtttattggc	agtagtatct	acagatacaa	5880
cagatgcttc	tagttctatt	gatgttttca	ttttgacaaa	aatttraattg	agaaagcaaa	5940
agattttgca	agaattctta	gggttttatt	caaaaaaaaa	aaagaattct	tagaaatata	6000
agttttggca	attaaataat	tccagtaatt	gggaaaaaac	acttgaatag	gctatagaag	6060
taaaagaaac	ttctatatat	taccaggcag	cagagtttcc	caaaatcctt	ttttctaaaa	6120
aaaaaatagt	agaaaatgag	caatgtaatt	tctttaagta	acattctcta	tttagtaaaa	6180
tgtccathtt	tctaattgag	taaaagcaat	agcaataaaa	agaaagtta	ttcctttttt	6240
tcgagggtgt	tgccgacca	ggcttaaata	gataggaata	atcaccta	taagaaaaac	6300
tacctatcaa	tttttgtctc	ggttggattt	caacatgata	cctcatagtt	ctacgtacgc	6360
ccacttcaat	taccactagg	aacaccgttt	ggtgcaggaa	aattttggtc	ataaacttca	6420
attttaagcc	ttcatataaa	caataaaaga	gctaattagc	agttaacagt	cgagttaata	6480
tagctgaata	atgcagttca	actaaatag	tatggaaatg	gtgaaaagca	caaaggtgac	6540
ttatccttag	gtactttata	gctttatctt	ttaaaaagta	gtagcaagat	atgatatgat	6600
tccttgaaga	agaaaaggtc	actgtgactc	tttatttcta	tcagtacctg	tttgaataaa	6660
attggctaag	aaagttgtaa	aatggactag	caggacaaga	atctcaattt	ggtgttgctt	6720
taccatcttt	agagtgacag	caatcaaaaa	cccaaaaatt	aaataaataa	taagaaaaga	6780
aaaagatgag	ttatttgaaa	gggtaaaatg	aatgaagata	agaatactcc	attcagtcca	6840
aaatattaag	ctagcatttg	gacatagatt	tggttgaagc	ttgaagaaaa	gaaaaaagag	6900
tttttgaaga	ttatatgaaa	aataattttt	gaaagttaaa	attgtgtag	ggaagttttg	6960
tgattcaaaa	actactctag	aactgttttt	gggatttaaa	tattttcttt	tcaacatgtg	7020
ccaaaaaatg	attaaaatct	ataaacgaac	acataattga	aaaaagctct	caaattttat	7080
gaccaaacag	gagcttattg	ttttggcaaa	ttgaatttgt	ttcgaataac	ttgatgatta	7140
aggagagaca	aaggatagta	tagacaaaag	gctattagta	tttgtaattg	aggctattaa	7200
atgtcttttt	aaagcgatgt	gcaaaaacct	taaaaaagac	gaattatag	gattatatta	7260
gaagtagtat	taaattttta	tggaacttag	tgcaatcatt	ttacaagggc	atagtgttaa	7320
agctagaaat	gctgattctt	atagctggct	ttgtcatgtg	cagtggctgg	atcaattggt	7380
ttacacgatt	attgggaagc	tggtactatt	gtcttcttat	tcgccattgc	agaatggcta	7440
gagtcaaggg	caagtcacaa	ggtttgtgaa	ttttcgctcc	tgtttaattt	ccttgcaaaa	7500
gaaatggcta	gtgtacatct	actttcctag	gatgacagta	atgtgtgttt	ttttatttta	7560
ttgtgatacc	aaaagtatga	acacctaatt	tttctcagga	tacatatttt	ccactttggc	7620

caaaactgact	ttaacaagtt	gtctcttggga	ttacgccaca	tcgaacctaa	aagtgttggc	7680
actaccatgt	caacttgtgc	tgtcttatag	ggatttgaga	cattttgtct	agggtgtcat	7740
atggaccctt	tcttcatgag	ctcgatagca	caaaagcttg	ctagtcattc	tacttgacct	7800
gcctcattag	cccgccttac	gcatgggcat	cacaaaccag	gccacacgta	ggaattgagt	7860
ctctccctg	cggttcacc	acagacctta	cagttttgtc	gcttgggtaa	tgccacaact	7920
agcccgataa	cgtgcttacc	atgtgaactt	gtaccatata	ttacctagca	cttcaccttc	7980
ctctccctt	gcgacgcgcc	taaaatgtca	tatgcaccgt	tttttccgaa	gtttgctagt	8040
ctagaagcct	attagttctt	aggcttaacc	tgccctatta	accactctcc	atcataggcg	8100
tcaccttaat	ttaaagaat	ttgttcttag	aaggctctaa	cttaaaccag	aaatcagttc	8160
agctgtcttc	tgttctttta	cctcaataac	attgtataat	ggtaaggact	aaactgcagc	8220
tctcttggg	atgagtggat	taaatttcat	tctgaaaatt	aatttacttc	acagctctat	8280
ttggagaaaa	taaagattaa	atattgtgag	aatgcacggg	agaaaaatat	tatattgatt	8340
aaagtgttgt	acaaccctat	ttatatacag	taattatata	ataatatgta	tctacttccc	8400
gatgtgggac	actaaatatg	actaactact	taacacttcc	tctcaagccg	gtgcatataa	8460
atcatacgt	ccgagcttgt	tacagatgta	accaatacga	gaaccagtaa	gagacttagt	8520
gaaaatattt	gctagcta	cattcgactt	tacaaacttt	gtaacaatat	ctcctgagag	8580
tatcttttct	ctgacaaagt	gacagtcgat	ctcaatgtgt	ttagtcctct	catggaatac	8640
cggatttgac	gcaatatgaa	gagcagcttg	attatcacac	accagttcca	tcttattgat	8700
ttctccgaat	ttcaactcct	tgagcaactg	cttgatccac	actagctcac	acgttgccat	8760
agccatggcc	cgatattcgg	cttcggtgct	agatcgagca	actacattct	gtttcttggc	8820
cttccaagag	accaaattac	ctcctactag	aacacaatat	ccagacgtag	aacgtttatc	8880
agaaggatg	cctgccaat	cagcatttgt	gtaccctgta	atctgctcgt	agcctcgatc	8940
ctcgaatagt	aacccttgc	ctggagctga	ctttatata	cgaagaatgc	gaacaactgc	9000
atcccagtg	ctatcacagg	gagaatccat	aaactgactt	acaacactca	ccggaaaaga	9060
aatgtctggt	ttagtcaccg	tgaggtaatt	caatttgcca	accaacctcc	gatattctcat	9120
aggatctcta	agaggctccc	cctgtccatt	gcagaagctt	agcattcggg	tccataggag	9180
tgtcaacagg	tctacatccc	atcattccag	tcttctcaag	aatgtctaag	gcatacttcc	9240
gctgtgaaat	aacaatacct	gagctagact	gagcgacctc	aatacctgga	aaatacttca	9300
atctgcctag	atccttagtc	tggaagtgcc	aaaagagatg	ttgcttcaga	ttagtaatac	9360
catcctgatc	attgtcagta	ataacaatat	cgtctacata	aaccaccata	gtaaggttat	9420
gaacaaaaca	cgtgcttcta	aagacacggg	gtggaagaga	gaacaaagg	aagtggggaa	9480
acaggacaga	gaatggaact	tgattctgga	tagctgaaga	tgacatacga	ttaataagat	9540
agcaagatgt	aagaactgca	tcaccccaaa	aatgcaacgg	agcatgagat	tgtatgagta	9600
gagtacgagt	agtttcaata	agatgtctac	tctttcttcc	agctacccca	ttttgttgag	9660
atgtgtacgg	acaagatggt	tgatgaataa	tcccatgaga	gttcataaac	ttctgaaatg	9720

gggagacaa atactctagg gcattatcac tacgaaatgt gcggatagaa accccaaatt 9780
 gattttgaat ttcagcgtgg aaggtctgaa aaatagaaaa tagctcagac cgatttttca 9840
 tcaaaaatat ccaagtgcac ctggaataat catcaatgaa actgacaaag tagcggaaatc 9900
 ccaaggtaga actgaccgca ctaggacccc aaacatctga atggaccaa gtaaaagggtg 9960
 acgctgaggg aatgggagt gggataactt accgagctgt catgactcat actctagagt 10020
 ggacaagtga gataaaccag gtatcatttt ctaaagtttt gacaaactgg gatgtcccaa 10080
 ccgtttatgt aataaatctg gtgaatcggg aacaagacaa gttattaaag gaagacaaga 10140
 tgcgagtcca tatgattttg caaggataag gtaataaaat ccatctaatt catgtctgat 10200
 accaatgatc cgccccgtac tatgtttctc tataaaaata aggtcatcaa gaaataaaac 10260
 agcgcattta agtgatttgg ctaagcgact aacggctatg agattaanaag gactattggg 10320
 aacataaagg actgaatcta aaggtgagga aggaagtggg cctgcttgac ctattgcagt 10380
 tgccatggtt tgagactcat tggccattgt gactgttaga agagattgag aatatgaata 10440
 ctggtgaaaa gagatttgg accagaaata tgatcagatg catttgaatc aatgacccaa 10500
 gactcaaagg ttaagattc ggagacacaa gtcacgctac tatctgtttg aacaatggaa 10560
 gctatccctg aagatgtctg tttacatgct ttgtactgaa ggaactcagt ataatccgat 10620
 aaagaaacca tctggattgg attcaacgaa ttggatccaa cagattgtga gttaaaggct 10680
 tctgatacga atgtcattat aatgttgtgc cgaaaaaaca aaaaattcct ggaaattact 10740
 attcacgccg gaaaaatata aaagtgatct gaatttgatt taaattggat gggatgctc 10800
 gtatttgcaa ggagaagaca ctgccctgaa ggaattttac caaattctgg ccggaattg 10860
 cctcatgtgc ggcgtgtggg cgtcagaact tcgtcggaaa aattcttccg gcggcgcgtg 10920
 agggcgcgtg tagccttttt tgccagagat tttttaatag gttggtcgct gagctctgaa 10980
 ctacttcccc gtggtgttac cttttgcaca aactgacag atagtatgat tcttgccgac 11040
 agacctattt ttgccggaaa agagcttccg gttgactgtt ttcttttccc ggagtcgctg 11100
 gaatttatgc actacgataa atttctcacg gttgctctga taccatgtga gaatgcacgg 11160
 gagaaaatta ttatattgat taaagtattg tacaacccta tttatataca gtaattacat 11220
 aataataggt atctacttcc cgatgtggga cactaaacat gactaactac ttaacaaata 11280
 tggatttggg atttagtctc tttgacataa acgacataag cctatgctta tcttttctta 11340
 ctttttttagc aatgctaaat agtaggtcct aactacaaac tttatagcac actgaaaatt 11400
 accaaaatat agagatggcc aatgaagggt ttgtctgcta acataactct gtgtctttat 11460
 tttctcactg atattgtata tggataaagc attctgataa atgaaaacct ttatggttat 11520
 gtaggctacc gccgctatgt catcactggt caatatagtc cctccaacag cagtttttagc 11580
 ggaaagcggg gaagtcgtaa atgttgatga agtcaagggt aatagcattc ttgctgtgaa 11640
 agctggtgaa actataccta ttgatggagt tgtagtggaa ggggaatgtg acgtggacga 11700
 gaaaacactg acaggcgagt cgtttccagt ttctaagcaa agagattcaa cggctctgggc 11760

tggcgctaca	aatctaaatg	gtagtatagt	atctcttcat	gcttcattta	tttagtgctg	11820
aaacttcaag	tattgtttgt	taatgttatt	tgctcaattc	ttcaggctat	atcagtgta	11880
agactacggc	tttggtgaa	gattgtgagg	tggttaggat	ggcacagcct	gtcgaagatg	11940
ctcagaacaa	gaaatcaaaa	acccaaagat	acatcgacaa	gtgtgctaaa	tattatacac	12000
caggctagt	aatcttatgt	tgtgccacat	caagtcaaaa	aatgcacgta	ccgtgtgaac	12060
ttgttctttg	tcttatgaat	cacgtcacta	tcctctccct	tttcgatatg	agatttcctt	12120
aagggtgcat	atgaatccct	tcttcggaag	cttgccagca	taggagtcta	tcagtccttt	12180
cacttgacc	gccctctcag	cctgcctgca	gtcatggggc	tcgcactact	atattgctct	12240
ttcgtttaaa	actttttatt	tctaatactt	ccctgctctt	tgtgtatgtc	taatttcgac	12300
tggtgatgtt	ttgcagcaat	tgtggctata	ccagcttctt	tggaattgt	tcctactgca	12360
ttaagagttc	acaatcgaag	tgaatggtat	cgcttggtt	tggtcacatt	ggtgagtgca	12420
tgctcgtgtg	cactcgttct	atctacacca	gttgccatgt	gttgcgcact	ttcaaaagca	12480
gcaacgtccg	gtcttctgtt	taaaggagca	gagtaccttg	agactctagc	taaaatcaaa	12540
atcatggctt	ttgacaaaac	agggactata	actaaaggag	aatttatggt	gaccgagttc	12600
aagtctctga	ttgatggtt	tagtctcaat	acactgcttt	actggtaaag	gttaccactc	12660
atacatattc	ttttatggtg	ccaagagaa	ttcaaaatct	taactggtta	tctttcacgg	12720
cacattgata	gcatataaac	atgattgatt	tatatcatat	atcataaaa	gatgaaatag	12780
ggagtgccac	attcacattc	tcatattgaa	gtttctgaaa	tggtctaat	ggttcacat	12840
agagccaaaa	taacatatag	acacaacgtc	agccgtctga	tattcaggaa	cttagatgga	12900
atagttggat	cttatacatt	gaggacacat	aaaagtactt	ggtcatataa	attttagaaa	12960
tataatcaat	gtattataat	ctaaaattct	tcaaatattc	ttgatactgc	aatacaaaag	13020
cacatggcac	actgaataga	agccttgctc	ggtggtctaa	aacattcgtt	tagagtaa	13080
actgagttgt	ctagtgaata	ttttcaggg	ttcaagcatt	gagagcaagt	caggctatcc	13140
gatggcaacc	gctctgggtg	actatgcaca	atcaaatccc	gttgagccaa	agcctgatag	13200
agttgagcgg	tttcaaaatt	ttcctgggtg	agggatattt	ggaagaattg	atggaatgga	13260
aatctatgtc	gggaatagga	aaatttctt	aagagctgga	tgtaccacag	gtaa	13320
gaatcatttc	ttatgctcat	agtagagata	aaacatcaga	gttataatta	taagtatatg	13380
atctctccag	ttaattttgc	tgttagattt	tctttgacct	gtttagcact	aatgcgggtg	13440
atgtttgaat	ttcagtagca	gaaatagagg	gtgatagttt	caaaggaaag	tctgttggt	13500
acatattttt	gggatcatct	ccagctggaa	ttttcagctt	ttccgatggt	tgctgaattg	13560
gtgtaaaaga	agcaatgaga	gaactgaagc	agatgggtat	caaaaccgcg	atgcttactg	13620
gtgatcgtta	tgtagctgcc	aaccatgtgc	aggatcaggt	atattaataa	ttctgcatta	13680
cgctgaaatg	attataaaac	cctttggatt	attgtttagt	cttaagaatt	ttcactgaac	13740
tcttattggt	tccttcttct	atcatcaaca	ttggttaaac	atctcatcta	aatttagaga	13800
acgtatcacc	aagtaagtgc	tttaccttta	cagggtcata	taaaatactt	aagacagtg	13860

gatgtgaaga tgaaggtaa atgttgatct ggataaacca agttattatc acaactaata 13920
taagatatgc tattgttctc caataattgg acgattttcg gacgtacgac gtacaattct 13980
tcacatatga aacctacatc agacgtacat gacacgctat gtttagcata aagagtcaag 14040
attagcatga tgatttaagc tgaatctgaa tttcaagtat ctattcttgt attgtaccca 14100
ggggcggaac tagtgttgtg cttagaggtc tcaaacattg ttttgtgtt aaaaaattca 14160
cttcatatgt atttaaataa tttatccaga gcagtgagcc atatttttta gaatccagaa 14220
cccataaact caaaatcata gatccacctc tgattgtaag tcggaacaat tatgcagtta 14280
gggtggagctt tggatgaatt tcaagcagaa ctctaccag aggacaaggc aacaatcatc 14340
aagggttttc agaaggaagc tccaacagcg atgataggcg acggccttaa tgatgctcct 14400
gcattagcaa cagctgacat tggcatctca atgggcatct ctgggtcagc tctcgctaaa 14460
gaaacaggcc atgctatact aatgacaaat gacatcggaa gaataccgaa agctgcacgt 14520
cttgctagaa gagttcgaag gaagattgtt gagaatatga ttatatcagc cgttacaaag 14580
gctgccatag ttgcattggc aatagcaggc tatccattgg tttgggctgc tgtcctcgca 14640
gatactggga catgcttgct agtgattttg aacagcatgc tacttctacg aggaggcaca 14700
cgcagacatg ggaaaaaatg ttggagatct tctactcctt cgcagtctcc ccaccacaaa 14760
gacaaagctt catgttgcaa gtcggaaaat gctccccagc tgtgttgctc tgatattgag 14820
tcacaaaaga aatgtacaag tcaatcatgc tcgtccgagg tgtgtgttcc aagatgtcaa 14880
cctgtctcct cgggatcaaa gtcagtggga aataatcagt gccagactc cattgaaaat 14940
agtggttttc atttctcatc ccgtcctcaa tgctgctcgt cgaagatggc tgctaaagca 15000
tgccaatctg cagtttcaga atcaaagtca tgcggaaata atcagtgcc agactccggt 15060
gaaaatagtg gttttcattc tcatccccgt cctgaatgct gctcgtcgaa gatggctgct 15120
aaagcgtgcc aatctgcagt ttcagaatca aagtcatgig gaaataatca gtgccagac 15180
tccgttgga atagtggttt tcattctcat ccccgctctc aatgctgttc atcgaagatg 15240
gctgctaaag caggccaatc tgcactttca gaatcaaagt catgtggaaa taacaattgc 15300
tcagactcca ttcacaagag taattgtcat tctttaacta actctctagt atgttcttcc 15360
aagatgtctg ctccacaatg tcattctgct acttcaagca acaaatcatg tggaagtacc 15420
aagtgtccg acttcagtga taaaaaatgt tgtcaatccg acaaaattcc tcaagcgtgc 15480
tctaccaaga agtctgctcc aggggtgcaa tctgcagttt ctgggtctaa atcatgtgga 15540
aatagcaagt gttcagactc aaaagacaat agtagccatc cttcacatcc cgatcatcaa 15600
acatgcatgt ctaagttgtg tgctccacaa agccaatctg caacttcaag ctccaggaca 15660
tgtggaaata caaagtgtc ggacaccaat agcaagaatt cttgttattc acaaccaac 15720
tctgaatcat gctcttcaaa gatgtctggt ccatcatgca aaactgctaa ttcaggtacg 15780
accagattcc tcttcttgtt aatacccccc gaaccaaact ataggatcta aagtattatt 15840
tggccctctg tcggaggata taatggttag ttaaacctga aatcatgtag tctatgaatt 15900

gcaaattctct agcatcgtga caaaattctt agatcatata caactttgag aatataggct	15960
gtcacagacc cttcttcata ctgcattaga ggagagcagc caatttttta ttcattgattt	16020
gaaacaaata aagttcttct tgaggtgtat ggagaggcta tgagaatcat ttgctgagta	16080
ggtttgagat tttcaggttc aaggatcatgc agaaataaga agtgccagga ctctgcaacc	16140
gagaacagtt ttcattcacc acttactaat ccactcagtg gggaaaagct ttcggagcag	16200
aaaagcttgg atttagtccg aaaagataag gaatcaagtc atgatcttcg tcatggctgc	16260
tctgacgagg aacatgatca tacaattta gacaaggcat atgacagttg tgccttacia	16320
gaatgttggtt attcggttca aggcaataaa actgatgtat cagaaactgg aatccaggaa	16380
actgctcatt gtgacagcac caatcaaca tgccaaactg caagttcagg taggcactac	16440
caaatcatat gatccaaagt gctcctccac cttcactcct acaataaatg ttcgatcaaa	16500
cttcataaga agatagcata tgcattcga atctctaaaa aaatgatgga taatgttact	16560
caccaactag tttgagatag aagtttaact gattgctata tatcggtaac tataaaaaac	16620
tacttggtta ttagagctga gattttcagg atcgatgaca tgcggaaatg ataagatcct	16680
ggactctcta agcatccatg gttgtcattc gcatgataat ccactccacg aggagaacaa	16740
cctggagcag aaaatcttgg atgttggtgg agaaggtata aaatcacctc atgctgtcgg	16800
tcatggctgt tcggacaagg aacacgatca ctcacatcca gaaaaggcat atgacagttg	16860
tgcaacagat gattgttggt tttcagttca agtccatggc attgacgacg tatcaaaaag	16920
tgaaattcaa gaaactgctc attgtgacag cacaaagcag agcatgggtca tctccagcag	16980
ctgcaaacat gaaccaaag atcaggtaaa tctactgtgga cttcactcta aaactactcc	17040
aaactgatgaa gaactagcca agctgggttag aagatgctgc gaatacaaac catgccacga	17100
cgctccgttct ggctgcagga agcatgctgc agaatgtggt ccaaccgttc gatcaactat	17160
caatatctta cgggacaacc atcatcatta cctagactgc agtggtcgta aggtttgttc	17220
gctggttgag aagagacaca tcggtggatg ctgtgacagc ttcagaaaag aatggtgtgc	17280
caagaagaac caccttgag caagtttcgg aggaggttta tcagaaattg tcatagagta	17340
gatgcaatcc gaagtgtaca tatgttgtaa acttcctacc tattttatct tcaagaagtt	17400
gagctgctaa tttgaacaaa gcaagggcga attctgcaga tatccatcac actggcggcc	17460
gctcgagcat gcatctagag ggccaattc gccctatagt gagtcgtatt acaattcact	17520
ggccgctcgtt ttacaacgtc gtgactggga aaaccctggc gttaccaaac ttaatcgect	17580
tgacgacat ccccttttcg ccagctggcg taatagcgaa gaggcccgca ccgatcgccc	17640
ttccaacag ttgctgagcc tatacgtacg gcagtttaag gtttacacct ataaaagaga	17700
gagccgttat cgtctgtttg tggatgtaca gagtgatatt attgacacgc cggggcgacg	17760
gatggtgatc cccctggcca gtgcacgtct gctgtcagat aaagtctccc gtgaacttta	17820
cccgtggtg catatcgggg atgaaagctg gcgcatgatg accaccgata tggccagttg	17880
gccggtctcc gttatcgggg aagaagtggc tgatctcagc c	17921

<211> 1397
 <212> PRT
 <213> Nicotiana tabacum

<400> 2

Met Asn Glu Thr Lys Lys Leu Ser Lys Ser Tyr Phe Asp Val Leu Gly
 1 5 10 15
 Ile Cys Cys Thr Ser Glu Val Val Leu Val Glu Lys Val Leu Lys Asn
 20 25 30
 Leu Glu Gly Val Lys Glu Val Ser Val Ile Val Thr Thr Lys Thr Val
 35 40 45
 Ile Val Ile His Asp Ser Leu Leu Ile Ser Pro Gln Gln Ile Val Lys
 50 55 60
 Ala Leu Asn Gln Ala Arg Leu Glu Ala Ser Ile Arg Val Lys Gly Glu
 65 70 75 80
 Lys Asn Tyr Gln Lys Lys Trp Pro Ser Pro Phe Ala Ile Gly Ser Gly
 85 90 95
 Ile Leu Leu Gly Leu Ser Phe Leu Lys Tyr Phe Phe Ala Pro Phe Gln
 100 105 110
 Trp Leu Ala Leu Ala Ala Val Ala Val Gly Ile Pro Pro Ile Ile Phe
 115 120 125
 Arg Gly Val Ala Ala Val Arg Asn Leu Thr Leu Asp Ile Asn Ile Leu
 130 135 140
 Val Leu Ile Ala Val Ala Gly Ser Ile Val Leu His Asp Tyr Trp Glu
 145 150 155 160
 Ala Gly Thr Ile Val Phe Leu Phe Ala Ile Ala Glu Trp Leu Glu Ser
 165 170 175
 Arg Ala Ser His Lys Ala Thr Ala Ala Met Ser Ser Leu Val Asn Ile
 180 185 190
 Val Pro Pro Thr Ala Val Leu Ala Glu Ser Gly Glu Val Val Asn Val
 195 200 205
 Asp Glu Val Lys Val Asn Ser Ile Leu Ala Val Lys Ala Gly Glu Thr
 210 215 220
 Ile Pro Ile Asp Gly Val Val Val Glu Gly Glu Cys Asp Val Asp Glu
 225 230 235 240
 Lys Thr Leu Thr Gly Glu Ser Phe Pro Val Ser Lys Gln Arg Asp Ser
 245 250 255

Thr Val Trp Ala Gly Thr Thr Asn Leu Asn Gly Tyr Ile Ser Val Lys
 260 265 270
 Thr Thr Ala Leu Ala Glu Asp Cys Ala Val Ala Arg Met Ala Gln Leu
 275 280 285
 Val Glu Asp Ala Gln Asn Lys Lys Ser Lys Thr Gln Arg Tyr Ile Asp
 290 295 300
 Lys Cys Ala Lys Tyr Tyr Thr Pro Ala Ile Val Ala Ile Ser Ala Ser
 305 310 315 320
 Leu Ala Ile Val Pro Thr Ala Leu Arg Val His Asn Arg Asn Glu Trp
 325 330 335
 Tyr Arg Leu Ala Leu Val Thr Leu Val Ser Ala Cys Pro Cys Ala Leu
 340 345 350
 Val Leu Ser Thr Pro Val Ala Met Cys Cys Ala Leu Ser Lys Ala Ala
 355 360 365
 Thr Ser Gly Leu Leu Phe Lys Gly Ala Glu Tyr Leu Glu Thr Leu Ala
 370 375 380
 Lys Ile Lys Ile Met Ala Phe Asp Lys Thr Gly Thr Ile Thr Lys Gly
 385 390 395 400
 Glu Phe Met Val Thr Glu Phe Lys Ser Leu Ile Asp Gly Phe Ser Leu
 405 410 415
 Asn Thr Leu Leu Tyr Trp Val Ser Ser Ile Glu Ser Lys Ser Gly His
 420 425 430
 Pro Met Ala Ala Ala Leu Val Asp Tyr Ala Gln Ser Asn Ser Val Glu
 435 440 445
 Pro Lys Pro Asp Arg Val Glu Gln Phe Gln Asn Phe Pro Gly Glu Gly
 450 455 460
 Ile Phe Gly Arg Ile Asp Gly Met Glu Ile Tyr Val Gly Asn Arg Lys
 465 470 475 480
 Ile Ser Ser Arg Ala Gly Cys Thr Thr Val Pro Glu Ile Glu Gly Asp
 485 490 495
 Ser Phe Lys Gly Lys Ser Val Gly Tyr Ile Phe Leu Gly Ser Ser Pro
 500 505 510
 Ala Gly Ile Phe Ser Leu Ser Asp Val Cys Arg Ile Gly Val Lys Glu
 515 520 525

Ala Met Arg Glu Leu Lys Gln Met Gly Ile Lys Thr Ala Met Leu Thr
530 535 540

Gly Asp Cys Tyr Ala Ala Ala Asn His Val Gln Asp Gln Leu Gly Gly
545 550 555 560

Ala Leu Asp Glu Phe Gln Ala Glu Leu Leu Pro Glu Asp Lys Ala Thr
565 570 575

Ile Ile Lys Gly Phe Gln Lys Glu Ala Pro Thr Ala Met Ile Gly Asp
580 585 590

Gly Leu Asn Asp Ala Pro Ala Leu Ala Thr Ala Asp Ile Gly Ile Ser
595 600 605

Met Gly Ile Ser Gly Ser Ala Leu Ala Lys Glu Thr Gly His Val Ile
610 615 620

Leu Met Thr Asn Asp Ile Gly Arg Ile Pro Lys Ala Ala Arg Leu Ala
625 630 635 640

Arg Arg Val Arg Arg Lys Ile Val Glu Asn Met Ile Ile Ser Val Val
645 650 655

Thr Lys Ala Ala Ile Val Ala Leu Ala Ile Ala Gly Tyr Pro Leu Val
660 665 670

Trp Ala Ala Val Leu Ala Asp Thr Gly Thr Cys Leu Leu Val Ile Leu
675 680 685

Asn Ser Met Leu Leu Leu Arg Gly Gly Thr Arg Arg His Gly Lys Lys
690 695 700

Cys Trp Arg Ser Ser Thr Pro Ser His Ala Pro Thr Thr Lys Thr Lys
705 710 715 720

Leu His Val Ala Ser Arg Lys Met Leu Pro Ser Cys Val Ala Leu Ile
725 730 735

Leu Ser His Lys Arg Asn Val Gln Val Asn His Ala Arg Pro Arg Cys
740 745 750

Val Phe Gln Asp Val Asn Leu Ser Pro Gln Asp Gln Ser His Val Glu
755 760 765

Ile Ile Ser Ala Gln Thr Pro Leu Lys Ile Val Val Phe Ile Leu Ile
770 775 780

Ala Val Leu Asn Ala Ala Arg Arg Arg Trp Leu Leu Lys His Ala Asn
785 790 795 800

1070						1075					1080			
Ser	Gly 1085	Glu	Lys	Leu	Ser	Glu 1090	Gln	Lys	Ser	Leu	Asp 1095	Leu	Val	Arg
Lys	Asp 1100	Lys	Glu	Ser	Ser	His 1105	Asp	Leu	Arg	His	Gly 1110	Cys	Ser	Asp
Glu	Gly 1115	His	Asp	His	Thr	Asn 1120	Leu	Asp	Lys	Ala	Tyr 1125	Asp	Ser	Cys
Ala	Leu 1130	Gln	Glu	Cys	Cys	Tyr 1135	Ser	Val	Gln	Gly	Asn 1140	Lys	Thr	Asp
Val	Ser 1145	Glu	Thr	Gly	Ile	Gln 1150	Glu	Thr	Ala	His	Cys 1155	Asp	Ser	Thr
Asn	Gln 1160	Thr	Cys	Gln	Thr	Ala 1165	Ser	Ser	Gly	Ser	Met 1170	Thr	Cys	Gly
Asn	Asp 1175	Lys	Ile	Leu	Asp	Ser 1180	Leu	Ser	Ile	His	Gly 1185	Cys	His	Ser
His	Asp 1190	Asn	Pro	Leu	His	Glu 1195	Glu	Asn	Asn	Leu	Glu 1200	Gln	Lys	Ile
Leu	Asp 1205	Val	Val	Gly	Glu	Gly 1210	Ile	Lys	Ser	Pro	His 1215	Ala	Val	Gly
His	Gly 1220	Cys	Ser	Asp	Lys	Glu 1225	His	Asp	His	Ser	His 1230	Pro	Glu	Lys
Ala	Tyr 1235	Asp	Ser	Cys	Ala	Thr 1240	Asp	Asp	Cys	Cys	Phe 1245	Ser	Val	Gln
Val	His 1250	Gly	Ile	Asp	Asp	Val 1255	Ser	Lys	Ser	Glu	Ile 1260	Gln	Glu	Thr
Ala	His 1265	Cys	Asp	Ser	Thr	Lys 1270	Gln	Ser	Met	Val	Ile 1275	Ser	Ser	Ser
Cys	Lys 1280	His	Glu	Pro	Lys	Asp 1285	Gln	Val	Asn	His	Cys 1290	Gly	Leu	His
Ser	Lys 1295	Thr	Thr	Pro	Thr	Asp 1300	Glu	Glu	Leu	Ala	Lys 1305	Leu	Val	Arg
Arg	Cys 1310	Cys	Lys	Tyr	Lys	Pro 1315	Cys	His	Asp	Val	Arg 1320	Ser	Gly	Cys
Arg	Lys 1325	His	Ala	Ala	Glu	Cys 1330	Gly	Pro	Thr	Val	Arg 1335	Ser	Thr	Ile

Asn Ile Leu Arg Asp Asn His His His Tyr Leu Asp Cys Ser Gly
 1340 1345 1350
 Arg Lys Val Cys Ser Leu Leu Glu Lys Arg His Ile Gly Gly Cys
 1355 1360 1365
 Cys Asp Ser Phe Arg Lys Glu Cys Cys Ala Lys Lys Lys His Leu
 1370 1375 1380
 Gly Ala Ser Phe Gly Gly Gly Leu Ser Glu Ile Val Ile Glu
 1385 1390 1395

<210> 3
 <211> 4392
 <212> ADN
 <213> Nicotiana tabacum

<400> 3

tcacctcttt ccaaaacaaa agtatatcca atatattcca gaactagaaa ttcctttttc	60
atctattatc ttctcctcct ccttagagaa ggagaaaaat ggtggaaagt gaaaaaatga	120
atgaaacaaa gaagttgagc aagagctatt ttgatgtttt ggaatttgc tgtacttcag	180
aagttgttct agttgaaaaa gttctcaaga atcttgaagg ggttaaagag gtttcagtaa	240
ttgtcacaac aaagactgtc attgttattc atgattctct tctcatttct ccgcaacaaa	300
ttgttaaagc attgaatcaa gcaagattag aagcaagcat aagagtgaaa ggagagaaaa	360
actacacaaa gaaatggcca agtccatttg caattggcag tggaatattg cttggactct	420
catttttgaa gtactttttt gcacctttcc aatgggttagc acttgcagct gttgcagttg	480
ggattcctcc aattattttt agaggtgtgg ctgccgtgcg aaacctcact cttgacatca	540
acattcttgt ttaaatagca gtggctggat caattgtttt acacgattat tgggaagctg	600
gtactattgt cttcttattc gccattgcag aatggctaga gtcaagggca agtcacaagg	660
ctaccgctgc tatgtcatca ctggtaata tagtccctcc aacagcagtt ttagctgaaa	720
gcggaagaat cgtaaagtgt gatgaagtca aggtgaatag cattcttgct gtgaaagctg	780
gtgaaactat acctattgat ggagttgtag tggaagggga atgtgacgtg gacgagaaaa	840
cactgacagg cgagtcgttt ccagtttcta agcaaagaga ttcaacggtc tgggctggca	900
ctacaaatct aatggctat atcagtgtta agactacggc tttggctgaa gattgtgctg	960
tggctaggat ggcacagctt gtcgaagatg ctcagaacaa gaaatcaaaa acccaaagat	1020
acatcgacaa gtgtgctaaa tattatacac cagcaattgt ggctatatca gcttctttgg	1080
caattgttcc tactgcatta agagttcaca atcgaaatga atggtatcgc ttggctttgg	1140
tcacattggt gagtgcattg ccgtgtgcac ttgttctatc tacaccagtt gccatgtgtt	1200
gcgcaacttc aaaagcagca acgtccggtc ttctgtttaa aggagcagag taccttgaga	1260
ctctagctaa aatcaaaatc atggcttttg acaaaacagg gactataact aaaggagaat	1320
ttatggtgac cgagttcaag tctctgattg atggtttttag tctcaataca ctgctttact	1380

gggtttcaag cattgagagc aagtcaggtc atccgatggc agccgctctg gtggactatg 1440
 cacaatcaaa ttccgttgag ccaaagcctg atagagttga gcagtttcaa aattttcctg 1500
 gtgaagggat atttgaaga attgatggaa tggaaatcta tgtcgggaat aggaaaattt 1560
 cttcaagagc tggatgtacc acagtaccag aaatagaggg tgatagtttc aaaggaaagt 1620
 ctgttgata catatTTTTG ggatcatctc cagctggaat tttcagtctt tccgatgttt 1680
 gtcgaattgg tgtaaaagaa gcaatgagag aactgaagca gatgggtatc aaaaccgcga 1740
 tgcttactgg tgattgttat gcagctgcca accatgtgca ggatcagtta ggtggagctt 1800
 tggatgaatt tcaagcagaa ctctaccag aggacaaggc aacaatcatc aagggttttc 1860
 agaaggaagc tccaacagcg atgataggcg acggccttaa tgatgctcct gcattagcaa 1920
 cagctgacat tggcatctca atgggcatct ctgggtcagc tctcgctaaa gaaacaggcc 1980
 atgttatact aatgacaaat gacatcggaa gaataccgaa agctgcacgt cttgctagaa 2040
 gagttcgaag gaagattggt gagaatatga ttatatcagt cgttacaaag gctgccatag 2100
 ttgattggc aatagcaggt tatccattgg tttgggctgc tgcctcgca gatactggga 2160
 catgcttgct agtgattttg aacagcatgc tacttctacg aggaggcaca cgcagacatg 2220
 ggaaaaaatg ttggagatct tctactcctt cgcagtctcc caccacaaag acaaagcttc 2280
 atgttgcaag tcggaaaatg ctccccagct gtgttgctct gatattgagt cacaaaagaa 2340
 atgtacaagt caatcatgct cgtccgaggt gtgtgttcca agatgtcaac ctgtctcctc 2400
 aggatcaaag tcatgtggaa ataatcagtg cccagactcc attgaaaata gtggttttca 2460
 ttctcatcgc cgtcctcaat gctgctcgtc gaagatggct gctaaagcat gccaatctgc 2520
 agtttcagaa tcaaagtcgt gcggaaataa tcagtgccca gactccgttg aaaatagtgg 2580
 ttttcattct catccccgtc ctgaatgctg ctcgtcgaag atggctgcta aagcgtgcca 2640
 atctgcagtt tcagaatcaa agtcatgtgg aaataatcag tgcccagact ccggtgaaaa 2700
 atagtggttt tcattctcat ccccgctctc aatgctgttc atcgaagatg gctgctaaag 2760
 caggccaatc tgcactttca gaatcaaagt catgtggaaa taacaattgc tcagactcca 2820
 ttcacaagag taattgtcat tctttaacta actctctagt atgttcttcc aagatgtctg 2880
 ctccacaatg tcattctgct acttcaagca acaaatcatg tggaagtacc aagtgtccg 2940
 acttcagtga caaaaaatgt tgtcaatccg acaaaattcc tcaaacgtgc tctaccaaga 3000
 agtctgctcc aggatgtcaa tctgcagttt ctgggtctaa atcatgtgga aatagcaagt 3060
 gttcagactc aaaagacaat agtagccatc cttcacatcc cgatcatcaa acatgcatgt 3120
 ctaagttgtg tgctccaca agccaatctg caacttcaag ctccaggaca tgtggaaata 3180
 caaagtgctc ggacaccaat agcaagaatt cttgttattc acaaaccaac tctgaatcat 3240
 gctcttcaaa gatgtctggc ccatcatgca aaactgctaa ttcaggttca aggtcatgca 3300
 gaaataagaa gtgccaggac tctgcaaccg agaacagttt tcattacca cttactaatc 3360
 cactcagtg ggaagctt tcggagcaga aaagcttggga tttagtccga aaagataagg 3420

aatcaagtca tgatcttcgt catggctgct ctgacgaggg acatgatcat acaaatttag 3480
 acaaggcata tgacagttgt gccttacaag aatgttgtta ttcggttcaa ggcaataaaa 3540
 ctgatgtatc agaaactgga atccaggaaa ctgctcattg tgacagcacc aatcaaacat 3600
 gccaaactgc aagttcagga tcgatgacat gcggaaatga taagatcctg gactctctaa 3660
 gcatccatgg ttgtcattcg catgataatc cactccacga ggagaacaac ttggagcaga 3720
 aaatcttgga tgttgttgga gaaggtataa aatcacctca tgctgtcggg catggctggt 3780
 cggacaagga acacgatcac tcacatccag aaaaggcata tgacagttgt gcaacagatg 3840
 attgttggtt ttcagttcaa gtccatggca ttgacgacgt atcaaaaagt gaaattcaag 3900
 aaactgctca ttgtgacagc acaaagcaga gcatggtcac ctccagcagc tgcaaacatg 3960
 aaccaaaaaga tcaggtaaat cactgtggac ttcactctaa aactactcca actgatgaag 4020
 aactagccaa gctggttaga agatgctgca aatacaaac atgccacgac gtccgttctg 4080
 gctgcaggaa gcatgctgca gaatgtggtc caaccgttcg atcaaccatc aatatcttac 4140
 gggacaacca tcatcattac ctagactgca gtggtcgtaa ggtttggttcg ctggtggaga 4200
 agagacacat cgggtgatgc tgtgacagct tcagaaaaga atgttgtgcc aagaaaaaac 4260
 accttgagc aagttttgga ggaggtttat cagaaattgt catagagtag atgcaatccg 4320
 aagtgtacat atgttgtaaa cttcctacct attttatctt caagaagttg agctgcta 4380
 ttgaacaaag ca 4392

<210> 4
 <211> 723
 <212> ADN
 <213> Nicotiana tabacum

<220>
 <221> Intrón
 <222> (1)..(723)

<400> 4

gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt 60
 aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta 120
 tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc 180
 gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttcctggc 240
 cttttgctgg cttttgctc acatgttctt tcctgctgta tcccctgatt ctgtggataa 300
 ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgccgc agccgaacga ccgagcgcag 360
 cgagtcagtg agcgaggaag cggaagagcg cccaatacgc aaaccgcctc tccccgcgcg 420
 ttggccgatt cattaatgca gctggcacga caggtttccc gactggaaag cgggcagtga 480
 gcgcaacgca attaatgtga gttagctcac tcattaggca ccccaggctt tacactttat 540
 gcttccggct cgatgttgt gtggaattgt gagcggataa caatttcaca caggaaacag 600
 ctatgaccat gattacgcca agctatttag gtgacgcgtt agaatactca agctatgcat 660
 caagcttggg accgagctcg gatccactag taacggccgc cagtgtgctg gaattcgccc 720

tta 723

<210> 5
 <211> 303
 <212> ADN
 <213> Nicotiana tabacum

<220>
 <221> exón
 <222> (1)..(303)

<400> 5

tca cct ctt tcc aaa aca aaa gta tat cca ata tat tcc aga act aga 48
 Ser Pro Leu Ser Lys Thr Lys Val Tyr Pro Ile Tyr Ser Arg Thr Arg
 1 5 10 15

aat tcc ttt ttc atc tat tat ctt ctc ctc ctc ctt aga gaa gga gaa 96
 Asn Ser Phe Phe Ile Tyr Tyr Leu Leu Leu Leu Leu Arg Glu Gly Glu
 20 25 30

aaa tgg tgg aaa gtg aaa aaa tga atg aaa caa aga agt tga gca aga 144
 Lys Trp Trp Lys Val Lys Lys Met Lys Lys Arg Ser Ala Arg
 35 40 45

gct att ttg atg ttt tgg gaa ttt gct gta ctt cag aag ttg ttc tag 192
 Ala Ile Leu Met Phe Trp Glu Phe Ala Val Leu Gln Lys Leu Phe
 50 55 60

ttg aaa aaa ttc tca aga atc ttg aag ggg tta aag agg ttt cag taa 240
 Leu Lys Lys Phe Ser Arg Ile Leu Lys Gly Leu Lys Arg Phe Gln
 65 70 75

ttg tca caa caa aga ctg tca ttg tta ttc atg att ctc ttc tca ttt 288
 Leu Ser Gln Gln Arg Leu Ser Leu Leu Phe Met Ile Leu Phe Ser Phe
 80 85 90

ctc cgc aac aaa ttg 303
 Leu Arg Asn Lys Leu
 95

ES 2 527 272 T3

<210> 6
<211> 2218
<212> ADN
<213> Nicotiana tabacum

<220>
<221> Intrón
<222> (1)..(2218)

<400> 6

gtaagaaaga tagttacaca cctttattac tctctcagtt ctatTTTTta cgtgatacta	60
TTTTTTTT aatagttct gaaaagaacg ttacTTTTt atatattgat gtaatttcac	120
TTTaaacttc atatTTTTt tcttaaatag tattgTTTTa tagtcataaa aatattatta	180
taagtctttc ttaagTTTTg tggcttgTta aataaattca cataaaatga aataaagcgg	240
taggagtacc attcttcac ttttcttaat taactgacat ttcctttctt ttttgaagt	300
ttatatatat taagtaaagt gatTTTTctc ttaagaaatc gccaaaaaa aaaaggaaag	360
agaagagaag agacaagaag ggggagacaa atggaatcag aaacggTTTT gatttgTca	420

agtgatattt ggtggtagtt gtttcaagca ctgttctttc tgtttgttgg catttgctag 480
 aattaagtgt atatattaat ttgggaaaat ctttaaagtg gttattttta gttttattag 540
 attgagtaac caagacggaa aaaacatgaa ctatttttct tttgaaattt ctagtcaaga 600
 acatgcataa aaattctctt ttaaaacgac tctcataaaa attcatgtgg tcgagtttac 660
 gcagcacatg'gacccatagt ctccgcctaa ctaagtattt taagtatgta ttttctaaaa 720
 ttcattctaat attttctggt ggcgcacatg ctccacaaaa gatgaattgt gcatttgttt 780
 gaatattgag ttattactca aaggaatatg gatcaattcc actttttttc tcttttcttt 840
 aatattgtac ccatatctta aaaattctag ctccgcctcc gacttgcca tcgtatccgc 900
 cccagccctc agtgggatag agtaggtgag gagtatagtt tataaatggt ttttctctaa 960
 caattaggtt ttggaataaa ttctgagatt caatggtcta tttgaaacct gtaattacta 1020
 ctccctccgt ttcattattag atgattactt tccttttttag tctattccaa aacaaataac 1080
 acatttctaa atttggaat aattcaattt taaaatcttt cattttacc ctttacctta 1140
 atgaatgtt ttatagccac acaaatgtca tgacccaca aattttttac ccctaaact 1200
 ttaagacca caaattttaa aagtttcttc ttttttctta aactatatgc caagtaaac 1260
 taactcatct tgaacggag gagtactata agaatagtta tatatgattt ggccccacaa 1320
 attacataat tgtggcaaga aatccaagtt tctagttggt gataatttag tgatggaggc 1380
 gatctctggt gaaccgtag agaaaatatt ttgactcatg tcgctttgca tctactgtgt 1440
 tgaagagtag ttgctaggaa ctaacaaagt aattgtagtt tccttgtttt ttttttttcc 1500
 tttcttgatg aattactgta ctttattttc ccattttttt aacgtctggt acttatggtc 1560
 agttttcaag tgtgaaaaat tagccagaaa gaataattca acaaaactta ctttttcttt 1620
 tcttcattct tgcgatcttt cctaaatata tttagtagag tctcttttct acttcagtct 1680
 tattgcattt cttgcacacc taacagtagt ggtacataaa ttggacctag ctaacaaaag 1740
 gtaactctta tctgcaagtt taattggtac agtaacatga aacttggtat aatcttttaa 1800
 attgcagccg ataatatatg tatgttttac attggttgtg tgtatataat gtaaattctt 1860
 tacagcatgt ttgactaacc tgcaaaaatt agtttttttt ttttcaaaag tatttttggt 1920
 gagaagcagt ttgtgtttg ctaagtaatt tgaaaaatac ttctgagcaa caattagtgt 1980
 ttgtccaagc ttttaaaaac tgcttttaat tgtatttttg tcaaaagagc tttttaaaaa 2040
 agtatttttt agagagaaac tacttttttc tgcttctcca aaattgtttc tgcttctcct 2100
 caaaaacact ttttttctt ctaaaagctt gtacaaaacac ttcaactaaa aaaaatatat 2160
 tagcacttat attatcctta taattattga agttaccatc tatcttttgt ggatgtag 2218

<210> 7
 <211> 258
 <212> ADN
 <213> Nicotiana tabacum

<220>
 <221> exón
 <222> (1)..(258)

ES 2 527 272 T3

<400> 7

ttā aag cat tga atc aag caa gat tag aag caa gca taa gag tga aag	48
Leu Lys His Ile Lys Gln Asp Lys Gln Ala Glu Lys	
1 5 10	
gag aga aaa act acc aaa aga aat ggc caa gtc cat ttg caa ttg gca	96
Glu Arg Lys Thr Thr Lys Arg Asn Gly Gln Val His Leu Gln Leu Ala	
15 20 25	
gtg aaa tat tgc ttg gac tct cat ctt tga agt act ttt ttg cac ctt	144
Val Lys Tyr Cys Leu Asp Ser His Leu Ser Thr Phe Leu His Leu	
30 35 40	
tcc aat ggt tag cac ttg cag ctg ttg cag ttg gga ttc ctc caa tta	192
Ser Asn Gly His Leu Gln Leu Leu Gln Leu Gly Phe Leu Gln Leu	
45 50 55	
ttt tta gag gtg tgg ctg ccg tgc gaa acc tca ctc ttg aca tcg aca	240
Phe Leu Glu Val Trp Leu Pro Cys Glu Thr Ser Leu Leu Thr Ser Thr	
60 70	
ttc ttg ttt taa tag cag	258
Phe Leu Phe Gln	
75	

<210> 8

<211> 3861

<212> ADN

<213> Nicotiana tabacum

<220>

<221> Intrón

<222> (1)..(3861)

<400> 8

gtācttttgct tttccttttc tttcttttta actttttgaa aagcaaaaag agatactccc	60
ttttgtccca atttatatgg cggatattta ttaaacaaaa aaatctaaga aaaatagaa	120
tactttaaaa atttatgggt tgaataaat cttaggcatc taaatacaag gttaaaataa	180
taattttaaa gttaaaaaat tcaagaaaga aaggaagact tctaaaattt gtggcaagaa	240
ataaatctta gagatttggt ttataaatca tctcactaag gctaaaataa taattttaaa	300
gttaaattac ttttaattat gaaaagggtga tagatttttg ggaaaagata gaaaagaaaa	360
ctgtgctata taaattgaga cagagagagt aatttaccat aagagtattt gaagttgatt	420
tggttataga attaacatgt gctcctactt tagctttgtg attgaaattt ggctattgct	480
ttaatttctt agctaattgg atgcttctaa tgtgatgctt gaatccttat tcttgataat	540
gctttgtgat tcattatttc attaaaaagc atgcaccata gggcatgcaa ttaaatttg	600
tatttaagaa tgcactttta actaaccac aagattggag tgggagggat gattcttggg	660
tgttagatgc taatattgga ccaccctagt gactttaaat aacgaaagca tgaaaaacaa	720
ttattggatg cttgatatac tttatgttat aatattttca ggtgacctag aactacacaa	780
ataaacttct ttttccatat tggaatagga tgatttagat ttcaagatgg aattagtgat	840
tctatcacag attatctttt atttaatgat atcaaatatg aaaagagaaa aaaaaaggt	900

gtctaggaaa tagtcagaaa gatagtatga catatattat tgatacaaat taatcagctc 960
 aacacaaaag9 ctagcatata ttttaacaaat agttatagac ttgtagtggt gtaccttag 1020
 ttaagagact aaacactacc aaaaggttgc gatggagcag taggtactcc tctattgtca 1080
 tccaggcgcc ttgatataaa ttaattagat cccaaaacga ggatcagata ccaataaaaa 1140
 aacaaaaaga aactatcttt agtgtttggt gatttacatg gcgtagaaaa ataaaggaca 1200
 atataataaa aaccttgga taticagttaa gatgccttaa tttcaaatca gtggagtata 1260
 ttccgacttc cgtattaatt tcgctctaatt caagtctttt aaaagattaa ataataaaaa 1320
 gtttttatag tcacgaaaac attatgacca caaaattttg tcctttaagc tttttagacc 1380
 ataaatttca aaaaaaaaaa tttgactgaa atatttaata ccacatattt ttaaaaaatt 1440
 attttttct tacatttagt gtcaagtaaa attagatgtg ataggaaaaa agaatttca 1500
 tttcgtctag taaggaaagt acaaaattgc ttatgtaact cgtaatatat cagaaatggt 1560
 ttcccagggtg taaagcacia acaacggagc ccacatcagt aatgtgtaaa tgtgtaacgt 1620
 ttactctctt ttttctca aataattgca aagaaaatga ctttcctgca agtcttctt 1680
 gccctttta tagaagggtga cgttgactcg taccagattt tcttgcata gtattaatca 1740
 gtagtaatat cagtcacggc gaggtttaa atttagctta ttagtaacgt aaataatttt 1800
 taaattgtca tatttagtta atctaaaata tcatgcaatt tttatatca agtttgatat 1860
 gttgacgtaa ataatagaac aataatttat aaacttgatt aaattgcatt gataataaat 1920
 caaaatatta tttgaacgat taaaatctca cagttaattt tgcactctgc aaaaaaaaaat 1980
 atccatcata tttccttgat tatcatttga tgccgtctta gtttctttta aaaaaattta 2040
 gaatttatat caaatatgat ttttaatta ctgcaactta caagcagact aagtttgata 2100
 tttcctaatt tcaacgatat acggttacta cggaaggcat ttactagaaa tactctgaga 2160
 tgttactgca attattatta ttattatttt aaaaagagaa aaaaataact tttaaagctc 2220
 catgtgaaat tatgtatatt ttattatagc atgaagtgc cccatttttt atctcataaa 2280
 taacattgat cccatatttt tctactgtat catcactatc atgaaaaata catctagatt 2340
 actgagatgt ttattggcag tagtatctac agatacaaca gatgcttcta gttctattga 2400
 tgttttcatt ttgacaaaaa ttttaattgag aaagcaaaaag attttgcaag aattcttagg 2460
 gttttattca aaaaaaaaaa agaattctta gaaatataag ttttggcaat taaataattc 2520
 cagtaattgg gaaaaaacac ttgaataggc tatagaagta aaagaaactt ctatatatta 2580
 ccaggcagca gagtttcca aaatcctttt ttctaaaaaa aaaatagtag aaaatgagca 2640
 atgtaatttc ttttaagtaac attctctatt tagtaaaatg tccatttttc taatgaggta 2700
 aaagcaatag caaataaaaag aaagtttatt cttttttttc gaggggtgtg ccgaccaagg 2760
 cttaaataga taggaataat cacctaatta agaaaaacta cctatcaatt tttgtctcgg 2820
 ttggatttca acatgatacc tcatagttct acgtacgcc acttcaatta ccactaggaa 2880
 caccgtttgg tgcagaaaaa ttttggctat aaacttcaat ttttaagcctt catataaaca 2940
 ataaaagagc taattagcag ttaacagtcg agttaatata gctgaataat gcagttcaac 3000

taaatattgta tggaaatggt gaaaagcaca aagggtgactt atccttaggt actttatagc 3060
 tttatctttt aaaaagtagt agcaagatat gatatgattc cttgaagaag aaaaggtcac 3120
 tgtgactctt tatttctatc agtacctggt tgaataaaat tggctaagaa agttgtaaaa 3180
 tggactagca ggacaagaat ctcaatttgg tgttgcctta ccatctttag agtgacagca 3240
 atcaaaaacc caaaaattaa ataaataata agaaaagaaa aagatgagtt attggaaagg 3300
 gtaaaatgaa tgaagataag aatactccat tcagtccaaa atattaagct agcatttggg 3360
 catagatttg gttgaagctt gaagaaaaga aaaaagagtt tttgaagatt atatgaaaa 3420
 taatTTTTga aagttAAAat tgtgttaggg aagttttgtg attcaaaaac tactctagaa 3480
 ctgtTTTTgg gatttAAata ttttcttttc aacatgtgcc aaaaaatgat taaaatctat 3540
 aaacgaacac ataattgaaa aaagctctca aattttatga ccaaacagga gcttattggt 3600
 ttggcaaatt gaatttgttt cgaaatactt gatgattaag gagagacaaa ggatagtata 3660
 gacaaaaggc tattagtatt tgtaattgag gctattaaat gtctttttaa agcgatgtgc 3720
 aaaaacctta aaaaagacga attatatgga ttatattaga agtagtatta aattttaatg 3780
 gaacttagtg caatcatttt acaagggcat agtgttaaag ctagaaatgc tgattcttat 3840
 agctggcttt gtcattgtgca g 3861

<210> 9
 <211> 98
 <212> ADN
 <213> Nicotiana tabacum

<220>
 <221> exón
 <222> (1)..(98)

<400> 9

tgg ctg gat caa ttg ttt tac acg att att ggg aag ctg gta cta ttg 48
 Trp Leu Asp Gln Leu Phe Tyr Thr Ile Ile Gly Lys Leu Val Leu Leu
 1 5 10 15
 tct tct tat tcg cca ttg cag aat ggc tag agt caa ggg caa gtc aca 96
 Ser Ser Tyr Ser Pro Leu Gln Asn Gly Ser Ser Gln Gly Gln Val Thr
 20 25 30
 ag 98

<210> 10
 <211> 4063
 <212> ADN
 <213> Nicotiana tabacum

<220>
 <221> Intrón
 <222> (1)..(4063)

<400> 10

gttt[̄]gtgaat tttcgtccct gtttaatttc cttgcacaag aaatggctag tgtacatcta 60
ctttcctagg atgacagtaa tgtgtgtttt ttttatttat tgtgatacca aaagtatgaa 120

cacctaattt	ttctcaggat	acataatttc	cactttggcc	aaactgactt	taacaagttg	180
tctcttggat	tacgccacat	cgaacctaaa	agtgttggca	ctaccatgtc	aactttgtgt	240
gtcttatagg	gatttgagac	atthttgtcta	gggtgtcata	tggacccttt	cttcatgagc	300
tcgatagcac	aaaagcttgc	tagtcattct	acttgacctg	cctcattagc	ccgccctacg	360
catgggcac	acaaaccagg	ccacacgtag	gaattgagtc	tcctccctgc	ggttcaccca	420
cagaccttac	agttttgtcg	cttgggtaat	gccacaacta	gcccgataac	gtgcttacca	480
tgtgaacttg	taccatatat	tacctagcac	ttcaccttcc	tctccctttg	cgacgcgcct	540
aaaatgtcat	atgcaccggt	ttttccgaag	tttgc tagtc	tagaagccta	ttagttctta	600
ggcttaacct	gcctcattaa	ccactctcca	tcataggcgt	caccttaatt	taaaagaatt	660
tgttcttaga	aggctctaac	ttaaaccaga	aatcagttca	gctgtcttct	gttcttttac	720
ctcaataaca	ttgtataatg	gtaaggacta	aactgcagct	ctcttgtgga	tgagtggatt	780
aaatttcatt	ctgaaaatta	atttacttca	cagctctatt	tggagaaaat	aaagattaaa	840
tattgtgaga	atgcacggga	gaaaaatatt	atattgatta	aagtgttgta	caaccctatt	900
tatatacagt	aattatataa	taatatgtat	ctacttcccg	atgtgggaca	ctaaatatga	960
ctaactactt	aacacttcct	ctcaagccgg	tgcatataaa	tcatacgtac	cgagcttggt	1020
acagatgtaa	ccaatacgag	aaccagtaag	agacttagtg	aaaatatttg	ctagctaatc	1080
atcagacttt	acaaactttg	taacaatata	tcctgagagt	atcttttctc	tgacaaagtg	1140
acagtcgata	tcaatgtggt	tagtcctctc	atggaatacc	ggatttgacg	caatatgaag	1200
agcagcttga	ttatcacaca	ccagttccat	cttattgatt	tctccgaatt	tcaactcctt	1260
gagcaactgc	ttgatccaca	ctagctcaca	cgttgccata	gccatggccc	gatattcggc	1320
ttcggtgcta	gatcgagcaa	ctacattctg	tttcttgctc	ttccaagaga	ccaattacc	1380
tcctactaga	acacaatata	cagacgtaga	acgtttatca	gaaggatgat	ctgcccaatc	1440
agcatttgtg	taccctgtaa	tctgctcgta	gcctcgatcc	tcgaatagta	accctttgcc	1500
tggagctgac	tttatatata	gaagaatgcg	aacaactgca	tcccagtgac	tatcacaggg	1560
agaatccata	aactgactta	caacactcac	cggaaaagaa	atgtctgggt	tagtcaccgt	1620
gaggtaatcc	aatttgccaa	ccaacctccg	atatctcata	ggatctctaa	gaggctcccc	1680
ctgtccattg	cagaagctta	gcattcggat	ccataggagt	gtcaacaggt	ctacatccca	1740
tcattccagt	cttctcaaga	atgtctaagg	catacttccg	ctgtgaaata	acaatacctg	1800
agctagactg	agcgacctca	atacctggaa	aatacttcaa	tctgcctaga	tccttagtct	1860
ggaagtgcca	aaagagatgt	tgcttcagat	tagtaatacc	atcctgatca	ttgtcagtaa	1920
taacaatata	gtctacataa	accaccatag	taagggttatg	aacaaaacac	gtgcttctaa	1980
agacacgggg	tggaagagag	aacaaaggta	agtggggaaa	caggacagag	aatggaactt	2040
gattctggat	agctgaagat	gacatacgat	taataagata	gcaagatgta	agaactgcat	2100
cacccccaaa	atgcaacgga	gcatgagatt	gtatgagtag	agtacgagta	gtttcaataa	2160
gatgtctact	ctttctttca	gctaccccat	tttgttgaga	tgtgtacgga	caagatgttt	2220

gatgaataat cccatgagag ttcataaact tctgaaatgg ggaagacaaa tactctaggg 2280
cattatcact acgaaatgtg cggatagaaa ccccaaattg attttgaatt tcagcgtgga 2340
aggtctgaaa aatagaaaat agctcagacc gatttttcat caaaaatata caagtgcacc 2400
tggaaataatc atcaatgaaa ctgacaaagt agcggaaatcc caaggtagaa ctgacccgac 2460
taggacccca aacatctgaa tggaccaaaag taaaagggtga cgctgagggg aatgggagtg 2520
ggatatactta ccgagctgtc atgactcata ctctagagtg gacaagtgag ataaaccagg 2580
tatcattttc taaagttttg acaaaactggg atgtcccaac cgtttatgta ataaatctgg 2640
tgaatcggta acaagacaag ttattaaagg aagacaagat gcgagtccat atgattttgc 2700
aaggataagg taataaaatc catctaattc atgtctgata ccaatgatcc gccccgtact 2760
atgttttctt ataaaaataa ggtcatcaag aaataaaaca gcgcatttaa gtgatttggc 2820
taagcgacta acggctatga gattaaaagg actattggga acataaagga ctgaatctaa 2880
aggtgaggaa ggaagtgggc ctgcttgacc tattgcagtt gccatggttt gagactcatt 2940
ggccattgtg actgttagaa gagattgaga atatgaatac tggtgaaaag agatttgta 3000
ccagaaatat gatcagatgc atttgaatca atgacccaag actcaaagg ttaagattcg 3060
gagacacaag tcacgtact atctgtttga acaatggaag ctatccctga agatgtctgt 3120
ttacatgctt tgtactgaag gaactcagta taatccgata aagaaacat ctggattgga 3180
ttcaacgaat tggatccaac agattgtgag ttaaaggctt ctgatacga tgcattata 3240
atgttggtcc gaaaaaaca aaaattcctg gaaattacta ttcacgccg aaaaataaa 3300
aagtgatctg aatttgattt aaattggatg ggtatgctcg tatttgcaag gagaagacac 3360
tgccctgaag gaattttacc aaattctggc cggaaattgc ctcatgtgcg gcgtgtgggc 3420
gtcagaactt cgtcggaaaa attcttccg cggcgcgtga gggcgcgtgt agcctttttt 3480
gccagagatt ttttaatagg ttggctgctg agctctgaac tacttcccg tgggtgtacc 3540
ttttgcacaa cactgacaga tagtatgatt cttgcggaca gacctat tggccgaaaa 3600
gagcttccg ttgactgttt tcttttccc gagtcgctgg aatttatgca ctacgataaa 3660
tttctcagg ttgctctgat accatgtgag aatgcacggg agaaaattat tatattgatt 3720
aaagtattgt acaaccctat ttatatacag taattacata ataataggta tctacttccc 3780
gatgtgggac actaaacatg actaactact taacaaatat ggtattggaa ttagtctct 3840
ttgacataaa cgacataagc ctatgcttat cttttcttac ttttttagca atgctaaata 3900
gtaggtccta actacaaact ttatagcaca ctgaaaatta ccaaaatata gagatggcca 3960
atgaaggttt tgtctgctaa cataactctg tgtctttatt ttctcactga tattgtatat 4020
ggataaagca ttctgataaa tgaaaacctt tatggttatg tag 4063

<210> 11
<211> 256
<212> ADN
<213> Nicotiana tabacum

<220>

ES 2 527 272 T3

<221> exón
<222> (1)..(256)

<400> 11

gct acc gcc gct atg tca tca ctg gtc aat ata gtc cct cca aca gca	48
Ala Thr Ala Ala Met Ser Ser Leu Val Asn Ile Val Pro Pro Thr Ala	
1 5 10 15	
gtt tta gcg gaa agc gga gaa gtc gta aat gtt gat gaa gtc aag gtg	96
Val Leu Ala Glu Ser Gly Glu Val Val Asn Val Asp Glu Val Lys Val	
20 25 30	
aat agc att ctt gct gtg aaa gct ggt gaa act ata cct att gat gga	144
Asn Ser Ile Leu Ala Val Lys Ala Gly Glu Thr Ile Pro Ile Asp Gly	
35 40 45	
gtt gta gtg gaa ggg gaa tgt gac gtg gac gag aaa aca ctg aca ggc	192
Val Val Val Glu Gly Glu Cys Asp Val Asp Glu Lys Thr Leu Thr Gly	
50 55 60	
gag tcg ttt cca gtt tct aag caa aga gat tca acg gtc tgg gct ggc	240
Glu Ser Phe Pro Val Ser Lys Gln Arg Asp Ser Thr Val Trp Ala Gly	
65 70 75 80	
gct aca aat cta aat g	256
Ala Thr Asn Leu Asn	
85	

<210> 12
<211> 85
<212> ADN
<213> Nicotiana tabacum

<220>
<221> Intrón
<222> (1)..(85)

<400> 12

gtagtatagt atttcttcat gcttcattta tttagtgtg aaacttcaag tattgtttgt	60
taatgttatt tgctcaattc ttcag	85

<210> 13
<211> 142
<212> ADN
<213> Nicotiana tabacum

<220>
<221> exón
<222> (1)..(142)

<400> 13

ES 2 527 272 T3

gct ata tca gtg tta aga cta cgg ctt tgg ctg aag att gtg cgg tgg	48
Ala Ile Ser Val Leu Arg Leu Arg Leu Trp Leu Lys Ile Val Arg Trp	
1 5 10 15	
cta gga tgg cac agc ctg tcg aag atg ctc aga aca aga aat caa aaa	96
Leu Gly Trp His Ser Leu Ser Lys Met Leu Arg Thr Arg Asn Gln Lys	
20 25 30	
ccc aaa gat aca tcg aca agt gtg cta aat att ata cac cag gct a	142
Pro Lys Asp Thr Ser Thr Ser Val Leu Asn Ile Ile His Gln Ala	
35 40 45	

<210> 14
 <211> 309
 <212> ADN
 <213> Nicotiana tabacum

<220>
 <221> Intrón
 <222> (1)..(309)

<400> 14

gtgaatctta tgttgtgcca catcaagtca aaaaatgcac gtaccgtgtg aacttgttct	60
ttgtcttatg aatcacgtca ctatcctctc ccttttcgat atgagatttc cctaagggtg	120
catatgaatc ctttcttcgg aagcttgcca gcataggagt ctatcagtcc tttcacttga	180
cccgccctct cagcctgcct gcagtcatgg gcgtcgcact actatattgc tctttcgttt	240
aaaacttttt atttctaata cttccctgct ctttgtgtat gtctaatttc gactggtgat	300
gttttgcag	309

<210> 15
 <211> 328
 <212> ADN
 <213> Nicotiana tabacum

<220>
 <221> exón
 <222> (1)..(328)

<400> 15

ES 2 527 272 T3

caa ttg tgg cta tac cag ctt ctt tgg caa ttg ttc cta ctg cat taa	48
Gln Leu Trp Leu Tyr Gln Leu Leu Trp Gln Leu Phe Leu Leu His	
1 5 10 15	
gag ttc aca atc gaa atg aat ggt atc gct tgg ctt tgg tca cat tgg	96
Glu Phe Thr Ile Glu Met Asn Gly Ile Ala Trp Leu Trp Ser His Trp	
20 25 30	
tga gtg cat gtc cgt gtg cac tcg ttc tat cta cac cag ttg cca tgt	144
Val His Val Arg Val His Ser Phe Tyr Leu His Gln Leu Pro Cys	
35 40 45	
gtt gcg cac ttt caa aag cag caa cgt ccg gtc ttc tgt tta aag gag	192
Val Ala His Phe Gln Lys Gln Gln Arg Pro Val Phe Cys Leu Lys Glu	
50 55 60	
cag agt acc ttg aga ctc tag cta aaa tca aaa tca tgg ctt ttg aca	240
Gln Ser Thr Leu Arg Leu Leu Lys Ser Lys Ser Trp Leu Leu Thr	
65 70 75	
aaa cag gga cta taa cta aag gag aat tta tgg tga ccg agt tca agt	288
Lys Gln Gly Leu Leu Lys Glu Asn Leu Trp Pro Ser Ser Ser	
80 85 90	
ctc tga ttg atg gtt tta gtc tca ata cac tgc ttt act g	328
Leu Leu Met Val Leu Val Ser Ile His Cys Phe Thr	
95 100	

<210> 16
 <211> 463
 <212> ADN
 <213> Nicotiana tabacum

<220>
 <221> Intrón
 <222> (1)..(463)

<400> 16

gtaaaggtta ccaactacatc atattctttt atgttgccaa agagaattca aaatcttaac	60
tggttatctt tcacggcaca ttgatagcga tataacatga ttgatttata tcatatattc	120
ataaaagatg aatagggag tgccacattc acattctcat attgaagttt ctgaaatggc	180
tctaattggtt caccatagag caaaataaac atatagacac aacgtcagcc gtctgatatt	240
caggaactta gatggaatag ttggatctta tacattgagg acacataaaa gtacttggtc	300
atataaattt tagaaatata atcaatgtat tataatctaa aattcttcaa atattcttga	360
tactgcaata caaaagcaca tggcacactg aatagaagcc ttgttcggtg gtctaaaaca	420
ttcgtttaga gtaaatactg agttgtctag tgaatatttt cag	463

<210> 17
 <211> 203
 <212> ADN
 <213> Nicotiana tabacum

<220>
 <221> exón
 <222> (1)..(203)

ES 2 527 272 T3

<400> 17

ggt ttc aag cat tga gag caa gtc agg tca tcc gat ggc aac cgc tct	48
Gly Phe Lys His Glu Gln Val Arg Ser Ser Asp Gly Asn Arg Ser	
1 5 10 15	
ggt gga cta tgc aca atc aaa ttc cgt tga gcc aaa gcc tga tag agt	96
Gly Gly Leu Cys Thr Ile Lys Phe Arg Ala Lys Ala Ser	
20 25	
tga gcg gtt tca aaa ttt tcc tgg tga agg gat att tgg aag aat tga	144
Ala Val Ser Lys Phe Ser Trp Arg Asp Ile Trp Lys Asn	
30 35 40	
tgg aat gga aat cta tgt cgg gaa tag gaa aat ttc ttc aag agc tgg	192
Trp Asn Gly Asn Leu Cys Arg Glu Glu Asn Phe Phe Lys Ser Trp	
45 50 55	
atg tac cac ag	203
Met Tyr His	

<210> 18

<211> 145

<212> ADN

<213> Nicotiana tabacum

<220>

<221> Intrón

<222> (1)..(145)

<400> 18

gtāāatggtt gaatcatttc ttatgctcat agtagagata aaacatcaga gttataatta	60
taagtatatg atttctccag ttaattttgc tgtagattt tctttgacct gtttagcact	120
aatgcggtgg atgtttgaat ttcag	145

<210> 19

<211> 203

<212> ADN

<213> Nicotiana tabacum

<220>

<221> exón

<222> (1)..(203)

<400> 19

ES 2 527 272 T3

tac cag aaa tag agg gtg ata gtt tca aag gaa agt ctg ttg gat aca	48
Tyr Gln Lys Arg Val Ile Val Ser Lys Glu Ser Leu Leu Asp Thr	
1 5 10 15	
tat ttt tgg gat cat ctc cag ctg gaa ttt tca gtc ttt ccg atg ttt	96
Tyr Phe Trp Asp His Leu Gln Leu Glu Phe Ser Val Phe Pro Met Phe	
20 25 30	
gtc gaa ttg gtg taa aag aag caa tga gag aac tga agc aga tgg gta	144
Val Glu Leu Val Lys Lys Gln Glu Asn Ser Arg Trp Val	
35 40	
tca aaa ccg cga tgc tta ctg gtg atc gtt atg cag ctg cca acc atg	192
Ser Lys Pro Arg Cys Leu Leu Val Ile Val Met Gln Leu Pro Thr Met	
45 50 55 60	
tgc agg atc ag	203
Cys Arg Ile	

<210> 20
 <211> 619
 <212> ADN
 <213> Nicotiana tabacum

<220>
 <221> Intrón
 <222> (1)..(619)

<400> 20

gtatattaat aattctgcat tacgctgaaa tgattataaa accctttgga ttattgttta	60
gtcttaagaa ttttactga actcttattg tttccttctt ctatcatcaa cattggttaa	120
acatttcac taaatttaga gaacgatca ccaagtaagt gctttacctt tacagggtca	180
tataaaatac ttaagacagt gtgatgtgaa gatgaagggtt aaatggtgat ctggataaac	240
caagttatta tcacaactaa tataagatat gctattgttc tccaataatt ggacgatttt	300
cggacgtacg acgtacaatt cttcacatat gaaacctaca tcagacgtac atgacacgct	360
atgttttagca taaagagtca agattagcat gatgatttaa gctgaatctg aatttcaagt	420
atctattctt gtattgtacc caggggcgga actagtgttg tgcttagagg tctcaaacat	480
tgtatttgtg ttaaaaaatt cacttcatat gtatttaa atttatcca gagcagtgag	540
ccatattttt tagaatccag aaccataaa ctcaaatca tagatccacc tctgattgta	600
agtcggaaca attatgcag	619

<210> 21
 <211> 1498
 <212> ADN
 <213> Nicotiana tabacum

<220>
 <221> exón
 <222> (1)..(1498)

<400> 21

tta Leu 1	ggt Gly	gga Gly	gct Ala	ttg Leu 5	gat Asp	gaa Glu	ttt Phe	caa Gln	gca Ala 10	gaa Glu	ctc Leu	cta Leu	cca Pro	gag Glu 15	gac Asp	48
aag Lys	gca Ala	aca Thr	atc Ile 20	atc Ile	aag Lys	ggt Gly	ttt Phe 25	cag Gln	aag Lys	gaa Glu	gct Ala	cca Pro	aca Thr 30	gcg Ala	atg Met	96
ata Ile	ggc Gly	gac Asp 35	ggc Gly	ctt Leu	aat Asn	gat Asp	gct Ala 40	cct Pro	gca Ala	tta Leu	gca Ala	aca Thr 45	gct Ala	gac Asp	att Ile	144
ggc Gly 50	atc Ile	tca Ser	atg Met	ggc Gly	atc Ile	tct Ser 55	ggg Gly	tca Ser	gct Ala	ctc Leu	gct Ala 60	aaa Lys	gaa Glu	aca Thr	ggc Gly	192
cat His 65	gct Ala	ata Ile	cta Leu	atg Met 70	aca Thr	aat Asn	gac Asp	atc Ile	gga Gly 75	aga Arg	ata Ile	ccg Pro	aaa Lys	gct Ala	gca Ala 80	240
cgt Arg	ctt Leu	gct Ala	aga Arg 85	aga Arg	ggt Val	cga Arg	agg Arg	aag Lys	att Ile 90	ggt Val	gag Glu	aat Asn	atg Met	att Ile 95	ata Ile	288
tca Ser	gcc Ala	ggt Val 100	aca Thr	aag Lys	gct Ala	gcc Ala	ata Ile 105	ggt Val	gca Ala	ttg Leu	gca Ala	ata Ile	gca Ala 110	ggt Gly	tat Tyr	336
cca Pro	ttg Leu	ggt Val 115	tgg Trp	gct Ala	gct Ala	gtc Val	ctc Leu 120	gca Ala	gat Asp	act Thr	ggg Gly	aca Thr 125	tgc Cys	ttg Leu	cta Leu	384
gtg Val 130	att Ile	ttg Leu	aac Asn	agc Ser	atg Met	cta Leu 135	ctt Leu	cta Leu	cga Arg	gga Gly	ggc Gly 140	aca Thr	cgc Arg	aga Arg	cat His	432
ggg Gly 145	aaa Lys	aaa Lys	tgt Cys	tgg Trp	aga Arg 150	tct Ser	tct Ser	act Thr	cct Pro	tcg Ser 155	cat His	gct Ala	ccc Pro	cac His	cac His 160	480
aaa Lys	gac Asp	aaa Lys	gct Ala	tca Ser 165	tgt Cys	tgc Cys	aag Lys	tcg Ser	gaa Glu 170	aat Asn	gct Ala	ccc Pro	cag Gln	ctg Leu 175	tgt Cys	528
tgc Cys	tct Ser	gat Asp	att Ile 180	gag Glu	tca Ser	caa Gln	aag Lys 185	aaa Lys	tgt Cys	aca Thr	agt Ser	caa Gln	tca Ser 190	tgc Cys	tcg Ser	576
tcc Ser	gag Glu	gtg Val 195	tgt Cys	ggt Val	cca Pro	aga Arg	tgt Cys 200	caa Gln	cct Pro	gtc Val	tcc Ser	tcg Ser 205	gga Gly	tca Ser	aag Lys	624
tca Ser	tgt Cys 210	gga Gly	aat Asn	aat Asn	cag Gln	tgc Cys 215	cca Pro	gac Asp	tcc Ser	att Ile	gaa Glu 220	aat Asn	agt Ser	ggt Gly	ttt Phe	672

cat His 225	tct Ser	cat His	cgc Arg	cg Arg	cct Pro 230	caa Gln	tgc Cys	tgc Cys	tcg Ser	tcg Ser 235	aag Lys	atg Met	gct Ala	gct Ala	aaa Lys 240	720
gca Ala	tgc Cys	caa Gln	tct Ser	gca Ala 245	ggt Val	tca Ser	gaa Glu	tca Ser	aag Lys 250	tca Ser	tgc Cys	gga Gly	aat Asn 255	aat Asn	cag Gln	768
tgc Cys	cca Pro	gac Asp	tcc Ser 260	ggt Val	gaa Glu	aat Asn	agt Ser	ggt Gly 265	ttt Phe	cat His	tct Ser	cat His	ccc Pro 270	cg Arg	cct Pro	816
gaa Glu	tgc Cys	tgc Cys 275	tcg Ser	tcg Ser	aag Lys	atg Met	gct Ala 280	gct Ala	aaa Lys	gcg Ala	tgc Cys	caa Gln 285	tct Ser	gca Ala	ggt Val	864
tca Ser	gaa Glu 290	tca Ser	aag Lys	tca Ser	tgt Cys 295	gga Gly	aat Asn	aat Asn	cag Gln	tgc Cys	cca Pro 300	gac Asp	tcc Ser	ggt Val	gga Gly	912
aat Asn 305	agt Ser	ggt Gly	ttt Phe	cat His 310	tct Ser 310	cat His	ccc Pro	cg Arg	cct Pro	caa Gln 315	tgc Cys	tgt Cys	tca Ser	tcg Ser	aag Lys 320	960
atg Met	gct Ala	gct Ala	aaa Lys	gca Ala 325	ggc Gly	caa Gln	tct Ser	gca Ala	ctt Leu 330	tca Ser	gaa Glu	tca Ser	aag Lys	tca Ser 335	tgt Cys	1008
gga Gly	aat Asn	aac Asn	aat Asn 340	tgc Cys	tca Ser	gac Asp	tcc Ser	att Ile 345	cac His	aag Lys	agt Ser	aat Asn	tgt Cys 350	cat His	tct Ser	1056
tta Leu	act Thr	aac Asn 355	tct Ser	cta Leu	gta Val	tgt Cys	tct Ser 360	tcc Ser	aag Lys	atg Met	tct Ser	gct Ala 365	cca Pro	caa Gln	tgt Cys	1104
cat His 370	tct Ser	gct Ala	act Thr	tca Ser	agc Ser	aac Asn 375	aaa Lys	tca Ser	tgt Cys	gga Gly	agt Ser 380	acc Thr	aag Lys	tgc Cys	tcc Ser	1152
gac Asp 385	ttc Phe	agt Ser	gat Asp	aaa Lys	aaa Lys 390	tgt Cys	tgt Cys	caa Gln	tcc Ser	gac Asp 395	aaa Lys	att Ile	cct Pro	caa Gln 400	gcg Ala 400	1200
tgc Cys	tct Ser	acc Thr	aag Lys	aag Lys 405	tct Ser	gct Ala	cca Pro	ggg Gly	tgt Cys 410	caa Gln	tct Ser	gca Ala	ggt Val	tct Ser 415	ggg Gly	1248
tct Ser	aaa Lys	tca Ser	tgt Cys 420	gga Gly	aat Asn	agc Ser	aag Lys	tgt Cys 425	tca Ser	gac Asp	tca Ser	aaa Lys	gac Asp 430	aat Asn	agt Ser	1296
agc Ser	cat His	cct Pro 435	tca Ser	cat His	ccc Pro	gat Asp	cat His 440	caa Gln	aca Thr	tgc Cys	atg Met	tct Ser 445	aag Lys	ttg Leu	tgt Cys	1344
gct Ala 450	cca Pro	caa Gln	agc Ser	caa Gln	tct Ser	gca Ala 455	act Thr	tca Ser	agc Ser	tcc Ser	agg Arg 460	aca Thr	tgt Cys	gga Gly	aat Asn	1392
aca Thr 465	aag Lys	tgc Cys	tcg Ser	gac Asp	acc Thr 470	aat Asn	agc Ser	aag Lys	aat Asn	tct Ser 475	tgt Cys	tat Tyr	tca Ser	caa Gln	acc Thr 480	1440
aac Asn	tct Ser	gaa Glu	tca Ser	tgc Cys 485	tct Ser	tca Ser	aag Lys	atg Met	tct Ser 490	ggt Gly	cca Pro	tca Ser	tgc Cys	aaa Lys 495	act Thr	1488

gct aat tca g
Ala Asn Ser

1498

<210> 22
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Nicotiana tabacum

<220>
 <221> Intrón
 <222> (1)..(321)

<400> 22

gtacgaccag attcctcttc ttgttaatac cccccgaacc aaactatagg atctaaagta	60
ttatttggcc ctctgtcgga ggatataatg gttagttaaa cctgaaatca tgtagtctat	120
gaattgcaaa tctctagcat cgtgacaaaa ttcttagatc atatacaact ttgagaatat	180
aggctgtcac agacccttct tcatactgca ttagaggaga gcagccaatt ttttattcat	240
gatttgaac aaataaagtt cttcttgagg tgtatggaga ggctatgaga atcatttgct	300
gagtaggttt gagattttca g	321

<210> 23
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> Nicotiana tabacum

<220>
 <221> exón
 <222> (1)..(333)

<400> 23

ES 2 527 272 T3

ggt	caa	ggt	cat	gca	gaa	ata	aga	agt	gcc	agg	act	ctg	caa	ccg	aga	48
Val	Gln	Gly	His	Ala	Glu	Ile	Arg	Ser	Ala	Arg	Thr	Leu	Gln	Pro	Arg	
1				5					10				15			
aca	ggt	ttc	att	cac	cac	tta	cta	atc	cac	tca	gtg	ggg	aaa	agc	ttt	96
Thr	Val	Phe	Ile	His	His	Leu	Leu	Ile	His	Ser	Val	Gly	Lys	Ser	Phe	
			20					25					30			
cgg	agc	aga	aaa	gct	tgg	att	tag	tcc	gaa	aag	ata	agg	aat	caa	gtc	144
Arg	Ser	Arg	Lys	Ala	Trp	Ile		Ser	Glu	Lys	Ile	Arg	Asn	Gln	Val	
			35					40					45			
atg	atc	ttc	gtc	atg	gct	gct	ctg	acg	agg	aac	atg	atc	ata	caa	att	192
Met	Ile	Phe	Val	Met	Ala	Ala	Leu	Thr	Arg	Asn	Met	Ile	Ile	Gln	Ile	
			50				55					60				
tag	aca	agg	cat	atg	aca	ggt	gtg	cct	tac	aag	aat	gtt	ggt	att	cgg	240
	Thr	Arg	His	Met	Thr	Val	Val	Pro	Tyr	Lys	Asn	Val	Val	Ile	Arg	
			65				70					75				
ttc	aag	gca	ata	aaa	ctg	atg	tat	cag	aaa	ctg	gaa	tcc	agg	aaa	ctg	288
Phe	Lys	Ala	Ile	Lys	Leu	Met	Tyr	Gln	Lys	Leu	Glu	Ser	Arg	Lys	Leu	
		80				85					90					
ctc	att	gtg	aca	gca	cca	atc	aaa	cat	gcc	aaa	ctg	caa	ggt	cag		333
Leu	Ile	Val	Thr	Ala	Pro	Ile	Lys	His	Ala	Lys	Leu	Gln	Val	Gln		
95					100					105						

<210> 24
 <211> 220
 <212> ADN
 <213> Nicotiana tabacum

<220>
 <221> Intrón
 <222> (1)..(220)

<400> 24

gtaggcacta	ccaaatcata	tgatccaaag	tgctctcca	ccttcactcc	tacaataaat	60
gttcgatcaa	acttcataag	aagatagcat	atgcatcgca	aatctctaaa	aaaatgatgg	120
ataatggttac	tcaccaacta	gtttgagata	gaagtttaac	tgattgctat	atatcgtaa	180
ctataaaaaa	ctacttgta	attagagctg	agattttcag			220

<210> 25
 <211> 774
 <212> ADN
 <213> Nicotiana tabacum

<220>
 <221> exón
 <222> (1)..(774)

<400> 25

gat Asp 1	cga Arg	tga	cat His	gcg Ala	gaa Glu 5	atg Met	ata Ile	aga Arg	tcc Ser	tgg Trp 10	act Thr	ctc Leu	taa	gca Ala	tcc Ser	48
atg Met 15	ggt Val	gtc Val	att Ile	cgc Arg	atg Met 20	ata Ile	atc Ile	cac His	tcc Ser	acg Thr 25	agg Arg	aga Arg	aca Thr	acc Thr	tgg Trp 30	96
agc Ser	aga Arg	aaa Lys	tct Ser	tgg Trp 35	atg Met	ttg Leu	ttg Leu	gag Glu	aag Lys 40	gta Val	taa	aat Asn	cac His	ctc Leu	atg Met 45	144
ctg Leu	tcg Ser	gtc Val	atg Met	gct Ala 50	gtt Val	cgg Arg	aca Thr	agg Arg	aac Asn 55	acg Thr	atc Ile	act Thr	cac His	atc Ile 60	cag Gln	192
aaa Lys	agg Arg	cat His	atg Met 65	aca Thr	gtt Val	gtg Val	caa Gln 70	cag Gln	atg Met	att Ile	gtt Val	gtt Val	ttt Phe 75	cag Gln	tcc Phe	240
aag Lys	tcc Ser	atg Met 80	gca Ala	ttg Leu	acg Thr	acg Thr	tat Tyr 85	caa Gln	aaa Lys	gtg Val	aaa Lys	ttc Phe 90	aag Lys	aaa Lys	ctg Leu	288
ctc Leu	att Ile 95	gtg Val	aca Thr	gca Ala	caa Gln	agc Ser 100	aga Arg	gca Ala	tgg Trp	tca Ser	tct Ser 105	cca Pro	gca Ala	gct Ala	gca Ala	336
aac Asn 110	atg Met	aac Asn	caa Gln	aag Lys	atc Ile 115	agg Arg	taa	atc Ile	act Thr	gtg Val	gac Asp 120	ttc Phe	act Thr	cta Leu	aaa Lys	384
cta Leu 125	ctc Leu	caa Gln	ctg Leu	atg Met	aag Lys 130	aac Asn	tag	cca Pro	agc Ser	tgg Trp	tta Leu 135	gaa Glu	gat Asp	gct Ala	gcg Ala	432
aat Asn	aca Thr	aac Asn	cat His	gcc Ala	acg Thr	acg Thr	tcc Ser	gtt Val	ctg Leu	gct Ala	gca Ala	gga Gly	agc Ser	atg Met	ctg Leu	480
140					145					150						155
cag Gln	aat Asn	gtg Val	gtc Val	caa Gln 160	ccg Pro	ttc Phe	gat Asp	caa Gln	cta Leu 165	tca Ser	ata Ile	tct Ser	tac Tyr	ggg Gly 170	aca Thr	528
acc Thr	atc Ile	atc Ile	att Ile 175	acc Thr	tag	act Thr	gca Ala	gtg Val	gtc Val 180	gta Val	agg Arg	ttt Phe	gtt Val	cgc Arg 185	tgt Cys	576
tgg Trp	aga Arg	aga Arg	gac Asp 190	aca Thr	tcg Ser	gtg Val	gat Asp	gct Ala 195	gtg Val	aca Thr	gct Ala	tca Ser	gaa Glu 200	aag Lys	aat Asn	624
gtt Val	gtg Val	cca Pro 205	aga Arg	aga Arg	acc Thr	acc Thr	ttg Leu 210	gag Glu	caa Gln	gtt Val	tcg Ser	gag Glu 215	gag Glu	gtt Val	tat Tyr	672
cag Gln	aaa Lys 220	ttg Leu	tca Ser	tag	agt Ser	aga Arg	tgc Cys 225	aat Asn	ccg Pro	aag Lys	tgt Cys	aca Thr 230	tat Tyr	gtt Val	gta Val	720
aac Asn	ttc Phe 235	cta Leu	cct Pro	att Ile	tta Leu	tct Ser 240	tca Ser	aga Arg	agt Ser	tga	gct Ala 245	gct Ala	aat Asn	ttg Leu	aac Asn	768
aaa Lys	gca Ala 250															774

<210> 26
 <211> 498
 <212> ADN
 <213> Nicotiana tabacum

<220>
 <221> Intrón
 <222> (1)..(498)

<400> 26

agggcgaatt ctgcagatat ccatcacact ggcggccgct cgagcatgca tctagagggc	60
ccaattcggc ctatagtgag tcgtattaca attcactggc cgtcgtttta caacgtcgtg	120
actgggaaaa ccctggcggt acccaactta atcgccttgc agcacatccc cctttcgcca	180
gctggcgtaa tagcgaagag gcccgcaccg atcgcccttc ccaacagttg cgcagcctat	240
acgtacggca gtttaagggt tacacctata aaagagagag ccgttatcgt ctgtttggtg	300
atgtacagag tgatattatt gacacgccgg ggcgacggat ggtgatcccc ctggccagtg	360
cacgtctgct gtcagataaa gtctcccgtg aactttaccg ggtggtgcat atcggggatg	420
aaagctggcg catgatgacc accgatatgg ccagtgtgcc ggtctccggt atcggggaag	480
aagtggctga tctcagcc	498

<210> 27
 <211> 303
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia complementaria inversa del exón 1

<400> 27

caatttggtg cggagaaatg agaagagaat catgaataac aatgacagtc tttgttgtga	60
caattactga aacctcttta accccttcaa gattcttgag aattttttca actagaacaa	120
cttctgaagt acagcaaatt cccaaaacat caaaatagct cttgctcaac ttctttgttt	180
cattcatttt ttcactttcc accatttttc tccttctcta aggaggagga gaagataata	240
gatgaaaaag gaatttctag ttctggaata tattggatat acttttgttt tggaaagagg	300
tga	303

<210> 28
 <211> 258
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia complementaria inversa del exón 2

<400> 28

ctgctattaa aacaagaatg tcgatgtcaa gagtgaggtt tcgcacggca gccacacctc 60
taaaaataat tggaggaatc ccaactgcaa cagctgcaag tgctaaccat tggaaaggtg 120
caaaaaagta cttcaaagat gagagtccaa gcaatatttc actgccaatt gcaaattggac 180
ttggccattt cttttggtag tttttctctc ctttctctct tatgcttgct tctaattctg 240
cttgattcaa tgctttaa 258

<210> 29
 <211> 98
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia complementaria inversa del exón 3

<400> 29

cttgtgactt gcccttgact ctagccattc tgcaatggcg aataagaaga caatagtacc 60
agcttcccaa taatcgtgta aaacaattga tccagcca 98

<210> 30
 <211> 256
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia complementaria inversa del exón 4

<400> 30

catttagatt tgtagcgcca gccagaccg ttgaatctct ttgcttagaa actggaaacg 60
actcgctgt cagtgttttc tcgtccacgt cacattcccc ttccactaca actccatcaa 120
taggtatagt ttcaccagct ttcacagcaa gaatgctatt caccttgact tcatcaacat 180
ttacgacttc tccgctttcc gctaaaactg ctgttgagg gactatattg accagtgatg 240
acatagcggc ggtagc 256

<210> 31
 <211> 142
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia complementaria inversa del exón 5

<400> 31

tagcctggtg tataatattt agcacacttg tcgatgtatc tttgggtttt tgatttcttg 60
ttctgagcat cttcgacagg ctgtgccatc ctagccaccg cacaatcttc agccaaagcc 120
gtagtcttaa cactgatata gc 142

ES 2 527 272 T3

<210> 32
 <211> 328
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia complementaria inversa del exón 6

<400> 32

cagtaaagca gtgtattgag actaaaacca tcaatcagag acttgaactc ggtcaccata 60
aattctcctt tagttatagt ccctgttttg tcaaaagcca tgattttgat tttagctaga 120
gtctcaaggt actctgctcc tttaaacaga agaccggacg ttgctgcttt tgaaagtgcg 180
caacacatgg caactggtgt agatagaacg agtgcacacg gacatgcact caccaatgtg 240
accaagcca agcgatacca ttcatttcga ttgtgaactc ttaatgcagt aggaacaatt 300
gccaaagaag ctggtatagc cacaattg 328

<210> 33
 <211> 203
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia complementaria inversa del exón 7

<400> 33

ctgtggtaca tccagctctt gaagaaattt tcctattccc gacatagatt tccattccat 60
caattcttcc aatatccct tcaccaggaa aattttgaaa ccgctcaact ctatcagget 120
ttggctcaac ggaatttgat tgtgcatagt ccaccagagc ggttgccatc ggatgacctg 180
acttgctctc aatgcttgaa acc 203

<210> 34
 <211> 203
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia complementaria inversa del exón 8

<400> 34

ctgatcctgc acatggttgg cagctgcata acgatcacca gtaagcatcg cggttttgat 60
accatctgc ttcagttctc tcattgcttc ttttacacca attcgacaaa catcggaaag 120
actgaaaatt ccagctggag atgatcccaa aatatgtat ccaacagact ttcctttgaa 180
actatcaccc tctatttctg gta 203

ES 2 527 272 T3

<210> 35
 <211> 1498
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia complementaria inversa del exón 9

<400> 35

```

ctgaattagc agttttgcat gatggaccag acatctttga agagcatgat tcagagttgg      60
tttgtgaata acaagaattc ttgctattgg tgtccgagca ctttgtattt ccacatgtcc      120
tggagcttga agttgcagat tggctttgtg gagcacacaa cttagacatg catgtttgat      180
gatcgggatg tgaaggatgg ctactattgt cttttgagtc tgaacacttg ctatttccac      240
atgattttaga cccagaaact gcagattgac accctggagc agacttcttg gtagagcacg      300
cttgaggaat tttgtcggat tgacaacatt tttatcact gaagtcggag cacttggtac      360
ttccacatga tttgttgctt gaagtagcag aatgacattg tggagcagac atcttggag      420
aacatactag agagttagtt aaagaatgac aattactctt gtgaatggag tctgagcaat      480
tgttatttcc acatgacttt gattctgaaa gtgcagattg gcctgcttta gcagccatct      540
tcgatgaaca gcattgagga cggggatgag aatgaaaacc actatttcca acggagtctg      600
ggcactgatt atttccacat gactttgatt ctgaaactgc agattggcac gctttagcag      660
ccatcttca cagcagcat tcaggacggg gatgagaatg aaaaccacta tttcaacgg      720
agtctgggca ctgattattt ccgcatgact ttgattctga aactgcagat tggcatgctt      780
tagcagccat cttcgacgag cagcattgag gacggcgatg agaatgaaaa ccactatttt      840
caatggagtc tgggcactga ttatttccac atgactttga tcccaggagg acaggttgac      900
atcttggaac acacacctcg gacgagcatg attgacttgt acatttcttt tgtgactcaa      960
tatcagagca acacagctgg ggagcatttt ccgacttgca acatgaagct ttgtctttgt     1020
ggtggggagc atgcgaagga gtagaagatc tccaacattt tttcccatgt ctgcgtgtgc     1080
ctcctcgtag aagtagcatg ctgttcaaaa tccactagcaa gcatgtcca gtatctgcga     1140
ggacagcagc ccaaaccaat ggataacctg ctattgcca tgcaactatg gcagcctttg     1200
taacggctga tataatcata ttctcaaaa tcttcttctg aactcttcta gcaagacgtg     1260
cagctttcgg tattcttccg atgtcatttg tcattagtat agcatggcct gtttctttag     1320
cgagagctga cccagagatg cccattgaga tgccaatgtc agctgttgct aatgcaggag     1380
catcattaag gccgtcgcct atcatcgtg ttggagcttc cttctgaaaa cccttgatga     1440
ttgttcctt gtcctctggt aggagtctg cttgaaattc atccaaagct ccacctaa     1498
    
```

<210> 36
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia complementaria inversa del exón 10

<400> 36

ctgaacttgc agtttggcat gtttgattgg tgctgtcaca atgagcagtt tcctggattc	60
cagtttctga tacatcagtt ttattgcctt gaaccgaata acaacattct tgtaaggcac	120
aactgtcata tgccttgtct aaatttgtat gatcatgttc ctcgtcagag cagccatgac	180
gaagatcatg acttgattcc ttatcttttc ggactaaatc caagcttttc tgctccgaaa	240
gcttttccc actgagtgga ttagtaagtg gtgaatgaaa actgttctcg gttgcagagt	300
cctggcactt cttatttctg catgacctg aac	333

<210> 37

<211> 774

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia complementaria inversa del exón 11

<400> 37

tgctttgttc aaattagcag ctcaacttct tgaagataaa ataggtagga agtttacaac	60
atatgtacac ttcggattgc atctactcta tgacaatttc tgataaacct cctccgaaac	120
ttgctccaag gtggttcttc ttggcacaac attcttttct gaagctgtca cagcatccac	180
cgatgtgtct ctctccaac agcgaacaaa ccttacgacc actgcagtct aggtaatgat	240
gatggttgtc ccgtaagata ttgatagtg atcgaacggt tggaccacat tctgcagcat	300
gcttcttgca gccagaacgg acgtcgtggc atggtttgta ttcgcagcat cttctaacca	360
gcttggctag ttcttcatca gttggagttag ttttagagtg aagtcacacag tgatttacct	420
gatcttttgg ttcattgttg cagctgctgg agatgaccat gctctgcttt gtgctgtcac	480
aatgagcagt ttcttgaatt tcactttttg atacgtcgtc aatgccatgg acttgaactg	540
aaaaacaaca atcatctgtt gcacaactgt catatgcctt ttctggatgt gaggatcgt	600
gttcttgtc cgaacagcca tgaccgacag catgagggtga ttttatacct tctccaacaa	660
catccaagat tttctgctcc aggttgttct cctcgtggag tggattatca tgcgaatgac	720
aaccatggat gcttagagag tccaggatct tatcatttcc gcatgtcatc gatc	774

<210> 38

<211> 260

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Contrucción transgénica de secuencia codificante

<400> 38

atttgtagtg **cc**agcccaga **cc**gttgaatc **tatt**tgctta **gaa**actggaa **ac**gactcgcc 60
tgtcagtggt **tt**ctcgtcca **cg**tcacattc **cc**cttcatt **aca**actccat **ca**taggtat 120
agtttcacca **gc**tttaacag **ca**agaatgct **att**caacttg **act**tcatcaa **catt**tagcag 180
ttctccactt **tc**agctaaaa **ct**gctggttg **agg**gactata **tt**gaccagtg **at**gacatagc 240

agcagtagcc tacataacca 260

<210> 39

<211> 96

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción transgénica de secuencia espaciadora

<400> 39

agcctgaaga attgagcaaa taacattaac aaacaatact tgaagtttca gcactaaata 60

aatgaagcat gaaggaatac tacactacca tttaga 96

<210> 40

<211> 260

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Contrucción transgénica de secuencia complementaria inversa

<400> 40

tggttatgta ggctactgct gctatgtcat cactgggtcaa tatagtcctt ccaacagcag 60

ttttagctga aagtggagaa gtcgtaaattg ttgatgaagt caagttgaat agcattcttg 120

ctgttaaagc tgggtgaaact atacctattg atggagttgt aatggaaggg gaatgtgacg 180

tggacgagaa aacctgaca ggcgagtcgt ttccagtttc taagcaaata gattcaacgg 240

tctgggctgg cactacaaat 260

<210> 41

<211> 616

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de ARNi

<400> 41

atttgtagtg ccagcccaga ccgttgaatc tatttgctta gaaactggaa acgactcgcc 60
tgtcagtggt ttctcgtcca cgtcacattc cccttcatt acaactccat caataggtat 120
agtttcacca gctttaacag caagaatgct attcaacttg acttcatcaa catttacgac 180
ttctccactt tcagctaaaa ctgctggttg agggactata ttgaccagtg atgacatagc 240
agcagtagcc tacataacca agcctgaaga attgagcaaa taacattaac aaacaatact 300
tgaagtttca gactaaata aatgaagcat gaaggaatac tacactacca tttagatggt 360
tatgtaggct actgctgcta tgtcatcact ggtcaatata gtccctcaa cagcagtttt 420
agctgaaagt ggagaagtcg taaatggtga tgaagtcaag ttgaaatagca ttcttgctgt 480
taaagctggt gaaactatac ctattgatgg agttgtaatg gaaggggaat gtgacgtgga 540
cgagaaaaca ctgacaggcg agtcgtttcc agtttctaag caaatagatt caacggctctg 600
ggctggcact acaaat 616

<210> 42
 <211> 192
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción transgénica de secuencia codificante

<400> 42

tgagagcaag tcaggtcatc cgatggcagc cgctctggtg gactatgcac aatcaaattc 60
cgttgagcca aagcctgata gagttgagca gtttcaaata tttcctggtg aagggatatt 120
tggaagaatt gatggaatgg aatctatgt cgggaatagg aaaatttctt caagagctgg 180
atgtaccaca gg 192

<210> 43
 <211> 138
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción transgénica de secuencia espaciadora

<400> 43

taaatggttg aatcatttct tatgctcata gtagagataa aacatcagag ttataattat 60
aagtatatga tttctccagt taattttgct gttagatttt ctttgacctg tttagacta 120
atgctggtgga tgtttgaa 138

<210> 44
 <211> 196
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 527 272 T3

<220>

<223> Contrucción transgénica de secuencia complementaria inversa

<400> 44

cctgtggtac atccagctct tgaagaaatt ttcctattcc cgacatagat ttccattcca	60
tcaattcttc caaatatccc ttcaccagga aaatTTtgaa actgctcaac tctatcaggc	120
tttggctcaa cggaaTTtga ttgtgcatag tccaccagag cggctgccat cggatgacct	180
gacttgctct caatgc	196

<210> 45

<211> 526

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de ARNi

<400> 45

tgagagcaag tcaggctatc cgatggcagc cgctctggtg gactatgcac aatcaaattc	60
cgttgagcca aagcctgata gagttgagca gtttcaaaat tttcctggtg aagggatatt	120
tggaagaatt gatggaatgg aatctatgt cgggaatagg aaaatttctt caagagctgg	180
atgtaccaca ggtaaattgg tgaatcattt cttatgctca tagtagagat aaaacatcag	240
agttataatt ataagtatat gatttctcca gttaatTTtg ctgtagatt ttctttgacc	300
tgtttagcac taatgcggtg gatgTTtgaa cctgtggtac atccagctct tgaagaaatt	360
ttcctattcc cgacatagat ttccattcca tcaattcttc caaatatccc ttcaccagga	420
aaatTTtgaa actgctcaac tctatcaggc tttggctcaa cggaaTTtga ttgtgcatag	480
tccaccagag cggctgccat cggatgacct gacttgctct caatgc	526

<210> 46

<211> 4392

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia complementaria inversa

<400> 46

ES 2 527 272 T3

acgaaacaag	ttaaatcgtc	gagttgaaga	acttctat	tatccatcct	tcaa	atggtt	60
tatacatgtg	aagcctaacg	tagatgagat	actgttaaag	actat	ttgga	ggaggtttg	120
aacgaggttc	cacaaaaaag	aaccgtggtg	taagaaaaga	cttcgacagt	gtc	gtaggtg	180
gctacacaga	gaagaggtt	tcgcttgtt	ggaatgctgg	tgacg	tcaga	tccattacta	240
ctaccaacag	ggcattctat	aactaccaac	tagcttgcca	acctggtgta	agacg	tcgta	300
cgaaggacgt	cggctctgcc	tcgagcaccg	taccaa	acat	aaacg	tcgta	360
cgaaccgatc	aagaagtagt	caacctc	atc	aaaatctc	ac	actaaatgga	420
ctagaaaacc	aagtacaaac	gtcgcgacc	tctactg	gta	cgagacg	aaa	480
ttactcgta	aagaactta	agtgaaaaac	tatgcagcag	ttacggtacc	tga	acttgac	540
ttttgtt	gt	tagtagaca	cgtgttgaca	gtatacggaa	aagac	ctaca	600
caaggaacag	gcttgtcgg	actggctg	tc	actccact	aaaat	atgga	660
gtaggttcta	aaagacgagg	ttcaacaaga	ggagcacctc	acctaatagt	acg	cttactg	720
ttggtaccta	cgaatctctc	aggtcctaga	atagtaaagg	cgtacagtag	ctagg	acttg	780
aacgtcaaac	cgtacaaact	aaccacgaca	gtgttactcg	tcaaaggacc	taagg	tcaaa	840
gactatgtag	tcaaaataac	ggaacttggc	ttattgtt	gt	aagaacattc	cgtgttgaca	900
gtatacggaa	cagatttaaa	catactagta	cagggagcag	tctcgtcgg	actg	cttcta	960
gtactgaact	aaggaataga	aaagcctgat	ttaggttcga	aaagacgagg	ctttc	gaaaa	1020
ggggtgactc	acctaatcat	tcaccactta	ctttgaca	gagccaacgt	ctcagg	accg	1080
tgaagaataa	agacgtactg	gaacttggac	ttaatcgta	aaacgtacta	cctgg	ctgt	1140
agaaacttct	cgtactaagt	ctcaaccaa	cacttattgt	tcttaagaac	gata	accaca	1200
ggctcgtgaa	acataaagg	gtacaggacc	tcgaacttca	acgtctaacc	gaa	acacctc	1260
gtgtgttgaa	tctgtacgta	caaactacta	gcctacact	tcctaccgat	gata	acagaa	1320
aactcagact	tgtgaacgat	aaaggtgtac	taa	atctggg	tctttgacgt	ctaactgtag	1380
gacctcgtct	gaagaaccat	ctcgtgcaaa	ctccttaaaa	cagcctaact	gttg	taaaaa	1440

acagtgactt cagcctcgtg aaccatgaag gtgtactaaa caacgaactt catcgtctta 1500
 ctgtaacacc tcgtctgtag aaccttcttg tatgatctct caatcaatth cttactgtta 1560
 atgagaacac ttacctcaga ctcgttaaca ataaagggtg actgaaacta agactttcac 1620
 gtctaaccgg acgaaatcgt cggtagaagc tacttgtcgt aactcctgcc cctactctta 1680
 cttttggtga taaaaagttg cctcagacc gtgactaata aagggtgact gaaactaaga 1740
 ctttgacgtc taaccgtgcg aaatcgtcgg tagaagctgc tcgtcgtgtaag tcctgcccct 1800
 actcttactt ttggtgataa aagttgcctc agaccctgta ctaataaagg cgtgctgaaa 1860
 ctaagacttt gacgtctaac cgtacgaaat cgtcggtaga agctgctcgt cgtaactcct 1920
 gccgtactc ttacttttgg tgataaaagt tacctcagac ccgtgactaa taaagggtgta 1980
 ctgaaactag gactcctctg tccaactgta gaaccttgtg tgtggagcct gctcgtacta 2040
 actgaacatg taaagaaaac actgagttat agtctcgttg tgtcgacccc tcgtaaaagg 2100
 ctgaacgttg tacttcgaaa cagaaacacc acctcgtac gcttcctcat cttctagagg 2160
 ttgtaaaaaa gggtagacac gcacacggag gagcatcttc atcgtacgac aagttttagt 2220
 gatcgttcgt acaggggtcat agacgctcct gtcgtcgggt ttggttacct attggacgat 2280
 aacggttacg ttgataccgt cggaaacatt gctgactata ttagtataag agttgttaga 2340
 aggaagcttg agaagatcgt tctgcacgtc gaaagccata agaaggctac agtaaacagt 2400
 aatcatattg taccggacaa agaaatcgtc ctcgactggg tctctacggg taactctacg 2460
 gttacagtcg acaacgatta cgtcctcgtg gtaattccgg cagcggatag tagcgacaac 2520
 ctcgaaggaa gacttttggg aactactaac aacggaacag gagaccatcc tcaagacgaa 2580
 ctttaagtag gtttcgaggt ggattgacta ggacgtgtac caaccgtcga cgtattgtta 2640
 gtggtcattc gtagcgccaa aactatgggt agacgaagtc aagagagtaa cgaagaaaat 2700
 gtggttaagc tgttttagc ctttctgact tttaaggctc acctctacta gggtttttat 2760
 acataggttg tctgaaagga aactttgata gtgggagata aagaccatga caccatgtag 2820
 gtcgagaact tctttaaag gataagggct gtatctaaag gtaaggtagt taagaaggtt 2880
 tatagggag tggtcctttt aaaactttga cgagttgaga tagtccgaaa ccgagttgcc 2940
 ttaaactaac acgtatcagg tggctctgcc gacggtagcc tactggactg aacgagagtt 3000
 acgaactttg ggtcatttcg tcacataact ctgattttgg tagttagtct ctgaacttga 3060
 gccagtggtg ttttaagagga aatcaatc agggacaaaa cagttttcgg tactaaaact 3120
 aaaatcgatc tcagagttcc atgagacgag gaaatttgtc ttctggcctg caacgacgaa 3180
 aactttcacg cgttgtgtac cgttgaccac atctatcttg ttcacgtgtg cctgtacgtg 3240
 agtggttaca ctggtttcgg ttcgctatgg taagtaaagc taacacttga gaattacgtc 3300
 atccttgta acggtttctt cgactatc ggtgttaacg accacatatt ataaatcgtg 3360
 tgaacagcta catagaaacc caaaaactaa agaacaagac tcgtagaagc tgttcgacac 3420
 ggtagatcg gtggcgtgtt agaagtcggt ttcggcatca gaattgtgac tatatcggta 3480
 aatctaaaca tcacggtcgg gtctggcaac ttagagaaac gaatctttga ctttctgta 3540

ES 2 527 272 T3

gcggacagtc acaaaagagc aggtgcagtg taaggggaag gtgatgttga ggtagttatc	3600
catatcaaag tggtcgaaag tgtcgttctt acgataagtg gaactgaagt agttgtaa	3660
gctgaagagg cgaaagtcga ttttgacgac aacctccctg atataactgg tcactactgt	3720
atcgtcgcca tcggaacact gaacgggaac tgagatcggg aagacgttac cgcttattct	3780
tctgttatca tggtcgaagg gttattagca cattttgtta actagggtcgg tgacgataat	3840
tttgtttetta caactacagt tctcactcca aagcgtgccg tcggtgtgga gatttttatt	3900
aacctcctta gggttgacgt tgtcgacggt cacgattggt aacctttcca cgtttttca	3960
tgaagttttt actctcaggt tcgttataag gtgacggtta acgtttacct gaaccggtaa	4020
agaaaaccat caaaaagaga ggaaagtgag aatacgaacg aagattagaa cgaactaagt	4080
tacgaaattg ttaaacaacg cctctttact cttctcttag tacttattgt tactgtcaga	4140
aacaacactg ttaatgactt tggagaaatt ggggaagttc taagaactct tgaaaaagtt	4200
gatcttgttg aagacttcat gtcgtttaag ggtttttag ttttatcgag aacgagttga	4260
agaaacaaag taagtaaaa agtgaaaggt ggtaaaaaga ggaagagatt cctcctcctc	4320
ttctattatc tactttttcc ttaaagatca agaccttata taacctatat gaaaacaaaa	4380
cctttctcca ct	4392

<210> 47

<211> 4011

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia codificante

<400> 47

acgacggcca	gtgaattgta	atacgactca	ctatagggcg	aattgggccc	tctagatgca	60
tgctcgagcg	gccgccagtg	tgatggatat	ctgcagaatt	cgcccttgag	gaaacataga	120
aagaagagaa	tggtggaaag	tgagaaaatg	aatgacacaa	agaatctgag	caagagctat	180
tttgatgttt	tgggaatttg	ctgtacttca	gaagttgttc	ttgttgaaaa	aattctcaag	240
aatcttgaag	gggttaaaga	ggtttcagta	attgtcacia	caaagactgt	cattgttatt	300
catgattctc	tcctcatttc	tcagcaacia	attgttaaag	cattgaatca	agcaagatta	360
gaagcaagta	taagagtga	aggagagaaa	aactacaaaa	agaaatggcc	aagtccattt	420
gcaattggca	gtggaatatt	gcttggactc	tcatttttga	agtacttttt	tgcacctttc	480
caatggttag	cacttgcagc	tgttgcagtt	gggattcctc	caattatttt	taggggtgtg	540
gctgccgtgc	gaaacctcac	tcttgacatc	aacattcttg	ttttaatagc	agtgaaggga	600
tcaattgttt	tacacgatta	ttgggaagct	gatactattg	tcttcttatt	caccattgca	660
gaatggctag	agtcaagggc	aagtcacaag	gctactgctg	ctatgtcatc	actggccaat	720
atagtcctc	caacagcagt	tttagctgaa	agtggagaag	tcgtaaagt	tgatgaagtc	780
aagttgaata	gcattcttgc	tgtaaagct	ggtgaaacta	tacctattga	tggagttgta	840

atggaagggg	aatgtgacgt	ggacgagaaa	acactgacag	gcgagtcggt	tccagtttct	900
aagcaaatag	attcaacggt	ctgggctggc	actacaaatc	taaataggcta	tatcagtggt	960
aagactacgg	ctttggctga	agattgtgcg	gtggctagga	tggcgcagct	tgtcgaagat	1020
gctcagaaca	agaaatcaaa	aacccaaaga	tacattgaca	agtgtgctaa	atattataca	1080
ccagcaattg	tggctataat	agcttctttg	gcaatagttc	ctactgcatt	aagagttcac	1140
aatcgaaatg	agtggtatcg	cttggctttg	gtcacgttgg	tgagtgcattg	tccgtgtgca	1200
cttgtgctat	ctacaccagt	tgccatgtgt	tgtgcacttt	ctaaagcagc	aacgtccggt	1260
cttctgttta	aaggagcaga	gtaccttgag	actcttgcta	aaatcaaaat	catggctttt	1320
gacaaaacag	ggactataac	tagaggagaa	tttatggtga	ccgagttcaa	gtctctgggt	1380
gatggctctg	gtctcaatac	actgctttac	tggttttcaa	gtattgagag	caagtcaggt	1440
catccgatgg	cagccgctct	ggttgactat	gcacaatcaa	attccggtga	gccaaagcct	1500
gatagagttg	agcagtttca	aaattttcct	ggtgaagggg	tatttggaag	aattgatgga	1560
atggaaatct	atgtcgggaa	taggaaaatt	tcttcaagag	ctggatgtac	tacagtacca	1620
gaaatagagg	gtgatagttt	ccaaggaaag	tctggttgat	acatattttt	gggatcatct	1680
cccgtggaa	ttttcggctc	ttccgatgtt	tgtcgaattg	gtgtaaaaga	agcaatgaga	1740
gagctgaagc	agatgggtat	caaaaccgcg	atgcttactg	gtgattgtta	tgcaagctgc	1800
aaccatgtgc	aggatcagtt	aggtggagct	atggatgaat	ttcaagcggg	actcttacca	1860
gaggacaagg	caacaatcat	caagggtttt	cagaaggaag	ctccaacagc	gatgataggg	1920
gacggcctta	atgatgctcc	tgcattagca	acagctgaca	ttggcatctc	aatgggcatc	1980
tctgggtcag	ctctcgcgaa	agaaacaggc	catgttatac	taatgacaaa	tgacatcgga	2040
agaataccaa	aagctgcacg	tcttgctaga	agagttcgaa	ggaagattgt	tgagaatatg	2100
attatatcag	tcgttacaaa	ggccgccata	gttgcatagg	caatagcagg	ttatccattg	2160
gtttgggctg	ctgtcctcgc	ggatactggg	acatgcttgc	tagtgatctt	gaacagcatg	2220
ctacttctac	gagtaggcac	acacagacat	gggaaaaaat	gttgtagatc	tgctactcct	2280
tcgcatgctc	ccaaccacaa	agacaaagct	tcttgttgca	agtcggaaaa	tgctccgcag	2340
ctgtgttgct	ctgatattga	gtcacaaaag	aaatgtacga	gtcaatcatg	ctcgtccgag	2400
gtgtgtgttc	caagatgcca	acctgtctcc	tcgggatcaa	agtcatgtgg	aaataatcag	2460
tgcccagact	ccgttgaaaa	tagtggtttt	cattctcatc	cccgtcctct	agtatgttct	2520
tccaagatgt	ctgctccaca	atgtcattct	gccacttcaa	gctccaaatc	atgtggaagt	2580
accaagtgct	ccaacttcag	tgacaaaaaa	tgttgccaat	atgacaaaat	tcctcaaacg	2640
tgctctacca	agaagtctgc	tccaggatgt	caatctgcag	tttctgggtc	taaataatgt	2700
ggagatagca	agtgttcaga	ctcgaaagac	aatagtagcc	atccttcaca	tcccgatcat	2760
caaatatgca	cgtctaagtt	gtgtgctcca	caaagccaat	ctgcaacttc	aagctccagg	2820
acatgtggaa	atatgaagtg	ctcggacacc	aatagcaaga	attcttggtta	ttcacatacc	2880
aactctgaat	catgctcttc	aaagatgtct	ggtccagcat	gcaaaactgc	taattcaggt	2940

tcaaggttat gcggaaataa gaagtgccta gactctgcaa acgagaacag ttttcattca 3000
 cttactaatc cactctgtga ggaaaagctt ttggagaagg aaagcttggg tttagcccga 3060
 aaagataggg aatcaaatca tgatcttagt catggttact ctgacgagga acatgatcat 3120
 ctaaatttag acaaggcaca tgacagtgtg gccttacaag aatggtgta ttctgttcaa 3180
 ggcaataaaa ctgatgtatc agaaactgga atccaggaag ctgctcattg tgacagcatc 3240
 aatcaaactc gccaaactgc aatttcagga tcaatgacat gcggaaataa taagagtctg 3300
 gactctctaa gcatccatgg ttgtcattca catgatagtc cactccacaa ggagagcaac 3360
 ttggagcaga aaagcttggg tgttgctgga gaaggataa aatcacctca tgctgtcggg 3420
 caaggctggt cggacaagga gcacaatcac tcgcatccag aaaaggcgtg tgacagtgtg 3480
 gcaacagacg attgttgttt ttcagttcaa gtccatggca ttgacgacgt atcaagaagt 3540
 gaaattcaag aaactgctca ttgtgacagc acaaaacaga gcacgggcat ccccagcagc 3600
 tgcgaacatg aaccaaaga tcaggtaaat cactgtggat ctactctaa aagtattcca 3660
 actgatgaag aactagccaa gctggttaga agatgctgca aatacaaacc atgccacgat 3720
 gtccgctctg gctgcaggaa gcatgctgca gaatgtggc caaccgttcg atcaaccatc 3780
 aatatcttac gggacaacca tcatcatcat ctagactgca gtggtcgtaa ggtttgttcg 3840
 ctggttgaga agagacacat tgggtgatgc tgtgacagct tcagaaaaga atggtgtgcc 3900
 aagaacaatc accttggagc aagttttgga ggaggtttat cagaaattgt caaagggcga 3960
 attccagcac actggcggcc gttactagtg gatccgagct cggtagcaag c 4011

<210> 48

<211> 4011

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia complementaria inversa

<400> 48

gcttgggtacc gagctcggat ccactagtaa cggccgccag tgtgctggaa ttcgcccttt 60
 gacaatttct gataaacctc ctccaaaact tgctccaagg tgattgttct tggcacaaca 120
 ttcttttctg aagctgtcac agcatccacc aatgtgtctc ttctccaaca gcgaacaaac 180
 cttacgacca ctgcagtcta gatgatgatg atggttgtcc cgtaagatat tgatggttga 240
 tcgaacgggt ggaccacatt ctgcagcatg cttcctgcag ccagagcggg catcgtggca 300
 tggtttgtat ttgcagcatc ttctaaccag cttggctagt tcttcatcag ttggaatact 360
 tttagagtga gatccacagt gatttacctg atcttttggg tcatgttcgc agctgctggg 420
 gatgaccgtg ctctgttttg tgctgtcaca atgagcagtt tcttgaattt cacttcttga 480
 tacgtcgtca atgccatgga cttgaaactga aaaacaacaa tcgtctgttg cacaactgtc 540
 atacgccttt tctggatgag agtgattgtg ctccttgtcc gaacagcctt gaccgacagc 600
 atgaggtgat ttatacctt ctccagcaac atccaagctt ttctgctcca agttgctctc 660

cttgtggagt	ggactatcat	gtgaatgaca	accatggatg	cttagagagt	ccagactcct	720
attatttccg	catgtcattg	atcctgaaat	tgcagtttgg	catgtttgat	tgatgctgtc	780
acaatgagca	gcttcctgga	ttccagtttc	tgatacatca	gttttattgc	cttgaacaga	840
ataacaacat	tcttgtaagg	cacaactgtc	atgtgccttg	tctaaattta	gatgatcatg	900
ttcctcgtca	gagtaacat	gactaagatc	atgatttgat	tccctatcct	ttcgggctaa	960
atccaagcct	tccttctcca	aaagcttttc	ctcacagagt	ggattagtaa	gtgaatgaaa	1020
actgttctcg	tttgagagt	ctaggcactt	cttatttccg	cataaccttg	aacctgaatt	1080
agcagttttg	catgctggac	cagacatcct	tgaagagcat	gattcagagt	tggtatgtga	1140
ataacaagaa	ttcttgctat	tggtgtccga	gcacttcata	ttccacatg	tcctggagct	1200
tgaagttgca	gattggcttt	gtggagcaca	caacttagac	gtgcatattt	gatgatcggg	1260
atgtgaagga	tggctactat	tgtctttcga	gtctgaacac	ttgctatctc	cacatgattt	1320
agacccagaa	actgcagatt	gacatcctgg	agcagacttc	ttggtagagc	acgtttgagg	1380
aattttgtca	tattggcaac	attttttgtc	actgaagttg	gagcacttgg	tacttccaca	1440
tgatttggag	cttgaagtgg	cagaatgaca	ttgtggagca	gacatcctgg	aagaacatac	1500
tagaggacgg	ggatgagaat	gaaaaccact	attttcaacg	gagtctgggc	actgattatt	1560
tccacatgac	ttgatcccg	aggagacagg	ttggcatcct	ggaacacaca	cctcggacga	1620
gcatgattga	ctcgtacatt	tcttttgtga	ctcaatatca	gagcaacaca	gctgcggagc	1680
attttccgac	ttgcaacaag	aagctttgtc	tttgtggttg	ggagcatgcg	aaggagtagc	1740
agatctacaa	cattttttcc	catgtctgtg	tgtgcctact	cgtagaagta	gcatgctggt	1800
caagatcact	agcaagcatg	tcccagtatc	cgcgaggaca	gcagcccaaa	ccaatggata	1860
acctgctatt	gccaatgcaa	ctatggcggc	ctttgtaacg	actgatataa	tcataattctc	1920
aacaatcttc	cttcgaactc	ttctagcaag	acgtgcagct	tttggtatte	ttccgatgtc	1980
atitgtcatt	agtataacat	ggcctgtttc	tttcgcgaga	gctgaccag	agatgcccac	2040
tgagatgcca	atgtcagctg	ttgctaattg	aggagcatca	ttaaggccgt	cgcttatcat	2100
cgctgttga	gcttccttct	gaaaaccctt	gatgattggt	gccttgtcct	ctggttaagag	2160
ttccgcttga	aattcatcca	tagctccacc	taactgatcc	tgacatggt	tggcagctgc	2220
ataacaatca	ccagtaagca	tcgcggtttt	gataccatc	tgcttcagct	ctctcattgc	2280
ttcttttaca	ccaattegac	aaacatcggg	aagaccgaaa	attccagcgg	gagatgatcc	2340
caaaaatatg	tatccaacag	actttccttg	gaaactatca	ccctctatct	ctggtactgt	2400
agtacatcca	gctcttgaag	aaattttcct	attcccagaca	tagattttcca	ttccatcaat	2460
tcttccaaat	atcccttcac	caggaaaatt	ttgaaactgc	tcaactctat	caggctttgg	2520
ctcaacggaa	tttgattgtg	catagtcaac	cagagcggct	gccatcggat	gacctgactt	2580
gctctcaata	cttgaaaccc	agtaaagcag	tgtattgaga	ccaagaccat	caaccagaga	2640
cttgaactcg	gtcaccataa	attctcctct	agttatagt	cctgttttgt	caaaagccat	2700
gattttgatt	ttagcaagag	tctcaaggta	ctctgctcct	ttaaacagaa	gaccggacgt	2760

tgctgcttta gaaagtgcac aacacatggc aactgggtgta gatagcacia gtgcacacgg 2820
 acatgcactc accaacgtga ccaaagccaa gcgataccac tcatttcgat tgtgaactct 2880
 taatgcagta ggaactattg ccaaagaagc tgatatagcc acaattgctg gtgtataata 2940
 tttagcacac ttgtcaatgt atctttgggt ttttgatttc ttgttctgag catcttcgac 3000
 aagctgcgcc atcctagcca ccgcacaate ttcagccaaa gccgtagtct taacactgat 3060
 atagccattt agattttag tagccagccca gaccgttgaa tctatttgct tagaaactgg 3120
 aaacgactcg cctgtcagtg ttttctcgtc cacgtcacat tcccctcca ttacaactcc 3180
 atcaataggt atagtttcac cagctttaac agcaagaatg ctattcaact tgacttcac 3240
 aacatttacg acttctccac tttcagctaa aactgctggt ggagggacta tattgaccag 3300
 tgatgacata gcagcagtag ccttgtgact tgcccttgac tctagccatt ctgcaatggt 3360
 gaataagaag acaatagtat cagcttccca ataatcgtgt aaaacaattg atcccgtcac 3420
 tgctattaaa acaagaatgt tgatgtcaag agtgagggtt cgcacggcag ccacaccct 3480
 aaaaataatt ggaggaatcc caactgcaac agctgcaagt gctaaccatt ggaaagggtgc 3540
 aaaaaagtac ttcaaaaatg agagtccaag caatattcca ctgccaattg caaatggact 3600
 tggccatttc ttttggtagt ttttctctcc tttcactctt atacttgctt ctaatcttgc 3660
 ttgattcaat gctttaacaa tttgttgctg agaaatgagg agagaatcat gaataacaat 3720
 gacagtcttt gttgtgacaa ttactgaaac ctctttaacc cttcaagat tcttgagaat 3780
 tttttcaaca agaacaactt ctgaagtaca gcaaattccc aaaacatcaa aatagctctt 3840
 gctcagattc tttgtgtcat tcattttctc actttccacc atttcttctt ttctatgttt 3900
 cctcaagggc gaattctgca gatatccatc aactggcgg ccgctcgagc atgcatctag 3960
 agggcccaat tcgccctata gtgagtcgta ttacaattca ctggccgctg t 4011

<210> 49
 <211> 1325
 <212> PRT
 <213> Nicotiana tabacum

<400> 49

Gly Glu Leu Gly Pro Leu Asp Ala Cys Ser Ser Gly Arg Gln Cys Asp
 1 5 10 15
 Gly Tyr Leu Gln Asn Ser Pro Leu Arg Lys His Arg Lys Lys Arg Met
 20 25 30
 Val Glu Ser Glu Lys Met Asn Asp Thr Lys Asn Leu Ser Lys Ser Tyr
 35 40 45
 Phe Asp Val Leu Gly Ile Cys Cys Thr Ser Glu Val Val Leu Val Glu
 50 55 60
 Lys Ile Leu Lys Asn Leu Glu Gly Val Lys Glu Val Ser Val Ile Val
 65 70 75 80

Thr Thr Lys Thr Val Ile Val Ile His Asp Ser Leu Leu Ile Ser Gln
 85 90 95
 Gln Gln Ile Val Lys Ala Leu Asn Gln Ala Arg Leu Glu Ala Ser Ile
 100 105 110
 Arg Val Lys Gly Glu Lys Asn Tyr Gln Lys Lys Trp Pro Ser Pro Phe
 115 120 125
 Ala Ile Gly Ser Gly Ile Leu Leu Gly Leu Ser Phe Leu Lys Tyr Phe
 130 135 140
 Phe Ala Pro Phe Gln Trp Leu Ala Leu Ala Ala Val Ala Val Gly Ile
 145 150 155 160
 Pro Pro Ile Ile Phe Arg Gly Val Ala Ala Val Arg Asn Leu Thr Leu
 165 170 175
 Asp Ile Asn Ile Leu Val Leu Ile Ala Val Thr Gly Ser Ile Val Leu
 180 185 190
 His Asp Tyr Trp Glu Ala Asp Thr Ile Val Phe Leu Phe Thr Ile Ala
 195 200 205
 Glu Trp Leu Glu Ser Arg Ala Ser His Lys Ala Thr Ala Ala Met Ser
 210 215 220
 Ser Leu Val Asn Ile Val Pro Pro Thr Ala Val Leu Ala Glu Ser Gly
 225 230 235 240
 Glu Val Val Asn Val Asp Glu Val Lys Leu Asn Ser Ile Leu Ala Val
 245 250 255
 Lys Ala Gly Glu Thr Ile Pro Ile Asp Gly Val Val Met Glu Gly Glu
 260 265 270
 Cys Asp Val Asp Glu Lys Thr Leu Thr Gly Glu Ser Phe Pro Val Ser
 275 280 285
 Lys Gln Ile Asp Ser Thr Val Trp Ala Gly Thr Thr Asn Leu Asn Gly
 290 295 300
 Tyr Ile Ser Val Lys Thr Thr Ala Leu Ala Glu Asp Cys Ala Val Ala
 305 310 315 320
 Arg Met Ala Gln Leu Val Glu Asp Ala Gln Asn Lys Lys Ser Lys Thr
 325 330 335
 Gln Arg Tyr Ile Asp Lys Cys Ala Lys Tyr Tyr Thr Pro Ala Ile Val
 340 345 350

Ala Ile Ser Ala Ser Leu Ala Ile Val Pro Thr Ala Leu Arg Val His
 355 360 365

Asn Arg Asn Glu Trp Tyr Arg Leu Ala Leu Val Thr Leu Val Ser Ala
 370 375 380

Cys Pro Cys Ala Leu Val Leu Ser Thr Pro Val Ala Met Cys Cys Ala
 385 390 395 400

Leu Ser Lys Ala Ala Thr Ser Gly Leu Leu Phe Lys Gly Ala Glu Tyr
 405 410 415

Leu Glu Thr Leu Ala Lys Ile Lys Ile Met Ala Phe Asp Lys Thr Gly
 420 425 430

Thr Ile Thr Arg Gly Glu Phe Met Val Thr Glu Phe Lys Ser Leu Val
 435 440 445

Asp Gly Leu Gly Leu Asn Thr Leu Leu Tyr Trp Val Ser Ser Ile Glu
 450 455 460

Ser Lys Ser Gly His Pro Met Ala Ala Ala Leu Val Asp Tyr Ala Gln
 465 470 475 480

Ser Asn Ser Val Glu Pro Lys Pro Asp Arg Val Glu Gln Phe Gln Asn
 485 490 495

Phe Pro Gly Glu Gly Ile Phe Gly Arg Ile Asp Gly Met Glu Ile Tyr
 500 505 510

Val Gly Asn Arg Lys Ile Ser Ser Arg Ala Gly Cys Thr Thr Val Pro
 515 520 525

Glu Ile Glu Gly Asp Ser Phe Gln Gly Lys Ser Val Gly Tyr Ile Phe
 530 535 540

Leu Gly Ser Ser Pro Ala Gly Ile Phe Gly Leu Ser Asp Val Cys Arg
 545 550 555 560

Ile Gly Val Lys Glu Ala Met Arg Glu Leu Lys Gln Met Gly Ile Lys
 565 570 575

Thr Ala Met Leu Thr Gly Asp Cys Tyr Ala Ala Ala Asn His Val Gln
 580 585 590

Asp Gln Leu Gly Gly Ala Met Asp Glu Phe Gln Ala Glu Leu Leu Pro
 595 600 605

Glu Asp Lys Ala Thr Ile Ile Lys Gly Phe Gln Lys Glu Ala Pro Thr
 610 615 620

Ala Met Ile Gly Asp Gly Leu Asn Asp Ala Pro Ala Leu Ala Thr Ala
625 630 635 640

Asp Ile Gly Ile Ser Met Gly Ile Ser Gly Ser Ala Leu Ala Lys Glu
645 650 655

Thr Gly His Val Ile Leu Met Thr Asn Asp Ile Gly Arg Ile Pro Lys
660 665 670

Ala Ala Arg Leu Ala Arg Arg Val Arg Arg Lys Ile Val Glu Asn Met
675 680 685

Ile Ile Ser Val Val Thr Lys Ala Ala Ile Val Ala Leu Ala Ile Ala
690 695 700

Gly Tyr Pro Leu Val Trp Ala Ala Val Leu Ala Asp Thr Gly Thr Cys
705 710 715 720

Leu Leu Val Ile Leu Asn Ser Met Leu Leu Leu Arg Val Gly Thr His
725 730 735

Arg His Gly Lys Lys Cys Cys Arg Ser Ala Thr Pro Ser His Ala Pro
740 745 750

Asn His Lys Asp Lys Ala Ser Cys Cys Lys Ser Glu Asn Ala Pro Gln
755 760 765

Leu Cys Cys Ser Asp Ile Glu Ser Gln Lys Lys Cys Thr Ser Gln Ser
770 775 780

Cys Ser Ser Glu Val Cys Val Pro Arg Cys Gln Pro Val Ser Ser Gly
785 790 795 800

Ser Lys Ser Cys Gly Asn Asn Gln Cys Pro Asp Ser Val Glu Asn Ser
805 810 815

Gly Phe His Ser His Pro Arg Pro Leu Val Cys Ser Ser Lys Met Ser
820 825 830

Ala Pro Gln Cys His Ser Ala Thr Ser Ser Ser Lys Ser Cys Gly Ser
835 840 845

Thr Lys Cys Ser Asn Phe Ser Asp Lys Lys Cys Cys Gln Tyr Asp Lys
850 855 860

Ile Pro Gln Thr Cys Ser Thr Lys Lys Ser Ala Pro Gly Cys Gln Ser
865 870 875 880

Ala Val Ser Gly Ser Lys Ser Cys Gly Asp Ser Lys Cys Ser Asp Ser
885 890 895

Lys Asp Asn Ser Ser His Pro Ser His Pro Asp His Gln Ile Cys Thr

900					905					910					
Ser	Lys	Leu	Cys	Ala	Pro	Gln	Ser	Gln	Ser	Ala	Thr	Ser	Ser	Ser	Arg
		915					920					925			
Thr	Cys	Gly	Asn	Met	Lys	Cys	Ser	Asp	Thr	Asn	Ser	Lys	Asn	Ser	Cys
	930					935					940				
Tyr	Ser	His	Thr	Asn	Ser	Glu	Ser	Cys	Ser	Ser	Lys	Met	Ser	Gly	Pro
945					950					955					960
Ala	Cys	Lys	Thr	Ala	Asn	Ser	Gly	Ser	Arg	Leu	Cys	Gly	Asn	Lys	Lys
				965					970					975	
Cys	Leu	Asp	Ser	Ala	Asn	Glu	Asn	Ser	Phe	His	Ser	Leu	Thr	Asn	Pro
			980					985					990		
Leu	Cys	Glu	Glu	Lys	Leu	Leu	Glu	Lys	Glu	Ser	Leu	Asp	Leu	Ala	Arg
		995					1000					1005			
Lys	Asp	Arg	Glu	Ser	Asn	His	Asp	Leu	Ser	His	Gly	Tyr	Ser	Asp	
	1010					1015					1020				
Glu	Glu	His	Asp	His	Leu	Asn	Leu	Asp	Lys	Ala	His	Asp	Ser	Cys	
	1025					1030					1035				
Ala	Leu	Gln	Glu	Cys	Cys	Tyr	Ser	Val	Gln	Gly	Asn	Lys	Thr	Asp	
	1040					1045					1050				
Val	Ser	Glu	Thr	Gly	Ile	Gln	Glu	Ala	Ala	His	Cys	Asp	Ser	Ile	
	1055					1060					1065				
Asn	Gln	Thr	Cys	Gln	Thr	Ala	Ile	Ser	Gly	Ser	Met	Thr	Cys	Gly	
	1070					1075					1080				
Asn	Asn	Lys	Ser	Leu	Asp	Ser	Leu	Ser	Ile	His	Gly	Cys	His	Ser	
	1085					1090					1095				
His	Asp	Ser	Pro	Leu	His	Lys	Glu	Ser	Asn	Leu	Glu	Gln	Lys	Ser	
	1100					1105					1110				
Leu	Asp	Val	Ala	Gly	Glu	Gly	Ile	Lys	Ser	Pro	His	Ala	Val	Gly	
	1115					1120					1125				
Gln	Gly	Cys	Ser	Asp	Lys	Glu	His	Asn	His	Ser	His	Pro	Glu	Lys	
	1130					1135					1140				
Ala	Tyr	Asp	Ser	Cys	Ala	Thr	Asp	Asp	Cys	Cys	Phe	Ser	Val	Gln	
	1145					1150					1155				
Val	His	Gly	Ile	Asp	Asp	Val	Ser	Arg	Ser	Glu	Ile	Gln	Glu	Thr	
	1160					1165					1170				

Ala His Cys Asp Ser Thr Lys Gln Ser Thr Val Ile Pro Ser Ser
 1175 1180 1185

Cys Glu His Glu Pro Lys Asp Gln Val Asn His Cys Gly Ser His
 1190 1195 1200

Ser Lys Ser Ile Pro Thr Asp Glu Glu Leu Ala Lys Leu Val Arg
 1205 1210 1215

Arg Cys Cys Lys Tyr Lys Pro Cys His Asp Val Arg Ser Gly Cys
 1220 1225 1230

Arg Lys His Ala Ala Glu Cys Gly Pro Thr Val Arg Ser Thr Ile
 1235 1240 1245

Asn Ile Leu Arg Asp Asn His His His His Leu Asp Cys Ser Gly
 1250 1255 1260

Arg Lys Val Cys Ser Leu Leu Glu Lys Arg His Ile Gly Gly Cys
 1265 1270 1275

Cys Asp Ser Phe Arg Lys Glu Cys Cys Ala Lys Asn Asn His Leu
 1280 1285 1290

Gly Ala Ser Phe Gly Gly Gly Leu Ser Glu Ile Val Lys Gly Arg
 1295 1300 1305

Ile Pro Ala His Trp Arg Pro Leu Leu Val Asp Pro Ser Ser Val
 1310 1315 1320

Pro Ser
 1325

<210> 50
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador de PCR PMG783F

<400> 50
 attctagact gctgctatgt catcactgg 29

<210> 51
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador de PCR PMG783R

<400> 51
 ataagcttag cctgaagaat tgagcaaa 28

<210> 52
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de PCR PMG 785F

<400> 52
atgagctctg gttatgtagg ctactgctgc t 31

<210> 53
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de PCR PMG 786R

<400> 53
atactagtat ttgtagtgcc agcccaga 28

<210> 54
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de PCR PMG754F

<400> 54
attctagatg agagcaagtc aggtcatcc 29

<210> 55
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de PCR PMG754R

<400> 55
ataagctttt caaacatcca ccgcatta 28

<210> 56
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de PCR PMG757F

<400> 56
atgagctcgc attgagagca agtcaggtc 29

<210> 57
<211> 29
<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador de PCR PMG757R

<400> 57

atctgcagcc tgtggtacat ccagctctt 29

REIVINDICACIONES

1.- Una construcción de ARNi de NtHMA capaz de inhibir la expresión de un ARN mensajero de NtHMA al que corresponde, comprendiendo o consistiendo la construcción en:

- 5 una primera secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos 70% con una parte de la SEQ ID NO: 3 o 47;
una segunda secuencia; y
una tercera secuencia que tiene una secuencia complementaria inversa de la primera secuencia, situada en la misma orientación que la primera secuencia,
10 en donde la segunda secuencia está situada entre la primera secuencia y la tercera secuencia, y la segunda secuencia está operativamente unida a la primera secuencia y a la tercera secuencia.

2.- La construcción de ARNi de NtHMA de la reivindicación 1, en donde:

- 15 (a) la primera secuencia tiene una identidad de secuencia de al menos 95% con una secuencia seleccionada de uno o más del grupo que consiste en: exón 1 como se define en la SEQ ID NO: 5, un fragmento del exón 1 como se define en la SEQ ID NO: 5, exón 2 como se define en la SEQ ID NO: 7, un fragmento del exón 2 como se define en la SEQ ID NO: 7, exón 3 como se define en la SEQ ID NO: 9, un fragmento del exón 3 como se define en la SEQ ID NO: 9, exón 4 como se define en la SEQ ID NO: 11, un fragmento del exón 4 como se define en la SEQ ID NO: 11, exón 5 como se define en la SEQ ID NO: 13, un fragmento del exón 5 como se define en la SEQ ID NO: 13, exón 6 como se define en la SEQ ID NO: 15, un fragmento del exón 6 como se define en la SEQ ID NO: 15, exón 7 como se define en la SEQ ID NO: 17, un fragmento del exón 7 como se define en la SEQ ID NO: 17, exón 8 como se define en la SEQ ID NO: 19, un fragmento del exón 8 como se define en la SEQ ID NO: 19, exón 9 como se define en la SEQ ID NO: 21, un fragmento del exón 9 como se define en la SEQ ID NO: 21, exón 10 como se define en la SEQ ID NO: 23, un fragmento del exón 10 como se define en la SEQ ID NO: 23, exón 11 como se define en la SEQ ID NO: 25, y un fragmento del exón 11 como se define en la SEQ ID NO: 25;
20 (b) la segunda secuencia tiene una identidad de secuencia de al menos 95% con una secuencia seleccionada de uno o más del grupo que consiste en: intrón 1 como se define en la SEQ ID NO: 4, un fragmento del intrón 1 como se define en la SEQ ID NO: 4, intrón 2 como se define en la SEQ ID NO: 6, un fragmento del intrón 2 como se define en la SEQ ID NO: 6, intrón 3 como se define en la SEQ ID NO: 8, un fragmento del intrón 3 como se define en la SEQ ID NO: 8, intrón 4 como se define en la SEQ ID NO: 10, un fragmento del intrón 4 como se define en la SEQ ID NO: 10, intrón 5 como se define en la SEQ ID NO: 12, un fragmento del intrón 5 como se define en la SEQ ID NO: 12, intrón 6 como se define en la SEQ ID NO: 14, un fragmento del intrón 6 como se define en la SEQ ID NO: 14, intrón 7 como se define en la SEQ ID NO: 16, un fragmento del intrón 7 como se define en la SEQ ID NO: 16, intrón 8 como se define en la SEQ ID NO: 18, un fragmento del intrón 8 como se define en la SEQ ID NO: 18, intrón 9 como se define en la SEQ ID NO: 20, un fragmento del intrón 9 como se define en la SEQ ID NO: 20, intrón 10 como se define en la SEQ ID NO: 22, un fragmento del intrón 10 como se define en la SEQ ID NO: 22, intrón 11 como se define en la SEQ ID NO: 24, un fragmento del intrón 11 como se define en la SEQ ID NO: 24, intrón 12 como se define en la SEQ ID NO: 26, y un fragmento del intrón 12 como se define en la SEQ ID NO: 26;
25 (c) la tercera secuencia tiene una identidad de secuencia de al menos 95% con una secuencia seleccionada de uno o más del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 27, un fragmento de la SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, un fragmento de la SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, un fragmento de la SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, un fragmento de la SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, un fragmento de la SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, un fragmento de la SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, un fragmento de la SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, un fragmento de la SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, un fragmento de la SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, un fragmento de la SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, y un fragmento de la SEQ ID NO: 37;
30 (d) la primera secuencia comprende la SEQ ID NO: 38, la segunda secuencia comprende la SEQ ID NO: 39, y la tercera secuencia comprende la SEQ ID NO: 40;
35 (e) la primera secuencia comprende la SEQ ID NO: 42, la segunda secuencia comprende la SEQ ID NO: 43, y la tercera secuencia comprende la SEQ ID NO: 44; o
40 (f) uno o dos o tres de (a), (b), (c), (d) y (e).

55 3.- La construcción de ARNi de NtHMA de la reivindicación 1, en donde la primera y la segunda secuencia tienen cada una, una longitud seleccionada del grupo que consiste en 20-30 nucleótidos, 30-50 nucleótidos, 50-100 nucleótidos, 100-150 nucleótidos, 150-200 nucleótidos, 200-300 nucleótidos, 300-400 nucleótidos, 400-500 nucleótidos, 500-600 nucleótidos, y 600-700 nucleótidos.

60 4.- Un vector de expresión que comprende un promotor situado en la dirección 5' y operativamente unido a la construcción de ARNi de NtHMA como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-3.

5.- El vector de expresión de la reivindicación 4, en donde el promotor se selecciona del grupo que consiste en: un promotor específico de tejido, un promotor inducible y un promotor constitutivo.

65 6.- Una planta transgénica que comprende el ARNi de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que tiene niveles de

Cd reducidos en al menos una parte de la planta comparado con la parte en un homólogo no transgénico.

7.- La planta transgénica según la reivindicación 6, en donde la planta transgénica es una planta de tabaco.

5 8.- Un producto de tabaco consumible que incorpora hojas que comprenden el ARNi de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y recogidas de la planta transgénica de la reivindicación 6, de modo que las hojas tienen niveles reducidos de Cd comparado con hojas recogidas de un homólogo no transgénico cultivado en condiciones idénticas, en donde el producto tiene niveles reducidos de Cd comparado con un producto que incorpora hojas recogidas del homólogo no transgénico, y en donde el producto es un cigarro, un cigarrillo o un producto de tabaco sin humo.

10 9.- El producto de la reivindicación 8, en donde el % de reducción de Cd puede ser un valor de al menos aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99%.

15 10.- El producto de la reivindicación 8 o reivindicación 9, en donde el contenido de Cd es un valor en el intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,05 ppm, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,1 ppm, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,5 ppm, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 1,0 ppm, o de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5 ppm.

20 11.- Un método para reducir los niveles de Cd en al menos una parte de la planta, que comprende:

reducir niveles de un ARNm de NtHMA en la planta produciendo la expresión de una construcción de ARNi, en donde la NtHMA se selecciona del grupo que consiste en:

25 un polinucleótido que comprende o consiste en una secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos 70% con la SEQ ID NO: 1, y que codifica un transportador de NtHMA que tiene actividad de ATPasa de tipo P1B;

un polinucleótido que comprende o consiste en una secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos 50% con la SEQ ID NO: 3;

30 un polinucleótido que comprende o consiste en una secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos 50% con la SEQ ID NO: 47;

un polinucleótido que comprende o consiste en una secuencia que codifica un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos 70% con la SEQ ID NO: 2, en donde el polipéptido es un transportador de NtHMA que tiene actividad de ATPasa de tipo P1B; y

35 un polinucleótido que comprende o consiste en una secuencia que codifica un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos 70% con la SEQ ID NO: 49, en donde el polipéptido es un transportador de NtHMA que tiene actividad de ATPasa de tipo P1B.

40 12.- El método de la reivindicación 11, en donde la construcción de ARNi comprende:

una primera secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos 90% con una parte de la SEQ ID NO: 3 o 47;

una segunda secuencia; y

45 una tercera secuencia que tiene una secuencia complementaria inversa de la primera secuencia, situada en la misma orientación que la primera secuencia,

en donde la segunda secuencia está situada entre la primera secuencia y la tercera secuencia, y la segunda secuencia está operativamente unida a la primera secuencia y a la tercera secuencia.

50 13.- El método de la reivindicación 11 o reivindicación 12, en donde después de la expresión de la construcción de ARNi, la parte de la planta tiene un contenido de Cd reducido en al menos aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99%.

55 14.- El método de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en donde después de la expresión de la construcción de ARNi, la parte de la planta tiene un contenido de Cd en el intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,05 ppm, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,1 ppm, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,5 ppm, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 1,0 ppm, o de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5 ppm.

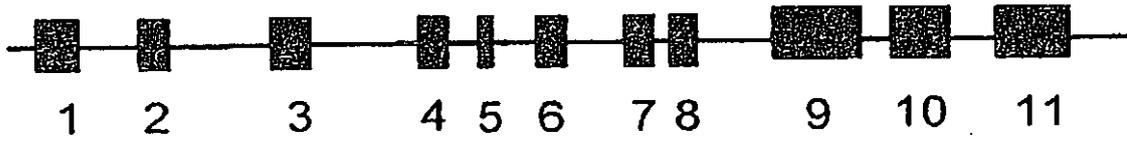
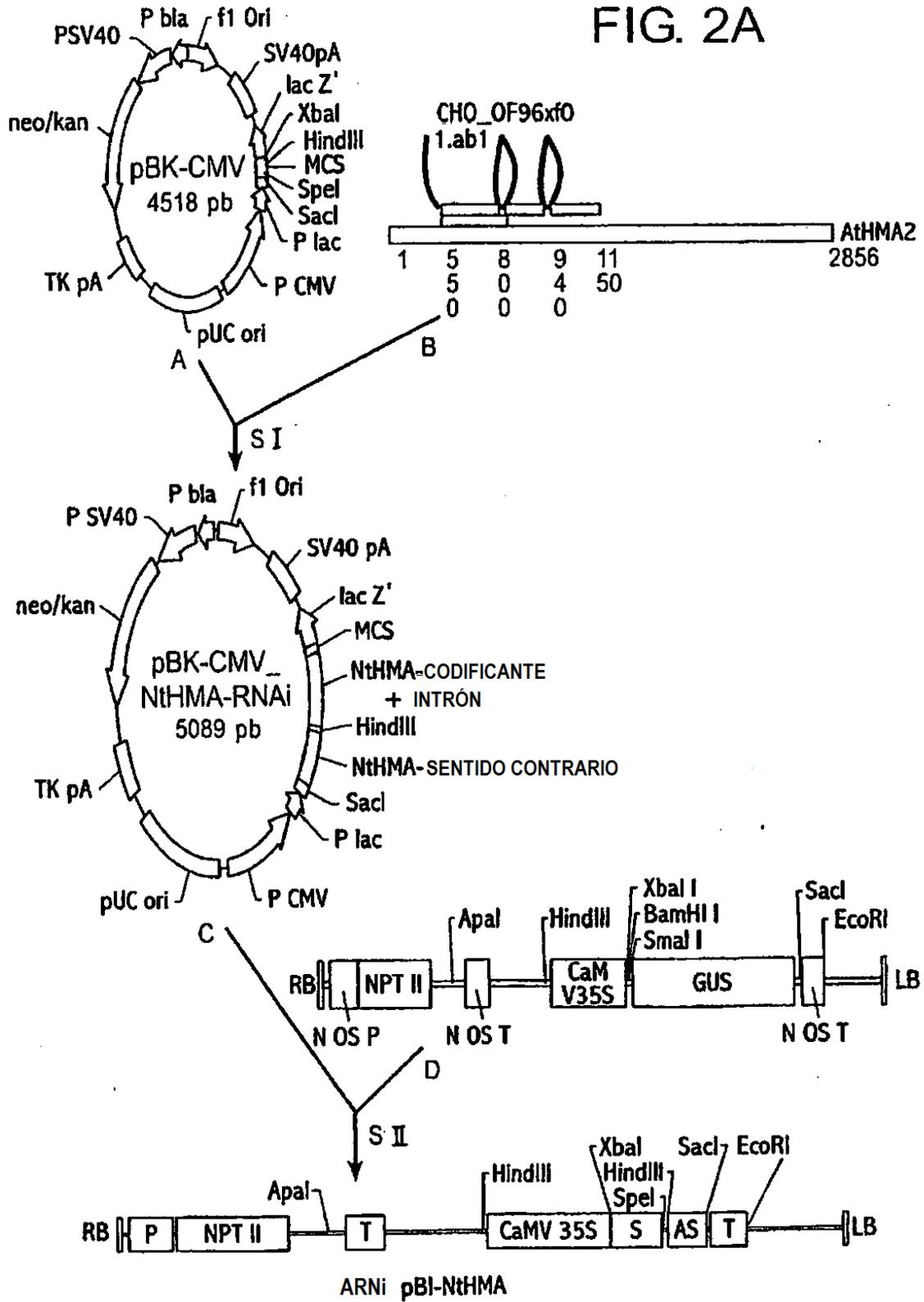


FIG.1

FIG. 2A



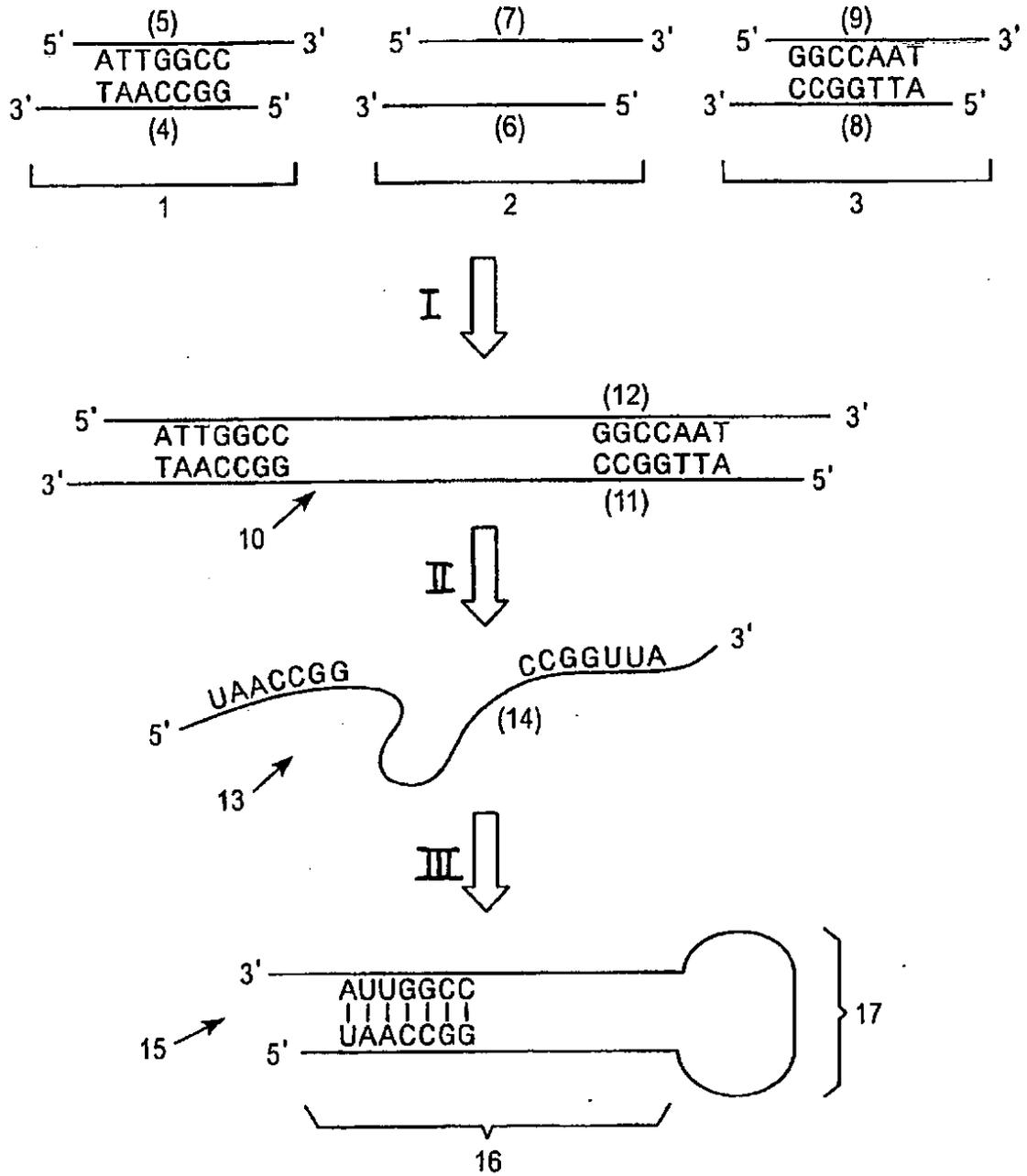


FIG. 2B

SEQ ID NO:38

5'-ATTTGTAGTGCCAGCCCAGACCGTTGAATCTATTTGCTTAGAAAC
TGGAACGACTCGCCTGTCAGTGTTTTCTCGTCCACGTCACATTCCC
CTTCCATTACAACCTCCATCAATAGGTATAGTTTCACCAGCTTTAACAG
CAAGAATGCTATTCAACTTGACTTCATCAACATTTACGACTTCTCCAC
TTTCAGCTAAAACCTGCTGTTGGAGGGACTATATTGACCAGTGATGAC
ATAGCAGCAGTAGCCTACATAACCA-3'

SEQ ID NO:39

5'-AGCCTGAAGAATTGAGCAAATAACATTAACAAACAATACTTGAAG
TTTCAGCACTAAATAAATGAAGCATGAAGGAATACTACTACTACCATTT
AGA-3'

SEQ ID NO:40

5'-TGGTTATGTAGGCTACTGCTGCTATGTCATCACTGGTCAATATAG
TCCCTCCAACAGCAGTTTTAGCTGAAAGTGGAGAAGTCGTAAATGTT
GATGAAGTCAAGTTGAATAGCATTCTTGCTGTTAAAGCTGGTCAAAC
TATACCTATTGATGGAGTTGTAATGGAAGGGGAATGTGACGTGGAC
GAGAAAACACTGACAGGCGAGTCGTTTCCAGTTTCTAAGCAAATAGA
TTCAACGGTCTGGGCTGGCACTACAAAT-3'

FIG. 3A

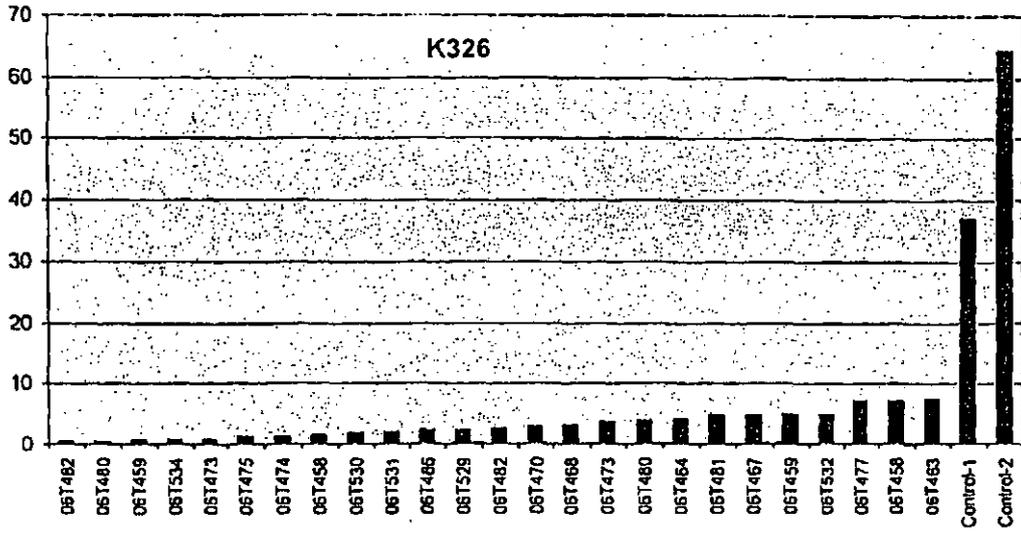


FIG. 3B

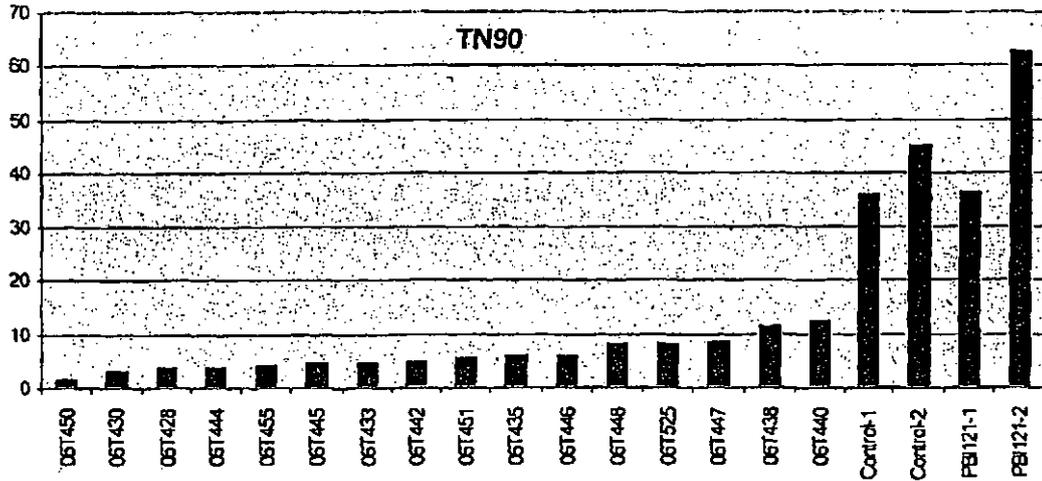


FIG. 3C

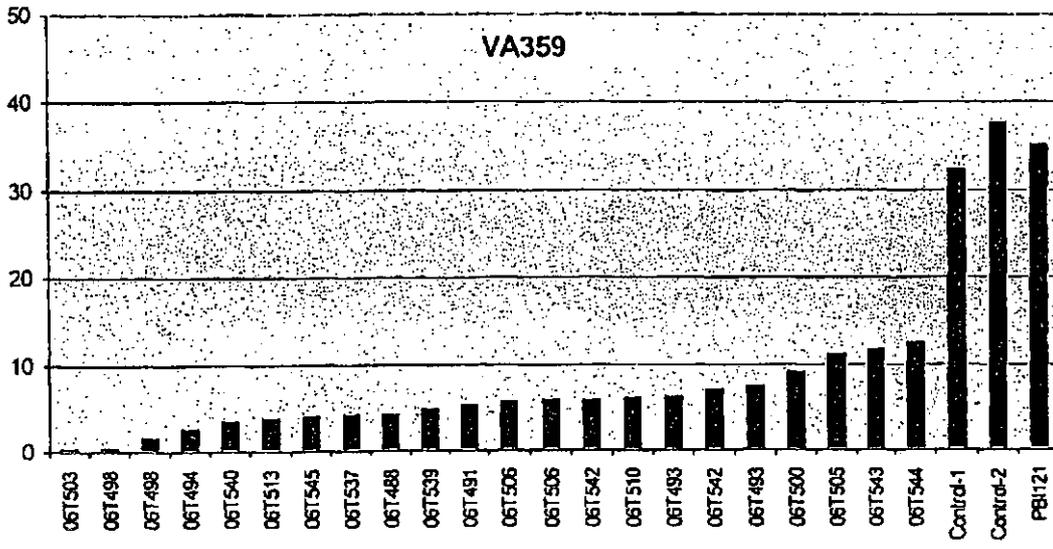


FIG. 3D

SEQ ID NO:42

5'-TGAGAGCAAGTCAGGTCATCCGATGGCAGCCGCTCTGGTGGAC
TATGCACAATCAAATTCGGTTGAGCCAAAGCCTGATAGAGTTGAGCA
GTTTCAAATTTTCCTGGTGAAGGGATATTTGGAAGAATTGATGGAAT
GGAAATCTATGTCCGGGAATAGGAAAATTTCTTCAAGAGCTGGATGTA
CCACAGG-3'

SEQ ID NO:43

5'-TAAATGGTTGAATCATTTCTTATGCTCATAGTAGAGATAAAACATC
AGAGTTATAATTATAAGTATATGATTTCTCCAGTTAATTTTGCTGTTAG
ATTTTCTTTGACCTGTTTAGCACTAATGCCGGTGGATGTTTGAA-3'

SEQ ID NO:44

5'-CCTGTGGTACATCCAGCTCTTGAAGAAATTTTCCTATTCCCGACA
TAGATTTCCATTCCATCAATTCCTCCAAATATCCCTTCACCAGGAAAA
TTTTGAAACTGCTCAACTCTATCAGGCTTTGGCTCAACGGAATTTGAT
TGTGCATAGTCCACCAGAGCGGCTGCCATCGGATGACCTGACTTGC
TCTCAATGC-3'

FIG. 4A

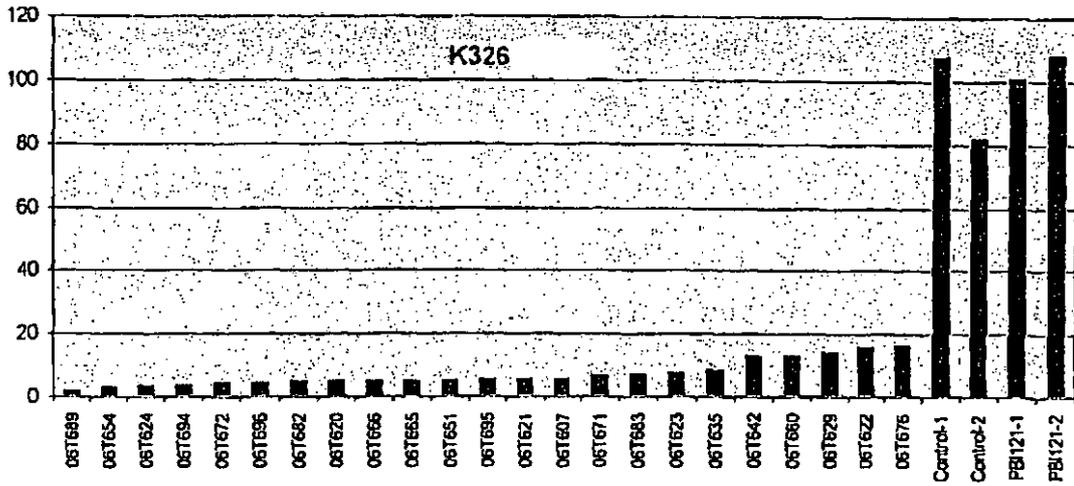


FIG. 4B

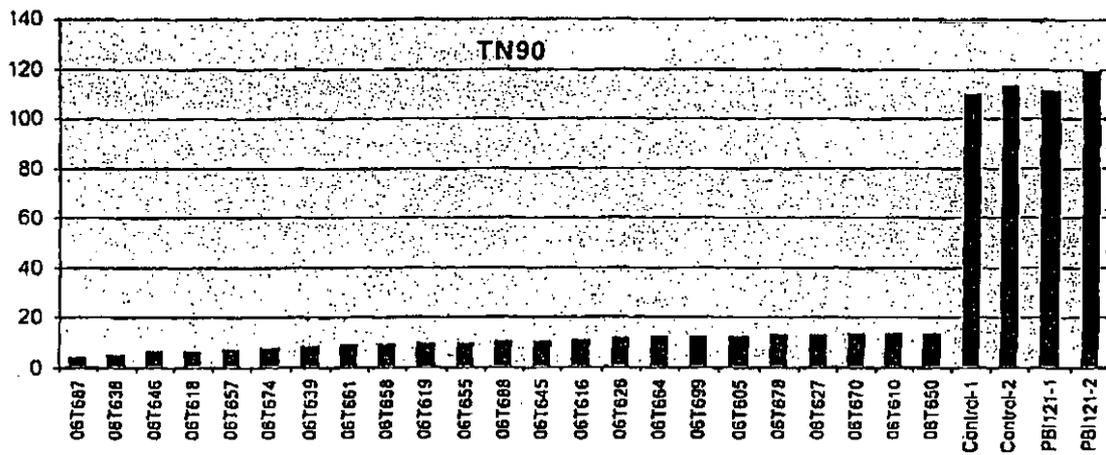


FIG. 4C

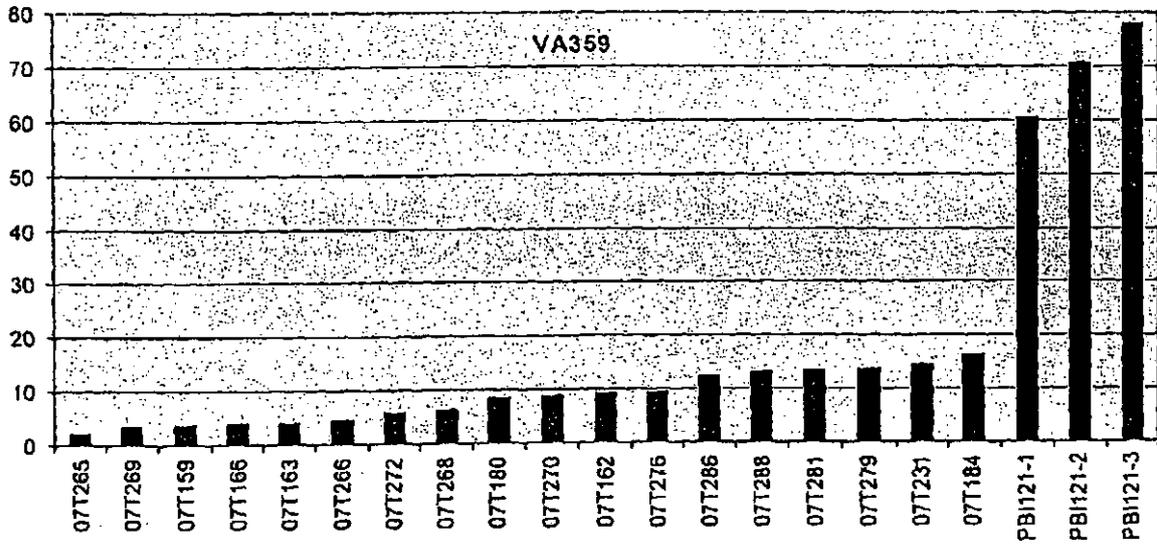


FIG. 4D

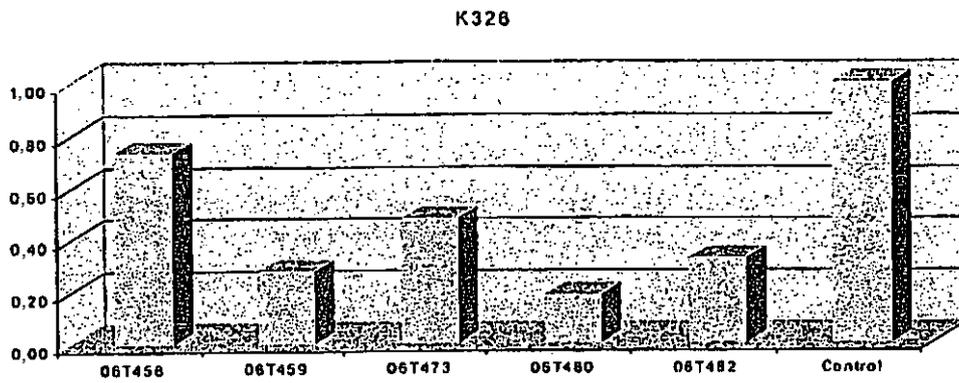


FIG. 5A

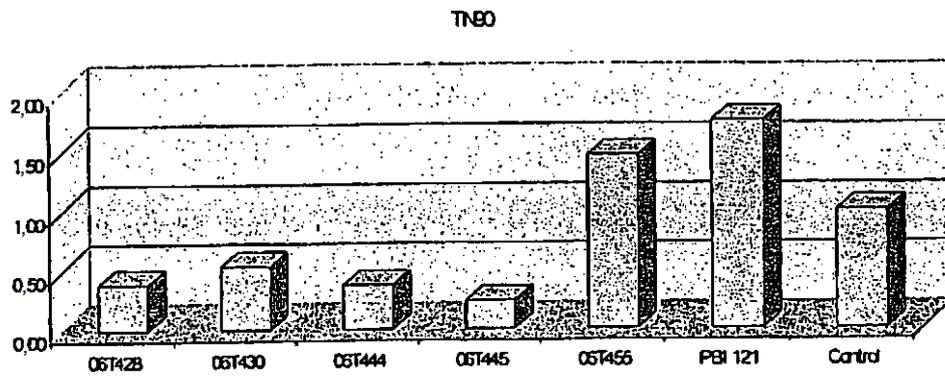


FIG. 5B

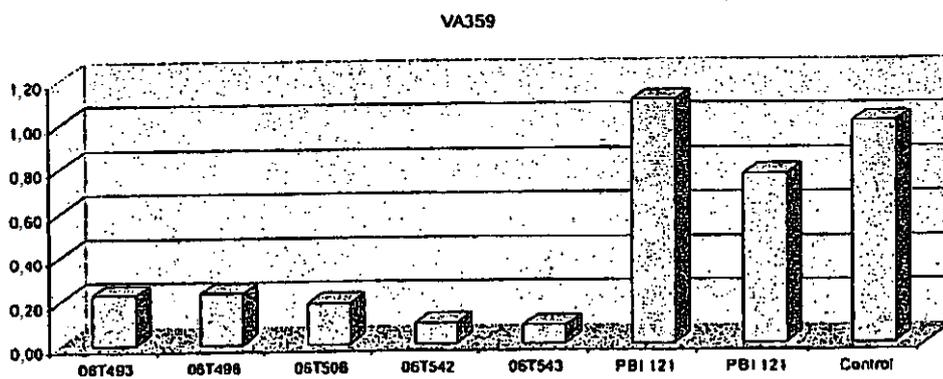


FIG. 5C

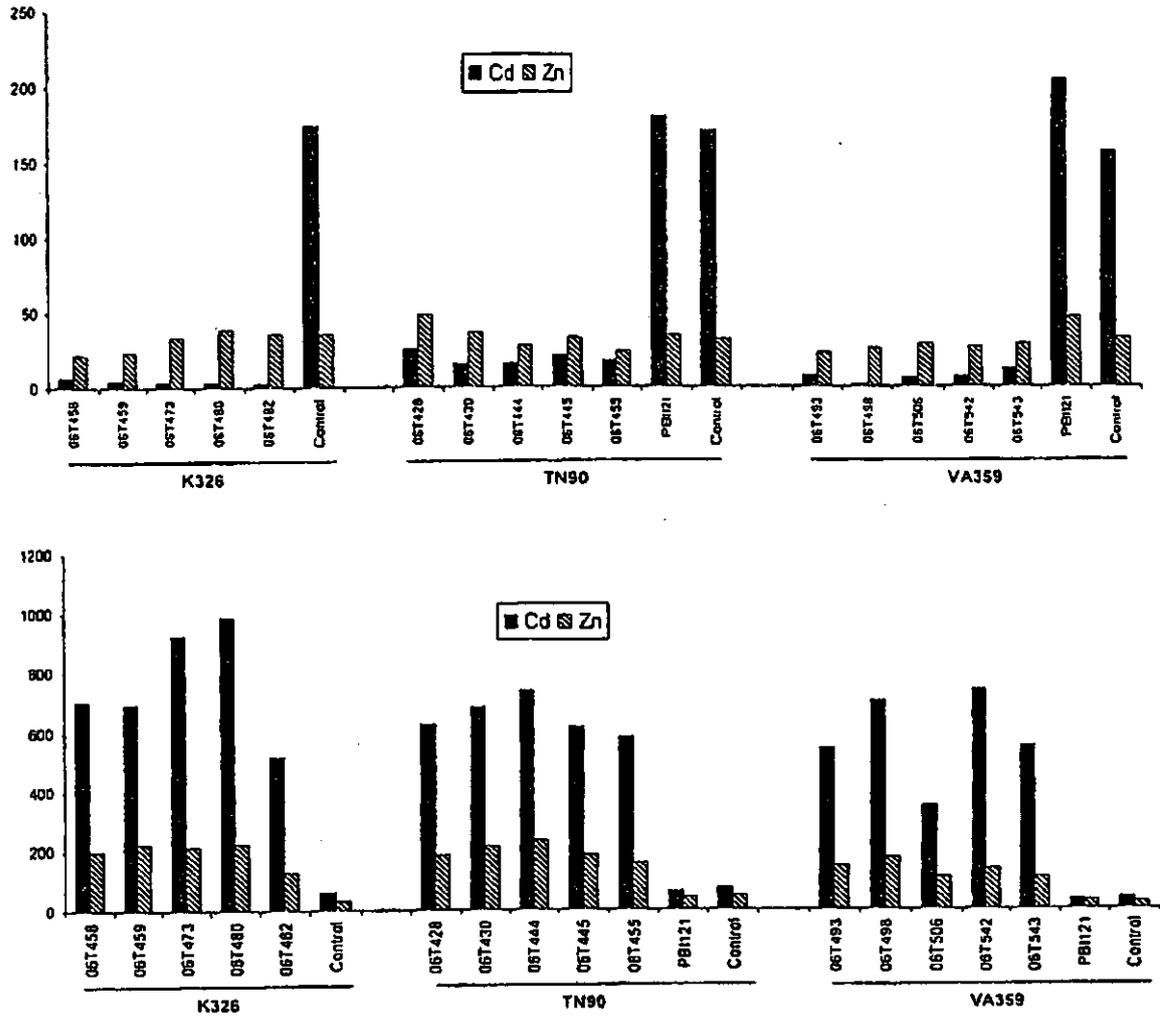


FIG. 6

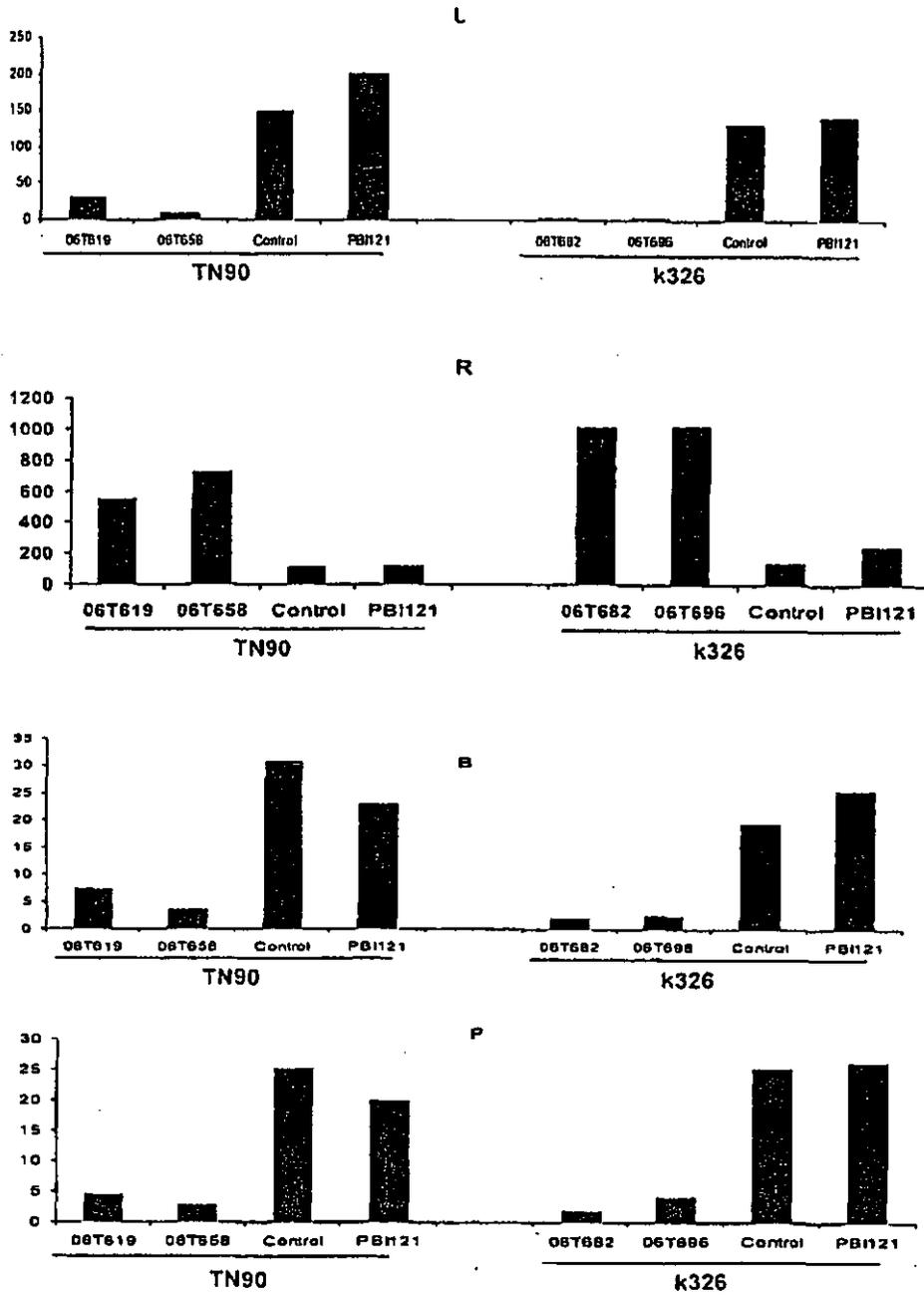


FIG. 7

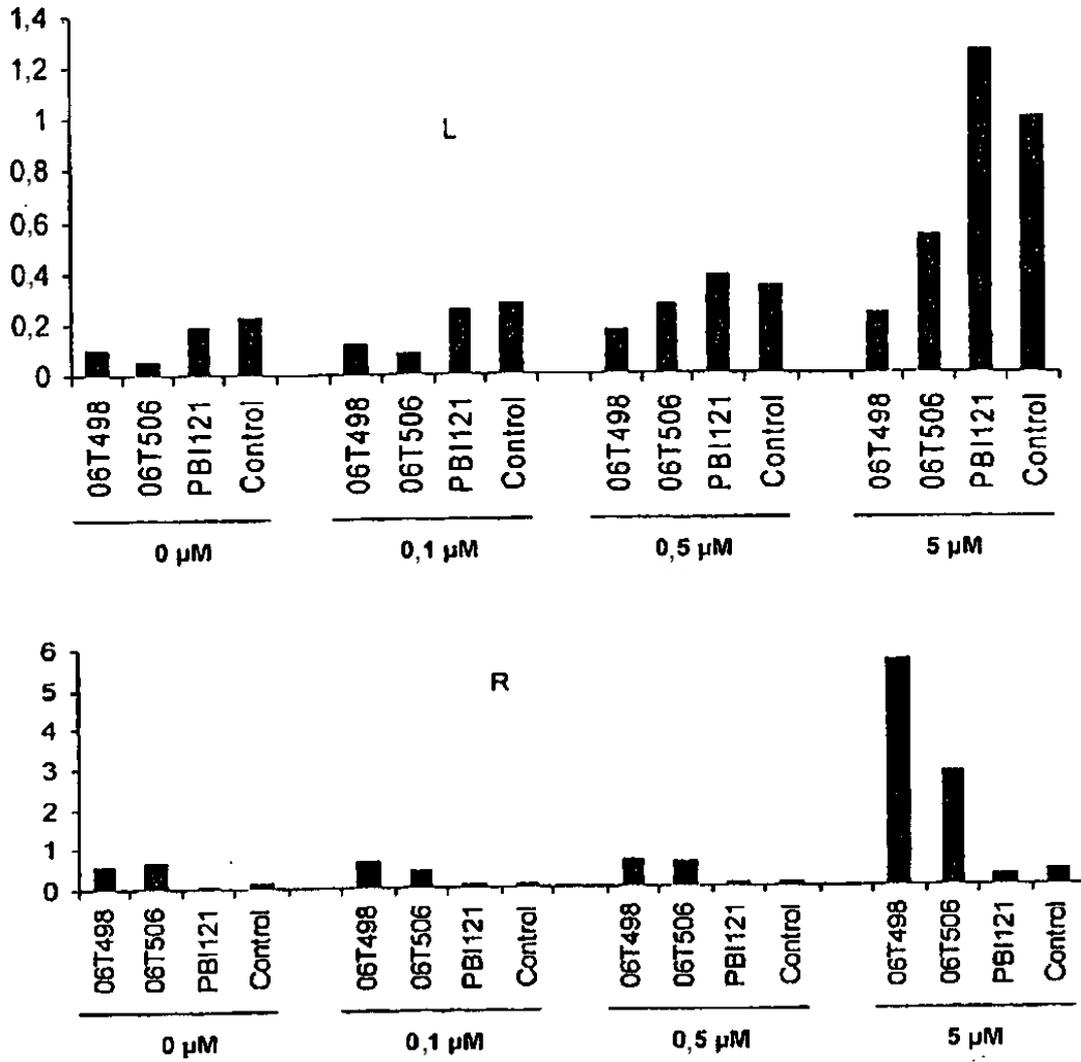


FIG. 8