

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 574 311**

51 Int. Cl.:

A24B 15/20 (2006.01)

C12N 9/14 (2006.01)

A01H 5/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.09.2011 E 11761618 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.03.2016 EP 2622081**

54 Título: **Tabaco con contenido de cadmio reducido**

30 Prioridad:

30.09.2010 EP 10290518

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

16.06.2016

73 Titular/es:

**SOCIÉTÉ NATIONALE D'EXPLOITATION
INDUSTRIELLE DES TABACS ET ALLUMETTES
S.E.I.T.A. (100.0%)
143 boulevard Romain Rolland
75014 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**JULIO, EMILIE;
DORLHAC DE BORNE, FRANCOIS y
HERMAND, VICTOR**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 574 311 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

Tabaco con contenido de cadmio reducido.

5 Los metales pesados están presentes de forma natural en el suelo y son absorbidos por las plantas en grados diferentes. Algunos metales pesados, tales como manganeso o cinc, son esenciales para las plantas, puesto que representan cofactores requeridos para la actividad enzimática.

10 Sin embargo, otros metales pesados no son esenciales para las plantas, y en algunos casos sería ventajosa una reducción en la concentración de metales pesados de plantas o partes de las plantas. Por ejemplo, el cadmio (Cd) es un metal pesado no esencial presente en el suelo y absorbido de forma natural por las raíces de las plantas. Cd se acumula en las hojas, por ejemplo en hojas de plantas de tabaco (Lugon-Moulin et al., 2006). En algunos lugares, las concentraciones de Cd en el suelo están incrementadas debido al uso de fertilizantes de fosfato ricos en Cd o lodos de aguas residuales contaminados con Cd (Karaivazoglou et al., 2007). Se han descrito los mecanismos usados por las plantas para la absorción, reparto y acumulación de metales pesados (Verbruggen et al., 2009).

Sería ventajoso reducir el contenido de metales pesados de las hojas de plantas de tabaco, y se han desarrollado diferentes estrategias que conducen a este resultado.

20 Por ejemplo, un gen de metalotioneína de mamífero bajo el control del promotor 35S se expresó en tabaco, provocando una disminución de 14% de cadmio en planta que se hace crecer en el campo (Yeargan et al., 1992) o una distribución tisular alterada del cadmio con una reducción del 73% de cadmio en la lámina (Dorlhac et al., 1998). Más recientemente, se han usado con éxito antiportadores divalentes de capacidad elevada, AtCAX2 y AtCAX4, de *Arabidopsis thaliana* para potenciar el secuestro de Cd de las vacuolas de la raíz, obteniendo así una disminución de 15-25% de Cd en la lámina de tabaco que se hace crecer en el campo (Korenkov et al., 2009).

30 Se ha identificado una familia de ATPasas de metales pesados (proteínas HMA) responsables de distribuir metales pesados en los tejidos vegetales después de que los metales han sido absorbidos, y se han clonado los genes que codifican las proteínas respectivas. Se conocen ocho tipos de genes HMA implicados en el transporte de Cd hacia y la acumulación de Cd en las hojas de *Arabidopsis thaliana* (Cobbet et al., 2003). En *A. thaliana*, las HMA del tipo 1, 5, 6, 7 y 8 son transportadores de cationes monovalentes (Cu⁺ y Ag⁺; Seigneurin-Berny et al., 2006), y las HMA del tipo 2, 3 y 4 son transportadores de cationes bivalentes (Pb²⁺, Co²⁺, Zn²⁺, Cd²⁺; Hussain et al., 2004). HMA3 es un transportador vacuolar implicado en la tolerancia a Cd, Pb y Zn (Morel et al. 2009).

35 Los genes HMA también se han identificado en otras plantas, y se ha sugerido cómo generar plantas de tabaco genéticamente modificadas, en las que la expresión de un gen HMA está inhibida por ribointerferencia (iARN) (documento WO2009/074325).

40 Sin embargo, estos enfoques para reducir metal pesado en plantas de tabaco se basan en el uso de organismos genéticamente modificados (GMO). Un enfoque que no se base en plantas genéticamente modificadas tendría ventajas significativas.

45 El cultivo de mutación se ha usado desde hace mucho tiempo para modificar rasgos existentes o para crear nuevos rasgos valiosos en una variedad de cultivo vegetal. Recientemente, esta técnica se ha combinado con un sistema de detección de mutaciones de alto rendimiento y ha demostrado ser eficiente para la modificación de propiedades en plantas de tabaco (Julio et al., 2008).

50 El tabaco moderno es un alotetraploide de *Nicotiana sylvestris* (contribuyente materno) y *Nicotiana tomentosiformis* (contribuyente paterno; Yukawa et al., 2006). La naturaleza tetraploide del tabaco (2n = 48) complica la identificación de rasgos en líneas de tabaco y la preparación de plantas de tabaco que muestren rasgos completamente nuevos.

De este modo, todavía existe la necesidad de plantas de tabaco con contenido reducido de metales pesados en las hojas.

55 Según la presente invención, este problema se resuelve mediante plantas de tabaco que comprenden al menos una mutación en un gen HMA, en las que el gen HMA no mutado comprende la secuencia nucleotídica de SEC ID NO:1 (secuencia nucleotídica del gen HMA 4) o un homólogo de la misma, en las que la mutación provoca una sustitución o una supresión o una inserción de al menos un aminoácido en el polipéptido codificado por la secuencia nucleotídica, y en las que la mutación reduce la absorción de metales pesados por las hojas de la planta en al menos 30% en relación con la absorción de metales pesados de plantas que comprenden SEC ID NO:1 o el homólogo.

60 Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que un gen HMA 4 del tabaco se puede modificar de manera que la proteína HMA 4 se inhibe sin efectos perjudiciales significativos para las plantas. En otras palabras, la presente invención proporciona plantas de tabaco normales que se pueden usar para fines comerciales con contenido significativamente reducido de metales pesados en las hojas.

Según la presente invención, un homólogo de la secuencia de SEC ID NO:1 se refiere a una secuencia con al menos 90%, preferentemente por lo menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia de SEC ID NO:1. Las secuencias de los homólogos o secuencias homólogas respectivas pueden representar diferencias entre diversas líneas de plantas de tabaco o secuencias derivadas de un ancestro común. *N. tabacum* es una planta alotetraploide, y cada planta contiene un genoma de *Nicotiana sylvestris* y *Nicotiana tomentosiformis*. Puesto que parece que SEC ID NO:1 deriva de *N. sylvestris*, la secuencia de HMA 4 derivada de *N. tomentosiformis* representa un homólogo de la secuencia de SEC ID NO:1. Secuencias similares derivadas presentes en especies diferentes también se identifican en esta solicitud como secuencias ortólogas, y representan una forma específica de una secuencia homóloga. El % de identidad se determina preferentemente mediante el software de BLAST para determinar la identidad de secuencia.

En una forma de realización preferida, la secuencia de SEC ID NO:1 o del homólogo contiene solamente una o un número pequeño de mutaciones a nivel del ácido nucleico, por ejemplo 1, 2, 3 o 4 cambios nucleotídicos. La secuencia mutada tiene aún de este modo una identidad de al menos 90%, preferentemente por lo menos 95%, y todavía más preferentemente por lo menos 98% con la secuencia del gen HMA 4. La mutación puede ser, por ejemplo, una mutación de sentido alterado, una mutación sin sentido, o una mutación de corte y empalme.

Las plantas de tabaco de la presente invención son preferentemente plantas de *Nicotiana tabacum*.

Según un aspecto, la presente invención proporciona plantas de tabaco respectivas, en las que la reducción de la absorción de metales pesados se determina haciendo crecer plantas de tabaco con y sin la mutación en condiciones idénticas en un medio líquido que contiene el metal pesado y comparando la concentración del metal pesado en la hoja, tallo o brote de la planta de tabaco con la mutación con la concentración del metal pesado en la hoja, tallo o brote de la planta de tabaco que no tiene la mutación. Se prefiere que la planta y la planta de referencia se hagan crecer de otro modo en las mismas condiciones. La concentración del metal pesado en la hoja, tallo o brote se puede identificar en cantidad de metal pesado en relación con la cantidad de material de peso seco de la planta.

La expresión "reducción de la absorción de metales pesados" se usa por lo tanto en el contexto de la presente invención para describir una reducción en la concentración de metales pesados en una hoja, tallo o brote de una planta de tabaco que presenta una mutación en el gen HMA 4 en comparación con el tejido correspondiente de una planta que no presenta la mutación pero que se ha hecho crecer de otro modo en las mismas condiciones.

La invención comprende las plantas que en estas circunstancias muestran una reducción significativa de la concentración de metales pesados en tejidos de una planta de tabaco. Se prefiere particularmente que la mutación reduzca la absorción de un metal pesado en por lo menos 40%, por lo menos 50%, por lo menos 75%, o por lo menos 95%.

Según la presente invención, se puede lograr una reducción de la absorción para uno o varios metales pesados, pero no se tiene que lograr para todos los metales pesados. Es suficiente si se logra una reducción significativa para un metal pesado. Se prefiere que la invención proporcione plantas de tabaco que muestran una absorción reducida de cadmio, plomo o arsénico. En su forma de realización más preferida, la presente invención proporciona plantas de tabaco que tienen una absorción reducida de cadmio.

De forma similar, la reducción de la absorción no necesita eliminar completamente el contenido del metal pesado en la planta o tejido vegetal. Según la presente invención, se prefiere que la reducción del contenido de metales pesados se encuentre en el intervalo de 40% a 70%, 50% a 80%, o 60% a 95%.

Se han identificado varias mutaciones en el gen HMA 4 que provocan una reducción significativa de la absorción de metales pesados, y se describen a continuación. En consecuencia, la mutación puede representar una mutación de sentido alterado, una mutación sin sentido, o una mutación de corte y empalme.

En una forma de realización, las plantas de tabaco de la presente invención comprenden una mutación seleccionada de una de las mutaciones mostradas en la figura 5/1 y figura 5/2. En una forma de realización preferida, las plantas de tabaco comprenden una de las mutaciones mostradas en la figura 5/1 o 5/2 con una puntuación SIFT menor que 0,05. En la forma de realización más preferida, las plantas de tabaco de la presente invención comprenden una mutación seleccionada de entre el grupo que comprende las mutaciones: G294A, C576T, G406A, G347A, G363A, G553A, C374T, G290A, G964A, G1168A, G1211A, G1126A, C980T, G1195T, G1156A, G1070A, C2302T, G2208A, C2217T, G2190A, C2206T o C2277T en SEC ID NO:1 o el homólogo de la misma.

Según una forma de realización de la presente invención, las plantas de tabaco pueden comprender una mutación en más de un gen HMA 4. Como se indicó, las plantas de tabaco contienen genes HMA 4 procedentes de *N. Sylvestris* and y de *N. tomentosiformis*. Las plantas que están mutadas en ambos genes HMA 4 también se identifican como mutantes dobles en la presente invención.

Las plantas de tabaco de la presente invención pueden ser homocigotas o heterocigotas para una mutación

cualquiera en uno de los genes HMA 4. Según una forma de realización particularmente preferida, se proporcionan plantas que contienen mutaciones homocigotas en ambos genes HMA 4.

5 La presente invención también se refiere a una parte de una planta de tabaco como se describe anteriormente, en la que la parte es una hoja, una lámina, una hoja cortada y/o curada, raíz, brote, tallo, flor o semilla. Nuevamente, en el contexto de la presente invención, la parte de una planta de tabaco es preferentemente una parte de una planta de *Nicotiana tabacum*. La semilla de una planta de tabaco como se describe anteriormente representa una forma de realización particularmente preferida de la presente invención.

10 Las plantas de tabaco de la presente invención, o sus partes, se pueden usar para generar productos de tabaco bien conocidos en la técnica, incluyendo productos de tabaco que no se fuma como tabaco de mascar de tipo snus, rapé y tabaco picado, extracto de tabaco o tabaco reconstituido.

15 En una forma de realización alternativa, las plantas de tabaco de la presente invención, o sus partes, se usan para generar artículos para fumar que también representan una realización de la invención. Los artículos para fumar son bien conocidos, e incluyen un cigarrillo ("cigarette"), un purito ("small cigar"), un cigarrillo ("cigarillo") o un puro ("cigar"), o artículos para fumar simuladamente que contienen tabaco.

20 Las plantas de la presente invención se pueden obtener por métodos que comprenden las siguientes etapas:

(a) cribar una genoteca de plantas de tabaco obtenidas mediante mutagénesis para al menos una mutación en un gen HMA, en las que el gen HMA no mutado comprende la secuencia nucleotídica de SEC ID NO:1 (secuencia nucleotídica del gen HMA 4) o un homólogo de la misma, en las que la mutación provoca una sustitución o una supresión o una inserción de al menos un aminoácido en el polipéptido codificado por la secuencia nucleotídica, y en las que la mutación reduce la absorción de metales pesados por las hojas de la planta de tabaco en por lo menos 30% en relación con la absorción de metales pesados de plantas que comprenden SEC ID NO:1 o el homólogo;

30 (b) cruzar la planta de tabaco que presenta una mutación en el gen HMA con una planta de producción de *Nicotiana tabacum* comercial; y

(c) identificar la descendencia con la mutación en el gen HMA;

35 (d) repetir las etapas (b) y (c).

Como anteriormente, la reducción de la absorción de metales pesados se puede determinar haciendo crecer plantas de tabaco con y sin la mutación en condiciones idénticas en un medio líquido que contiene el metal pesado y comparando la concentración del metal pesado en la hoja, tallo o brote de la planta de tabaco con la mutación con la concentración del metal pesado en la hoja, tallo o brote de la planta de tabaco que no tiene la mutación.

40 Los métodos producen plantas con absorción reducida del metal pesado en por lo menos 30%, por lo menos 50%, por lo menos 75%, o por lo menos 95%.

45 Las plantas pueden tener una absorción reducida de uno o varios metales pesados. Se prefiere que se reduzca la absorción de cadmio, plomo o arsénico.

50 Según una forma de realización preferida, las etapas (a) y/o (c) del método usan un ensayo que analiza la secuencia nucleotídica de la planta de tabaco (*Nicotiana tabacum*). Los ensayos respectivos para análisis nucleotídicos son bien conocidos en la técnica de biología molecular, e incluyen técnicas a base de PCR, secuenciación del ADN, hibridación y/o técnicas de RFLP.

55 Un producto de tabaco o un artículo para fumar se puede obtener a partir de las plantas de la presente invención cosechando las hojas, tallos y/o brotes y produciendo un producto de tabaco o artículo para fumar a partir de los mismos.

Breve descripción de las figuras

60 figura 1: Alineamiento parcial de secuencias de la amplificación de la parte A en *N. tabacum*, *N. sylvestris* y *N. tomentosiformis*.

La primera secuencia es el cóntigo de referencia. En este alineamiento, están presentes tres secuencias diferentes: las secuencias 1, 2, 3, 9, 10, 11 están compartidas entre *N. tabacum* y *N. sylvestris*. Las secuencias 6, 7, 8, 12, 13, 14, 15, 16 están compartidas entre *N. tabacum* y *N. tomentosiformis*. Las secuencias 4 y 5 son específicas de *N. sylvestris*.

65 figura 2: Amplificación del ADN bc de las copias 1 y 2 de los ortólogos de HMA en *N. tabacum*.

Se usaron cebadores específicos diseñados para hibridarse en las regiones exónicas de la parte A para evaluar la expresión de las dos copias en raíces (R) y brotes (S). El par de cebadores HmaAS-F/HmaA-RT-R amplifica la secuencia origen de *N. sylvestris* (Copia S), y el par de cebadores HmaAT-F/HmaA-RT-R amplifica la secuencia origen de *N. tomentosiformis* (Copia T). Ambas copias se expresan en *N. tabacum*.

figura 3: Análisis CODDLE de toda la secuencia del cóntigo (SEC ID NO:1).

Primera línea: secuencia de aminoácidos de la proteína HMA4

Segunda línea: secuencia de ADN del gen HMA4

Tercera línea: debajo de cada nucleótido hay una indicación de los cambios que se pueden detectar con mutagénesis mediante EMS.

figura 4: Perfil mediante CE-SSCP obtenido mediante amplificación por PCR de la colección de mutantes de ADN con cebadores Hma4-BF/Hma4-BR. El cebador HmaA4-BF está marcado con el fluoróforo FAM, y la hebra de ADN aparece en azul. El cebador Hma-BR está marcado con el fluoróforo VIC, y la hebra de ADN aparece en verde.

1: Perfil de ADN de un ADN de tipo natural

2: Perfil de ADN de un ADN mutante (familia E1-276 de la colección), caracterizado por un pico adicional que corresponde a la hebra de ADN mutado (flecha roja).

figura 5: Tabla que resume las mutaciones encontradas en dianas de HMA tras la clonación y secuenciación.

^a = Número de identificación de la familia mutante como se describe en la colección.

^b = Cambio nucleotídico o de aminoácido y posición de la mutación como se describe con el análisis CODDLe en el cóntigo 1 (nucleótido/aminoácido original + posición + nuevo nucleótido(aminoácido)).

“=” representa mutación silenciosa, “*” representa codón de parada.

^c = La puntuación de SIFT se obtuvo con el programa bioinformático SIFT (Clasificación Intolerante de Tolerante) en el cóntigo 1. Se predice que las puntuaciones de SIFT < 0,05 son dañinas para la proteína.

* Ninguna mutación por EMS (G/C a A/T)

figura 6: Contenido de cadmio en tres líneas mutantes M3 E1-276 (276B5; 276B8, 278B18) en comparación con el tipo natural (BB16NN).

El cadmio se midió en brotes (A) o raíces (B). A la izquierda, las gráficas representan la acumulación de cadmio en µg por g de pesos secos. A la derecha, las gráficas representan la acumulación de cadmio normalizada en mutantes con acumulación de cadmio en tipo natural.

Contenido de cadmio en brotes: las letras “A” y “B” en las barras representan dos grupos distintos en un ensayo de la “T” de Student realizado en estas muestras.

Acumulación de cadmio en raíces: la letra “A” en las barras indica que todas las medias en esta gráfica pertenecen al mismo grupo estadístico.

Las barras de error representan desviación estándar.

figura 7: Foto de un cruce F1 entre el mutante E1-276-B18 y una planta de tabaco curada en chimenea industrial que muestra la viabilidad de los mutantes.

figura 8: Acumulación de cadmio en brotes de las líneas de EMS (M plantas mutadas; Htz plantas mutantes heterocigotas; S plantas de tipo natural; DW peso seco). Las gráficas a la izquierda representan la cantidad de cadmio acumulada en los brotes. Las barras de error reflejan el error estándar. En el lado derecho, la acumulación de cadmio en la línea mutada se representa como un porcentaje con respecto a su tipo natural.

- 5
10
15
20
25
30
35
40
- figura 9: Análisis estadístico de las líneas de EMS. Los valores p presentados en esta tabla derivan del ensayo de la t de Student (<http://www.graphpad.com>). Las diferencias observadas entre cada línea mutada y su tipo natural es estadísticamente relevante cuando el valor p es menor que 0,05 (95% de confianza).
- figura 10: Acumulación de transcritos de ARN en líneas iARN. Las barras representan la media de la acumulación de transcritos de HMA alfa o HMA beta con respecto a la acumulación de transcritos del gen de referencia ciclofilina y L2. Se usaron tres plantas por línea. Las barras de error representan error estándar. Las letras A y B representan los dos grupos encontrados por el ensayo de la t de Student realizado con el software abierto "R".
- figura 11: Acumulación de metal en brotes de líneas iARN. Para cada línea, se analizaron 4 plantas (solamente 3 para pGreen). La acumulación de cadmio se representa en la parte superior. En la izquierda, la acumulación de cadmio se expresa como una media. En la parte superior derecha, esas medias se expresan como porcentaje de tipo natural. En la parte inferior, se representa la acumulación de hierro y de cinc en los brotes. Las barras de error representan error estándar. Las letras A y B representan grupos estadísticos realizados con el software abierto "R". Las letras son independientes en cada gráfica.
- figura 12: Cruces realizados entre mutantes de tabaco para acumular ambas copias mutadas en un genoma. Los mutantes se retrocruzaron primeramente con tipo natural, y después se cruzaron entre ellos para obtener la generación F1. El nombre F1 se describe como F1CD2, representando los números siguientes ambas identificaciones mutantes.
- figura 13: Líneas de EMS. Las líneas se presentan con la colección a partir de la que se originan y la mutación que afecta a un gen o al otro.
- figura 14: Constructos de miARNa. Todas las secuencias seleccionadas como dianas y sus secuencias cebadoras correspondientes se obtuvieron usando software en línea (<http://www.weigelworld.org/>).
- figura 15: Secuencia seleccionada como diana del constructo de horquilla. Los pares de cebadores (A) se diseñaron para amplificar la misma porción del gen *HMA* (B), pero portan diferentes sitios de restricción.
- figura 16: Vector pHannibal. Este vector contiene 2 conjuntos de sitios de restricción separados mediante un intrón.
- figura 17: Acumulación de metal en brotes; resultados gráficos obtenidos mediante comparación múltiple de Tukey de las medias. Las barras de error representan error estándar. Las letras A, B, C y D representan grupos estadísticos obtenidos con el software abierto "R" para análisis de cadmio.
- figura 18: Acumulación de metal en brotes; los resultados gráficos se obtienen mediante comparaciones múltiples de Tukey de las medias.

45 **Ejemplo 1**

Colección de mutantes de tabaco

50 Material vegetal

Se usaron semillas de tres líneas de tabaco BB16NN (Delon et al. 1999; Institut du Tabac de Bergerac, nº de Acceso 1139), BY02 y V4K1 para crear genotecas de mutantes de *Nicotiana tabacum*. BB16NN y BY02 son tabacos de tipo Burley, y V4K1 es un tabaco de tipo curado en chimenea.

55 Para la evaluación del número de copias, se realizó la comparación de secuencias con los ancestros con líneas de tabaco ITB 645 (*Nicotiana tomentosiformis*) y ITB 626 (*Nicotiana sylvestris*).

Mutagénesis por EMS

60 La colección de mutantes se ha descrito en Julio *et al.*, 2008. De forma breve, se construyeron dos genotecas de mutantes por EMS (metanosulfonato de etilo) de tabaco, denominadas L1 y L2, empapando semillas de tabaco BB16NN (6000 semillas por genoteca) toda la noche (16 h) en disoluciones de EMS al 0,8% (L1) o de EMS al 0,6% (L2), seguido de 12 lavados durante 30 min. en agua con agitación. Además, las semillas de la genoteca L1 se germinaron previamente durante 2 días antes del tratamiento con EMS.

65 Se desarrollaron otras dos colecciones a partir de semillas BY02 (denominada L3) y V4K1 (denominada L4) con un

tratamiento con EMS al 0,7% y sin germinación previa.

Las semillas M1 mutagenizadas se hicieron crecer hasta plántulas M1 en un invernadero, y se transfirieron al campo para dar la generación M2 mediante autopolinización. Las semillas M2 se recogieron de cada planta M1 y se almacenaron hasta el uso. El material foliar se recogió de 8 semillas M2 sembradas en una sola maceta en el invernadero y reunidas (dos discos de 8 mm de diámetro para cada planta, es decir, ~ 100 mg de peso fresco por familia) para constituir la familia M2 reunida. El ADN se extrajo del material foliar usando el kit para plantas QIAGEN Dneasy 96, según las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 2

Evaluación del número de copias

Amplificación mediante PCR

En SEC ID NO:1 se muestra parte de la secuencia genómica de una HMA 4 del gen de *Nicotiana tabacum*.

N. tabacum es una planta alotetraploide que comprende un genoma de *Nicotiana sylvestris* y *Nicotiana tomentosiformis*. Parece que SEC ID NO:1 deriva de *N. sylvestris*.

Cuatro regiones genómicas de este gen HMA 4, identificadas como parte A, B, C y D, se amplificaron en *N. tabacum*, *N. sylvestris* y *N. tomentosiformis* usando los pares de cebadores respectivos:

Parte A-F (CTACCGCTGCTATGTCATCAC) SEC ID NO:2 y
Parte A-R (TAGCACACTTGTGCGATGTATC) SEC ID NO:3;

Parte B-F (GATACATCGACAAGTGTGCTA) SEC ID NO:4 y
Parte B-R (CTCCTTTAGTTATAGTCCCTG) SEC ID NO:5;

Parte C-F (AGTAAATACTGAATTGTCTAGTG) SEC ID NO:6 y
Parte C-R (GATGTTTTATCTCTACTATGAGC) SEC ID NO:7;

Parte D-F (GACCTGTTTAGCACTAATGCG) SEC ID NO:8 y
Parte D-R (TTATAATCATTTCAGCGTAATGCAG) SEC ID NO:9.

Las amplificaciones mediante PCR se llevaron a cabo en un volumen de 20 µl que contiene 1 µl de ADN, 10X de tampón AmpliTaq (Applied Biosystems, Foster City, USA), 1 µl de dNTPs (Applied Biosystems, 2,5 mM cada uno), 50 ng de cada cebador, y 0,05 U de AmpliTaq Polymerase (Applied Biosystems). La PCR se llevó a cabo usando un ciclador térmico (GeneAmp® PCR System 2700, Applied Biosystems) según lo siguiente: 35 ciclos de 94°C durante 30 s, 62°C durante 45 s, 72°C durante 1 min., seguido de 7 min. a 72°C para el alargamiento final.

Resultados

Cuatro partes de la secuencia del cóntigo mostrada en SEC ID NO: 1 se amplificaron en *N. tabacum*, *N. tomentosiformis* y *N. sylvestris*. La parte A corresponde aproximadamente a los exones 4 a 5, la parte B corresponde aproximadamente al exón 6, la parte C corresponde al exón 7, y la parte D corresponde al exón 8. Se secuenciaron seis a diez clones para cada producto de la PCR. En la figura 1 se muestra un ejemplo de alineamiento de secuencias en la parte A. Algunas secuencias fueron comunes entre *N. tabacum* y sus ancestros (*N. sylvestris* y *N. tomentosiformis*); otras son específicas de un ancestro. Los resultados se resumen en la Tabla 1, a continuación.

Tabla 1. Resultados obtenidos tras clonar y secuenciar productos de la PCR amplificados con los cebadores HmaA-F/R (parte A), HmaB-F/R (parte B), HmaC-F/R (parte C) y HmaD-F/R (parte D).

	Parte A		Parte B		Parte C		Parte D	
	Específico	Común con <i>N. tabacum</i>						
<i>N. sylvestris</i>	2	1	n.f.	1	n.f.	1	n.f.	1
<i>N. tomentosiformis</i>	n.f.	1	1	n.f.	1	n.f.	n.f.	1

Puesto que se secuenciaron 6 a 10 clones por producto de la PCR, los resultados se expresan como un número mínimo de copias existentes.

n.f. = no encontrado

Estos resultados muestran que *Nicotiana tabacum* contiene al menos dos loci de HMA4, un locus de cada uno de los dos ancestros. Como consecuencia, cualquier planta de *Nicotiana tabacum* puede contener al menos cuatro alelos de HMA 4 diferentes.

5

Extracción de ARN y ensayo de ADNc bc

El ARN se extrajo de las raíces y brotes de plantas de dos meses con el kit para plantas Rneasy según las instrucciones del fabricante (Qiagen). El ADNc y el ADNc bc se prepararon según las instrucciones del fabricante usando el kit de síntesis de ADNc MINT de Evrogen.

10

La expresión de ambos loci se evaluó amplificando ADNc bc que procede de raíces y brotes de *N. tabacum* con cebadores específicos diseñados en base a las regiones exónicas de la parte A. Se usó HmaAS-F/HmaA-RT-R para amplificar la secuencia origen de *N. sylvestris*, y HmaAT-F/HMA-RT-R para la secuencia origen de *N. tomentosiformis*. Los fragmentos se amplificaron para ambas copias (*N. sylvestris* y *N. tomentosiformis*) del gen, como se demuestra en la figura 2, apoyando la conclusión de que las secuencias presentes en ambos loci son expresadas en raíces y brotes de *N. tabacum*.

15

La amplificación de las dos copias en secuencias expresadas se ensayó en la región A, con pares de cebadores no marcados específicos:

20

- cebadores directos Hma-AS-F GGTGAATAGCATTCTTGCTGTG SEC ID NO:19; y HmaAT-F, GTTGAATAGCATTCTTGCTGTT SEC ID NO:21; y
- un nuevo cebador inverso común HmaA-RT-R, CTTGTTCTGAGCATCTTCGAC SEC ID NO:20, diseñado para unirse en la región exónica.

25

La PCR se llevó a cabo en las mismas condiciones que para la evaluación del número de copias. Los productos de la PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 1,5% con EtBr (bromuro de etidio) bajo UV.

30

Ejemplo 3

Identificación de mutantes vía PCR

Se diseñaron nuevos cebadores para amplificar específicamente las regiones a usar para la identificación de los mutantes. Los cebadores se seleccionaron según tres criterios:

35

- Posiciones de intrón y exón: se prefieren regiones exónicas, incluso si los cebadores se pueden diseñar en regiones intrónicas.
- Impacto elevado de las mutaciones por EMS en la secuencia proteica: el impacto de la mutación sobre la función proteica se evaluó mediante el software CODDLe [Escogiendo Codones para Optimizar el Descubrimiento de Lesiones Dañinas]. CODDLe identifica la región o regiones de un gen seleccionado por el usuario y de su secuencia codificante [CDS] en la que las mutaciones de punto anticipadas muy probablemente den como resultado efectos dañinos sobre la función del gen (Till et al., 2003). Los resultados de CODDLe sobre toda la secuencia de cóntigos se muestra en la figura 3.
- Longitud de la secuencia: la longitud máxima de la secuencia para la identificación mediante CE-SSCP es 500 pb. Se prefiere una secuencia grande para maximizar la posibilidad de descubrir mutantes.

40

45

50

Los nuevos pares de cebadores siguientes se diseñaron para amplificar:

Región A: el par de cebadores HmaAS-F/HmaA-R amplifica la secuencia origen de *N. sylvestris*, y HmaAT-F/HMA-R amplifica la secuencia origen de *N. tomentosiformis*.

55

Región B: par de cebadores HmaB-F/HmaB-R

Región D: el par de cebadores HmaDS-F/HmaDS-R amplifica la secuencia origen de *N. sylvestris*, y el par de cebadores HmaDT-F/HmaDT-R amplifica la secuencia origen de *N. tomentosiformis*.

60

La especificidad de los pares de cebadores se comprobó clonando y secuenciando diez productos de la PCR.

Se usaron cebadores marcados fluorescentemente (6-FAM (azul), VIC (verde), NED (amarillo); todos de Applied Biosystems) para el análisis de polimorfismo de conformación de hebra sencilla con electroforesis capilar (CE-SSCP). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en las mismas condiciones como se usan para la evaluación del número de copias.

65

Se amplificaron dos copias de 410 pb diferentes en las regiones A con:

- cebador directo HmaAS-F (VIC-GGTGAATAGCATTCTTGCTGTG) SEC ID NO:10; o
- cebador directo HmaAT-F (NED-GTTGAATAGCATTCTTGCTGTT) SEC ID NO:12; y
- cebador inverso común HmaA-R (6FAM-GCACAAACATAAGATTCACTAAC) SEC ID NO:11.

Se amplificó una única secuencia de 386 pb en la región B con:

- cebador directo HmaB-F 6FAM-GTCTGATTTGCGACTGGTGATG SEC ID NO:13; y
- cebador inverso HmaB-R VIC-AAGAATATGTATGAGTGGTAACC SEC ID NO:14.

Se amplificaron separadamente dos copias de 293 pb en la región D con:

- par de cebadores HmaDT-F, 6FAM-GAAATAGAGGGTGATAGTTTCC SEC ID NO:15, y HmaDT-R, NED-CATTCAGCGTAATGCAGAATTT SEC ID NO:16, para la primera copia; y
- HmaDS-F, VIC-GAAATAGAGGGTGATAGTTTCA SEC ID NO:17, y HmaDS-R, 6FAM-CATTCAGCGTAATGCAGAATTA SEC ID NO:18, para la otra copia.

Electroforesis capilar

Los productos de la PCR marcados fluorescentemente se diluyeron 1/20 en agua antes del análisis mediante CE-SSCP. Antes de la carga en un ABI Prism® 3130 (Applied Biosystems, Foster City, USA), se añadió 1 µl de muestra diluida a 10 µl de formamida (Applied Biosystems) y 0,1 µl de Genescan-500 LIZ Size Standard (Applied Biosystems). Para el análisis de conformación de hebra sencilla se usó una etapa de desnaturalización de 94°C durante 3 min., seguido de enfriamiento en hielo.

Las condiciones de paso en ABI Prism® 3130 fueron las siguientes: matriz capilar 36 cm (16 capilares), temperatura de paso de 22°C, inyección de la muestra de 1 kV durante 15 s y separación de 15 kV durante 40 min. El medio de separación no desnaturalizante fue POP Conformational Analysis Polymer (Applied Biosystems) 5%, glicerol (Sigma-Aldrich) 10% en tampón 1X (10X) con EDTA (Applied Biosystems). El tampón de pasada fue glicerol 10% en tampón 1X (10X) con EDTA. Los resultados se analizaron con el software GeneMapper 4.0 (Applied Biosystems).

Clonación y secuenciación

Los productos de la PCR se clonaron en pGEM-T vector Systems (Promega, Madison, USA) y se transformaron en *E. coli* según las instrucciones del fabricante. Se secuenciaron diez clones para cada familia, usando el kit de secuenciación BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) y ABI Prism® 3130 (Applied Biosystems). Las secuencias nucleotídicas se alinearon con Multalin (http://npsa-pbil.ibcp.fr/NPSA/npsa_multalinan.html).

Resultados

Identificación de mutantes en los ortólogos de HMA4 en tabaco

Los cebadores se marcaron fluorescentemente y se usaron para amplificar el ADN de la colección de mutantes. Los productos de la PCR marcados fluorescentemente se analizaron mediante CE-SSCP como se describe anteriormente.

Los mutantes se detectaron mediante la presencia de picos adicionales en el perfil del análisis, en comparación con el control (ADN de un tabaco no mutado). En la figura 4 se muestra un ejemplo con cebadores Hma4-BF/Hma4-BR.

Los productos de la PCR de mutantes se clonaron y secuenciaron para caracterizar la posición de la mutación. Las secuencias obtenidas se alinearon y se compararon con el control. El impacto de las mutaciones sobre la función proteica se analizó mediante el programa Sorting Intolerant From Tolerant (SIFT) (Ng y Henikoff 2003).

Los resultados completos de las mutaciones obtenidas en Hma-AS, Hma-AT, Hma-B, Hma-DS y Hma-DT se resumen en la Tabla mostrada en la figura 5/1 y 5/2.

Se obtuvieron 19 mutaciones para la diana Hma-AS, 18 para Hma-AT, 20 para Hma-B, 11 para Hma-DT y 3 para Hma-DS.

Las mutaciones sin sentido se pudieron obtener para Hma-AS y Hma-DT. Las mutaciones silenciosas y de sentido alterado representan respectivamente 9% a 33% y 61% a 81% del número total de mutaciones, como se presenta en la tabla 2. Una mutación en una región de corte y empalme se pudo encontrar en la diana Hma-B. Se pudieron

encontrar mutaciones que afectan al mismo aminoácido. Se encontraron dos mutaciones exactamente redundantes en Hma-AT, una en Hma-AS, 3 en Hma-B y una en Hma-DT. De las 71 mutaciones obtenidas, se observaron 2 transversiones (2,8%) (en lugar de las transiciones G/C a T/A esperadas con el tratamiento con EMS).

5 Tabla 2: Porcentaje de mutación según la diana y el tipo de mutación.

	Total	Silenciosa	Sentido alterado	Sin sentido	Intrón	Ayuste
Hma-AS	19	31,6	63,2	5,3	0,0	0,0
Hma-AT	21	22,2	57,1	0,0	9,5	0,0
Hma-B	20	20,0	70,0	0,0	5,0	5,0
Hma-DT	11	9,1	81,8	9,1	0,0	0,0
Hma-DS	3	33,3	66,7	0,0	0,0	0,0

Ejemplo 4

10 *Translocación de metales pesados*

Cultivo hidropónico

15 Las líneas M2 EMS seleccionadas se hicieron crecer en tierra en un invernadero a fin de obtener semillas mutantes homocigotas. Se extrajo ADN de plantas de 2 meses para el genotipado mediante CE-SSCP. Las líneas mutantes homocigotas se autopolinizaron para obtener semillas mutantes homocigotas (M3). Las semillas M3 se hicieron germinar en papel Whatman empapado con una disolución derivada de Hoagland (KNO₃ 2,5mM; NaH₂PO₄ 0,5 mM; Ca(NO₃)₂ 2,5 mM; MgSO₄ 0,5 mM; FeNaEDTA 0,1 mM; H₃BO₃ 50 μM; MnSO₄ 50 μM; ZnSO₄ 15 μM; MoO₄Na₂ 3 μM; KI 2,5μM; CuSO₄ 50 μM; CoCl₂ 44 μM). Después de 3 semanas, las plantas se transfirieron al medio de disolución derivado de Hoagland en el que su crecimiento se prolongó durante 2 semanas. El medio de disolución se complementó entonces con una concentración final de 10 μM de CdCl₂. Después de una semana de tratamientos, las plantas se cortaron en dos partes: raíces y brotes, y se cosecharon independientemente.

Ensayo en invernadero

25 Las líneas M2 se sembraron en papel Whatman hasta germinación, y 30 plántulas mutantes se transfirieron a bandejas flotantes (20 cm x 30 cm), con cinco plantas de control colocadas aleatoriamente en la bandeja (líneas originales no mutagenizadas). Se extrajo ADN de plantas de 1 mes para el genotipado mediante CE-SSCP, para caracterizar plantas homocigotas, heterocigotas y de tipo natural para la mutación de HMA. Después de mes y medio, el medio de disolución se complementó con una concentración final de 1 μM a 5 μM de CdCl₂. Después de una semana de tratamientos, las raíces se enjuagaron con CaCl₂ (1 mM), y las plantas se cortaron en tres partes: raíces, tallo y brotes. Las muestras se reunieron según su genotipo, con cuatro plantas por genotipo.

Detección de cadmio mediante ICP-MS

35 Las muestras se secaron a 80°C durante 72 horas, y se midió el peso seco. Los contenidos de metales se extrajeron en ácido clorhídrico (1 mM) durante 1 hora a 75°C.

40 Los contenidos de metales en el ácido clorhídrico se dosificó mediante espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) de Agilent (serie 7500cx). Los iones se analizaron sobre la base de sus relaciones de masa a carga (Newman, 1996). Esta técnica ya se ha usado para el análisis de oligoelementos en muchos campos (por ejemplo, Kelly et al., 2002), y permite detectar trazas de cadmio tan bajas como 10 ppt.

45 Para obtener el contenido de cadmio, la concentración de la disolución dosificada se multiplica por el factor de dilución (esto da la cantidad de metal en la muestra) y se divide entre la masa de la muestra. Para obtener la translocación, la cantidad de metal en los brotes se divide entre la cantidad de metal en toda la planta (metal en raíces más metal en brotes).

Análisis estadístico

50 Para cada línea, se calculó el valor de la media y la desviación estándar. Se usó el software estadístico "R" para llevar a cabo una prueba de la "T" de Student para comparar esas medias (<http://www.r-project.org/>).

Ejemplo 5

55 *Retrocruzamientos de mutación en líneas de élite*

Los mutantes que contienen una mutación interesante se retrocruzaron con la planta no mutagenizada original a fin de eliminar mutaciones adicionales presentes en el resto del genoma, no relacionadas con la transferencia de

cadmio. En la figura 7 se muestra un ejemplo de un cruce F1 de un tabaco curado en chimenea industrial y el mutante E1-276-B18. Los mutantes procedentes de la colección y líneas de élite se hicieron crecer en invernadero en lechos flotantes. El ADN de 30 plantas por familia mutante se extrajo y se analizó mediante CE-SSCP. Las plantas heterocigotas se transfirieron en macetas de 5 litros, junto con las líneas de élite. En el momento de la floración, polen de mutante se transfirió a la flor de la línea original (BB16NN, BY02 o V4K1), sin su estambre. Se pueden realizar varios ciclos de retrocruzamientos (BC1, BC2...) antes de fijar la mutación mediante dos ciclos de autopolinización de plantas mutantes retrocruzadas (BCxS1 y BCxS2).

Ejemplo 6

Translocación de metales pesados

Cultivo hidropónico

A. Mutación E200K

Se realizaron experimentos con la mutación E200K, en la región B de la secuencia, en la línea E1-276 de la colección BB16NN. Las líneas mutantes M2 homocigotas se autopolinizaron para obtener semillas mutantes homocigotas (M3). El experimento se realizó en plántulas M3 jóvenes.

Resultados

El contenido de cadmio en la línea mutante M3 E1-276 homocigota está significativamente reducido. La figura 6 describe los resultados obtenidos en términos de acumulación de cadmio en raíces y en brotes. En brotes, el contenido de cadmio está reducido en diferentes grados, y se puede reducir en más de 50% en las líneas de la presente invención en comparación con el tipo natural. Como se puede observar en la figura 6, el contenido de cadmio se reduce en brotes, por ejemplo en más de 60%, y en algunas plantas incluso en más de 70%.

B. Mutación E3-277

Se realizaron experimentos adicionales con respecto a la absorción de Cd y Zn con plantas homocigotas para la mutación E3-277.

Resultados

Los resultados se muestran en la Tabla 3, a continuación, y muestran que el contenido de cadmio en las plantas E3-277 homocigotas está significativamente reducido, mientras que el contenido de Zn está ligeramente reducido en comparación con las plantas de control.

		Órgano	Cd [µg/g d.w.b.]	Zn [µg/g d.w.b.]
E3-277-tipo natural	WT-Planta 1	Hoja	103	78,2
	WT-Planta 1	Raíz	767	318
	WT-Planta 2	Hoja	84,0	138
	WT-Planta 2	Raíz	310	256
	WT-Planta 3	Hoja	60,1	61,1
	WT-Planta 3	Raíz	289	225
	WT-Planta 4	Hoja	122	90,7
	WT-Planta 4	Raíz	338,4	276
E3-277-Mutante	M-Planta 1	Hoja	4,9	76,5
	M-Planta 1	Raíz	33,3	53,7
	M-Planta 2	Hoja	9,5	48,0
	M-Planta 2	Raíz	66,7	625
BB16NN Control	Control-Planta 1	Hoja	172,7	101
	Control-Planta 1	Raíz	526	206
	Control-Planta 2	Hoja	178	116
	Control-Planta 2	Raíz	344	244
	Control-Planta 3	Hoja	151	108
	Control-Planta 3	Raíz	500	254
	Control-Planta 4	Hoja	189	111
	Control-Planta 4	Raíz	639	285

Tabla 3: Contenido de cadmio y de cinc en línea mutante E3-277 homocigota en comparación con la línea de tipo natural E3-277 y la línea de control BB16NN.

Ejemplo 7

En este ejemplo se evaluó la absorción de cadmio de brotes de plantas de *N. tabacum*. Estos brotes proceden de líneas de plantas tratadas con EMS mutadas en el gen HMA 4 derivado de *N. sylvestris* o en el gen HMA 4 derivado de *N. tomentosiformis*.

También se evaluó la absorción de cadmio de brotes de plantas de *N. tabacum* transgénicas. Estas líneas de plantas transgénicas expresan un constructo de iARN diseñado para silenciar uno o ambos de los dos genes HMA 4.

Materiales y métodosLíneas de EMS

Todas las líneas de EMS analizadas en este ejemplo se resumen en la figura 13. Entre las líneas ensayadas, 3 están mutadas en el gen HMA 4 derivado de *N. sylvestris* (identificado como gen alfa en la figura 13), y 2 portadoras de mutaciones en el gen HMA 4 derivado de *N. tomentosiformis* (identificado como gen beta en la figura 13).

Las líneas 90 y 425 se retrocruzaron 2 veces. El retrocruzamiento redujo la cantidad de mutaciones adicionales en un 75%.

La línea 277 se retrocruzó una vez, pero la mutación está en el estado heterocigoto para esta línea. Todas las otras líneas son portadoras de mutaciones homocigotas. Las otras líneas no se retrocruzaron.

Todas las líneas se hicieron crecer en presencia de cadmio usando el protocolo descrito anteriormente, excepto que en este Ejemplo la concentración de cadmio fue 1 μM en lugar de 10 μM . Cada línea se cultivó en un bol que también contiene la planta de tipo natural correspondiente, es decir, una planta portadora del mismo conjunto de mutaciones adicionales en su genoma pero que carece de la mutación en el gen *HMA* correspondiente.

Líneas transgénicas1) Constructos de iARN

Se obtuvieron cinco constructos de miARNa siguiendo el método descrito en Ossowski et al, 2008. Se usó una fuente en línea (<http://www.weigelworld.org/>) para seleccionar las secuencias seleccionadas como diana y diseñar los cebadores correspondientes. El resultado se presenta en la figura 14.

Los miARNa se subclonaron en un vector que contiene el "promotor 70S" (promotor 35S en el que se repiten algunas regiones potenciadoras) y un terminador (rbos). El constructo promotor-miARNa-terminador se insertó en un vector binario (pGreen) que permite la expresión *in planta*.

2) Constructos de horquilla

El constructo de horquilla se diseña para silenciar ambos genes *HMA* 4. Las secuencias seleccionadas como diana así como los cebadores usados para amplificarlas se describen en la figura 15. Las secuencias se clonaron en el vector pHannibal (figura 16). pHannibal contiene los sitios de restricción apropiados para clonar las secuencias seleccionadas como diana en orientación tanto sentido como antisentido.

El constructo de horquilla obtenido se subclonó entonces dos veces y se insertó en el vector pGreen con el mismo promotor y terminador usados para los constructos de miARNa.

3) Transformación de las plantas

Las plantas se transformaron con los cinco constructos de miARNa, el constructo de horquilla y el vector pGreen vacío, como se describe en Horsch et al, 1984.

4) Condiciones de crecimiento

Las líneas de iARN transgénicas ensayadas son la descendencia de las plantas regeneradas tras la transformación de las plantas.

Las líneas de iARN se cultivaron en el mismo medio derivado de Hoagland usado para el cultivo hidropónico pero suplementado con 1% de agar. Las plantas que perdieron su constructo a través de la segregación se eliminaron mediante adición de 200 mg de higromicina por litro de medio. Después de dos semanas de crecimiento en medio de selección, las plantas se transfirieron a un medio que contiene cadmio a una concentración de 1 μM .

Después de dos semanas de cultivo en el medio que contiene cadmio, se recogió el material vegetal.

Aproximadamente 1 g de raíz se congeló en nitrógeno líquido para analizar la acumulación de transcrito mediante qPCR. Los brotes se apartaron para analizarlos para determinar el contenido metálico mediante ICP-MS.

5) Extracción de ARN y síntesis de ADNc

Las raíces se molieron usando un mortero y una mano de mortero. El ARN se obtuvo usando el kit RNeasy (Qiagen) acoplado con una etapa opcional de ADNasa. La síntesis de ADNc se llevó a cabo con transcriptasa inversa M-MLV (Promega), como se describe por el fabricante.

6) Análisis mediante Q-PCR

Los análisis se llevaron a cabo usando un Roche 480 Lightcycler (Roche). Los pares de cebadores usados para amplificar el gen alfa (Fw - ACAAAGTGCTCGGACACCAA; Rev - CTTCTCGGTTGCAGAGTCCT) o el gen beta (Fw - ACAAAGTGCTCGGACACCAA; Rev - CTTCTCGGTTGCAGAGTCTA) se diseñaron para amplificar específicamente el gen seleccionado como diana y no su homólogo. Esta especificidad y la eficiencia de los cebadores se ensayó usando un vector en el que se clonó la región seleccionada como diana por los cebadores.

Los resultados se normalizaron usando el gen de ciclofilina (Fw - CTCTATGCCGACACCGTTCC; Rev - TCACACGGTGGAAGGTTGAG) y el gen L2 (Fw - GGCGAAATGGGTTCGTTTGATC; Rev - CGTTCCGTTCCGCGAAGTGC). Estos dos genes de referencia se seleccionaron de los genes descritos en Nicot et al, 2005.

Resultados

Líneas de EMS

En 3 de las 5 líneas ensayadas, la acumulación de cadmio en los brotes está reducida muy significativamente, a saber, en más de 50% (la figura 8 muestra ejemplos seleccionados). Estos resultados se validaron estadísticamente para las líneas 277 y 425 usando la prueba de la t de Student (figura 9).

Líneas de iARN

1. Acumulación de transcritos en raíces

En la figura 10 se presenta la acumulación de transcritos medida mediante qPCR. No se observó disminución en el nivel de transcritos para la línea de horquilla, en comparación con la línea que expresa el vector vacío.

Sin embargo, se observa una disminución de acumulación de transcritos de HMA 4 para ambos genes en la línea 6a y para el gen HMA 4 derivado de *N. tomentosiformis* en la línea 11b. Los niveles de expresión están en un grupo estático diferente del nivel de expresión de las plantas de tipo natural.

2. Acumulación de metal en brotes

La acumulación de cadmio se reduce en todas las líneas transgénicas analizadas (figura 11). Se reduce en más de 40% en las líneas 6b y horquilla. Se reduce en más de 60% en las líneas 6a y 11b. Una prueba de la t de Student llevada a cabo en esas muestras mostró que la diferencia observada en las líneas 6a y 11b en comparación con las plantas de tipo natural es significativa. No se determinaron diferentes estadísticas entre las diferentes líneas en términos de acumulación de cadmio y acumulación de cinc.

Conclusión

Este Ejemplo demuestra que ambos genes *HMA* desempeñan un papel en la acumulación de cadmio en brotes. Ya se puede lograr una reducción significativa de la reducción de cadmio silenciando uno de los genes *HMA 4*. Se puede obtener una reducción adicional de la acumulación de cadmio silenciando ambos genes.

Ejemplo 8

En este Ejemplo, se analizó y se comparó la acumulación de cadmio en brotes de varias plantas. Para este fin, las líneas 90, 416, 276 y 425 se retrocruzaron 2 veces y se fijaron mediante dos autopolinizaciones para obtener plantas BC2S2, seleccionadas para la mutación (M) o no (W). Las plantas identificadas en este Ejemplo como plantas de tipo natural (o W) son así plantas que también han sido sometidas a tratamiento con EMS y portadoras del mismo conjunto de mutaciones adicionales en su genoma pero carecen de la mutación en el gen HMA correspondiente.

En primer lugar se esterilizaron semillas y se sembraron directamente en medio sólido *in vitro*. Las líneas se hicieron crecer en medio derivado de Hoagland con agar, que contiene 1 μ M de cadmio. El medio derivado de Hoagland contiene 0,1 mM de Fe y 15 μ M de Zn.

Se analizaron las líneas mutantes (M), una línea mutante heterocigota (Htz), y las líneas de tipo natural (S) correspondientes. Los experimentos también incluyeron plantas de control BB16NN o BY02 (C) (semillas industriales, tipo natural) y una línea de tabaco de iARN (obtenida como se describe en el Ejemplo 7).

Las hojas se recogieron después de un mes, y se extrajeron los metales como se describió anteriormente. Los análisis se llevaron a cabo en 4 a 12 plantas por genotipo para Cd, Zn, Fe.

Resultados

Los resultados se muestran en las figuras 17 y 18 y confirman que estas plantas tienen una cantidad significativamente reducida de cadmio en los brotes (figura 17B). Al mismo tiempo, se pudo mostrar que las plantas todavía son capaces de absorber metales tales como Fe y Zn que son necesarios para el crecimiento de la planta (figura 18).

Conclusión

Este Ejemplo demuestra que el silenciamiento de genes *HMA* según la presente invención no tiene necesariamente un efecto negativo sobre la absorción de metales que son necesarios para el crecimiento y desarrollo de las plantas.

Ejemplo 9

Para desarrollar variedades comerciales de tabaco con contenido reducido de cadmio en la hoja, se llevaron a cabo cruzamientos entre diferentes mutantes de tabaco. En particular, plantas con una mutación en el gen *HMA 4* de *N. sylvestris* se cruzaron con plantas con una mutación en el gen *HMA 4* de *N. tomentosiformis*.

Para este fin, ambos mutantes se retrocruzaron con las líneas de élite para eliminar la carga de mutación en el resto del genoma, que puede provocar problemas con la fertilidad en la progenie. Las plantas BC1 resultantes se cruzaron entonces para obtener la familia F1, que posee dos copias mutadas en estado heterocigoto. Todos los cruces F1 se describen en la figura 12.

Las plantas F1 que resultan del cruce entre mutantes se autopolinizarán para obtener una generación F2, en la que estarán presentes plantas homocigotas para copias tanto mutadas y/o de tipo natural, incluyendo plantas mutantes dobles homocigotas. Estas plantas se pueden retrocruzar en las líneas de élite para obtener líneas de plantas comerciales mutantes dobles homocigotas.

Referencias

Lugon-Moulin N, Martin F, Marc R, Krauss, Ramey PB, Rossi L (2006) Cadmium concentration in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) from different countries and its relationship with other elements. *Chemosphere* Vol 63 1074-1086.

Karaivazoglou NA, Tsotsolis NC y Tsadilas CD (2007) Influence of liming and form of nitrogen fertilizer on nutrient uptake, growth, yield, and quality of Virginia (flue-cured) tobacco. *Field Crops Research* Vol 100, Issue 1:52-60.

Verbruggen N, Hermans C, y Schat H (2009) Mechanisms to cope with arsenic or cadmium excess in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 12:364-372.

Yeagan R, Maiti IB, Nielsen MT, Hunt AG, Wagner GJ (1992) Tissue partitioning of cadmium in transgenic tobacco seedlings and field grown plants expressing the mouse metallothionein I gene. *Transgenic Res.* 1 de noviembre (6):261-7.

Dorlhac De Borne F, Elmayer T, De Roton C, De Hys L, Tepfer M (1998) Cadmium partitioning in transgenic tobacco plants expressing a mammalian metallothionein gene. *Molecular Breeding* 4:83-90.

Korenkov V, King B, Hirschi K, Wagner GJ (2009) Root-selective expression of *AtCAX4* and *AtCAX2* results in reduced lamina cadmium in field-grown *Nicotiana tabacum* L. *Plant Biotechnol J.* 7 (3):219-26.

Cobbett CS, Hussain D, Haydon MJ (2003) Structural and functional relationships between type 1B heavy metal-transporting P-type ATPases in Arabidopsis. *New Phytologist* 159:315-321.

Seigneurin-Berny D, Gravot A, Auroy P, Mazard C, Kraut A, Finazzi G, Grunwald D, Rappaport F, Vavasseur A, Joyard J, Richaud P, Rolland N (2006) *HMA1*, a new Cu-ATPase of the chloroplast envelope, is essential for growth under adverse light conditions. *The journal of biological chemistry* 281:2882-2892.

Hussain D, Haydon M, Wang Y, Wong E, Sherson S, Young J, Camakaris J, Harper J, Cobbett C (2004) P-Type ATPase heavy metal transporters with roles in essential zinc homeostasis in Arabidopsis. *The Plant Cell* 16:1327-

1339.

Morel M, Crouzet J, Gravot A, Auroy P, Leonhardt N, Vavasseur A, Richaud P (2009) AtHMA3, a P1B-ATPase Allowing Cd/Zn/Co/Pb Vacuolar Storage in Arabidopsis. *Plant physiology* 149:894-904.

HAYES, Alec *et al.*, TRANSGENIC PLANTS MODIFIED FOR REDUCED CADMIUM TRANSPORT, DERIVATIVE PRODUCTS, AND RELATED METHODS, WO2009/074325.

Julio E, Laporte F, Reis S, Rothan C y Dorlhac de Borne F (2008) Reducing the content of nornicotine in tobacco via targeted mutation breeding. *Molecular Breeding*, 21:1380-3743.

Yukawa M, Tsudzuki T, Sugiura M (2006) The chloroplast genome of *Nicotiana sylvestris* and *Nicotiana tomentosiformis*: complete sequencing confirms that the *Nicotiana sylvestris* progenitor is the maternal genome donor of *Nicotiana tabacum*. *Molecular genetics and genomics* 275:367-373.

Delon R, Poisson C, Bardon JC, Taillurat P (1999) Les nicotianées en collection à l'Institut du Tabac. SEITA, 86p.

Till BJ, Reynolds SH, Greene EA *et al.* (2003) Large-scale discovery of induced point mutations with high-throughput TILLING. *Genome Res.* 13:524-530.

Ng PC y Henikoff S (2003) SIFT: predicting amino-acid changes that affect protein function. *Nucleic Acid Res.* 31:3812-3814.

Newman, Alan. 1996. "Elements of ICPMS." *Analytical Chemistry*. 68(1 de enero):46A-51A.

Kelly S, Baxter M, Chapman S, Rhodes C, Dennis J, y Brereton P (2002) The application of isotopic and elemental analysis to determine the geographical origin of premium long grain rice. *European food research & technology*, 214:72-82.

Ossowski *et al.*, 2008, "Gene silencing in plants using artificial microRNAs and other small RNAs" *The Plant Journal*, Febrero de 2008, vol. 53(4): 674-690.

Horsch *et al.*, 1984, "Inheritance of functional foreign genes in plants" *Science* 3 de febrero de 1984; 223(4635):496-8.

Nicot *et al.*, "Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress", *J Exp Bot.* Noviembre de 2005; 56(421):2907-14.

Listado de secuencias

<110> Societé Nationale d'Exploitation Industrielle des Tabacs et Aullumettes
- S.E.I.T.A.

<120> Tabaco con contenido reducido de cadmio

<130> P82537

<160> 59

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 3032

<212> ADN

<213> *Nicotiana sylvestris*

<400> 1

cataagccta tgcttatctt ttcttacttt ttagcaatgc taaatattag gtcctaacta 60
 caaactttgt agcacactga actttgtaac ataactccgt gtcctttatct tctcactgat 120
 attgtatatg gataaagcat tctgataaat gaaaaccttt atggttatgt aggctaccgc 180
 tgctatgtca tcaactggtca atatagtccc tccaacagca gtttttagctg aaagcggaga 240
 agtcgtaaat gttgatgaag tcaaggtgaa tagcattcct gctgtgaaag ctggtgaaac 300
 tatacctatt gatggagttag tagtggaagg ggaatgtgac gtggacgaga aaacactgac 360
 aggcgagtcg tttccagttt ctaagcaaag agattcaacg gtcctgggctg gcactacaaa 420

ES 2 574 311 T3

	tctaaatggt	agtatagtat	ttcttcatgc	ttcatttatt	tagtgctgaa	acttcaagta	480
	ttgtttggtta	atgttatttg	ctcaattctt	caggctatat	cagtgttaag	actacggctt	540
	tggtggaaga	ttgtgcggtg	gctaggatgg	cacagcttgt	cgaagatgct	cagaacaaga	600
	aatcaaaaac	ccaaagatac	atcgacaagt	gtgctaaata	ttatacacca	ggttagtgaa	660
5	tcttatgttg	tgccacatca	agtcaaaaaa	tgcacgtacc	gtgtgaactt	gttctttgtc	720
	ttatgaatca	cgctcactatc	ctctcccttt	tcgatatgag	atctccctaa	ggtgtcatat	780
	gaatcccttc	ttcgggaagct	tgccagcata	gaagtctatc	agtcctttca	cttgacccgc	840
	cctctcagcc	tgccctgcagt	catgggcgctc	gcactactat	attgctcttt	cgtttaaaac	900
	tttttatttc	taatactttc	ctgctctttg	tgtatgtctg	atctcgactg	gtgatgtttt	960
10	gcagcaattg	tggtctatatac	agcttctttg	gcaattgttc	ctactgcatt	aagagttcac	1020
	aatcgaaatg	aatgggtatcg	cttggctttg	gtcacattgg	tgagtgcattg	tccgtgtgca	1080
	cttgttctat	ctacaccagt	tgccatgtgt	tgcgcacttt	caaaagcagc	aacgtccggt	1140
	cttctgttta	aaggagcaga	gtaccttgag	actctagcta	aaatcaaaat	catggctttt	1200
	gacaaaacag	ggactataac	taaaggagaa	tttatgggtga	ccgagttcaa	gtctctgatt	1260
15	gatgggttta	gtctcaatac	actgctttac	tggtaaaggt	taccactcat	acatattctt	1320
	ttatgttgcc	aaagagaatt	caaaatctta	actgattatc	tttcacggca	cattgatagt	1380
	gatataacat	gattgattta	tatcatatat	tcataaaaga	tgaaataggg	agtgccacat	1440
	tcacattctc	atattgaagt	ttctgaaatg	gctctaattgg	ttcaccatag	agccaaaata	1500
	acatatagac	acaacgtcag	ccgtctgata	ttcagaactt	agatggaata	gttggatctt	1560
20	atacattgag	gacacataaa	agtacttggg	catataaatt	ttagaaacat	aatcaatgta	1620
	ttataatcta	aaattcttca	aatattcttg	atactgcaat	aacaaaagca	catgcacact	1680
	gaatagaagc	cttgttcgtg	tctaaaacat	cgttgtgggc	taaaacattc	gtttagagta	1740
	aatactgaat	tgtctagtga	atattttcag	ggtttcaagc	attgagagca	agtcagggtca	1800
	tccgatggca	gccgctctgg	tggactatgc	acaatcaaat	tccgttgagc	caaagcctga	1860
25	tagagttgag	cagtttcaaa	atcttctctg	tgaagggata	tttggaaaga	ttgatggaat	1920
	ggaaatctat	gtcgggaata	ggaaaatttc	ttcaagagct	ggatgtacca	caggtaaagt	1980
	gttgaatcat	ttcttatgct	catagtagag	ataaaacatc	agagttataa	ttataagtat	2040
	atgatttctc	cagttaattt	tgctgttaga	ttttctttga	cctgttttagc	actaatgcgg	2100
	tggatgtttg	aatttcagta	ccagaaatag	aggggtgatag	tttcaaagga	aagtctgttg	2160
30	gatacatatt	tttgggatca	tctccagctg	gaattttcag	tctttccgat	gtttgtcgaa	2220
	ttgggtgtaaa	agaagcaatg	agagaactga	agcagatggg	tatcaaaacc	gcgatgctta	2280
	ctgggtgattg	ttatgcagct	gccaaccatg	tgcaggatca	ggtatattaa	taattctgca	2340
	ttacgctgaa	atgattataa	aaccctttg	attattggtt	agtcttaaga	atcttctactg	2400
	aactcttatt	gtttccttct	tctatcatca	acattgggta	aacatttcat	ctaaatttag	2460
35	agaacgtatt	accaagtaag	tgctttatct	ttacaggggc	atataaaata	cttaagacag	2520
	tgtgatgtga	agatgaaggt	taaatggtga	tctggataaa	ccaagttatt	atcacaacta	2580
	atataagata	tgctattggt	ctccaataat	tggacgattt	tccggacgtac	gacgtacaat	2640
	tcttcacata	tgaaacctac	atcagaagta	catgacacgc	tatgttttagc	ataaagagtc	2700
	aagattagca	tgatgattta	agctgaatct	gaatttcaag	tatctattct	tgtattgtac	2760
40	ccaggggctg	aactagtgtt	gtgcttagag	gtctcaaaca	ttgtatttgt	gttaaaaaat	2820
	tcacttcata	tgtattttaa	taatttatcc	agagcagtga	gccatatttt	ttagaatcca	2880
	gaaccataa	actcaaaatc	atagatccac	ctctgattgt	aagtcgaaac	aattatgcag	2940
	ttaggtggag	ctttggatga	atctcaagca	gaactcctac	cagaggacaa	ggcaacaatc	3000
	atcaagggtt	ttcagaagga	agctccaaca	gc			3032
45		<210> 2					
		<211> 21					
		<212> ADN					
		<213> Nicotiana sp.					
50		<400> 2					
		ctaccgctgc	tatgtcatca	c			21
55		<210> 3					
		<211> 21					
		<212> ADN					
		<213> Nicotiana sp.					
60		<400> 3					

ES 2 574 311 T3

	tagcacactt gtcgatgtat c	21
5	<210> 4 <211> 21 <212> ADN <213> Nicotiana sp. <400> 4	
10	gatacatcga caagtgtgct a	21
15	<210> 5 <211> 21 <212> ADN <213> Nicotiana sp. <400> 5	
20	ctcctttagt tatagtcct g	21
25	<210> 6 <211> 23 <212> ADN <213> Nicotiana sp. <400> 6	
30	agtaaatact gaattgtcta gtg	23
35	<210> 7 <211> 23 <212> ADN <213> Nicotiana sp. <400> 7	
40	gatgttttat ctctactatg agc	23
45	<210> 8 <211> 21 <212> ADN <213> Nicotiana sp. <400> 8	
50	gacctgttta gcactaatgc g	21
55	<210> 9 <211> 25 <212> ADN <213> Nicotiana sp. <400> 9	
60	ttataatcat ttcagcgtaa tgcag	25
60	<210> 10 <211> 22 <212> ADN	

ES 2 574 311 T3

	<213> Nicotiana sp.	
	<400> 10	
5	ggtgaatagc attcttgctg tg	22
	<210> 11	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Nicotiana sp.	
10	<400> 11	
	gcacaacata agattcacta ac	22
15	<210> 12	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Nicotiana sp.	
20	<400> 12	
	ggtgaatagc attcttgctg tt	22
	<210> 13	
25	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Nicotiana sp.	
	<400> 13	
30	gtctgatttc gactggtgat g	21
	<210> 14	
	<211> 23	
35	<212> ADN	
	<213> Nicotiana sp.	
	<400> 14	
40	aagaatatgt atgagtggta acc	23
	<210> 15	
	<211> 22	
	<212> ADN	
45	<213> Nicotiana sp.	
	<400> 15	
	gaaatagagg gtgatagttt cc	22
50	<210> 16	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Nicotiana sp.	
55	<400> 16	
	catttcagcg taatgcagaa ttt	23
60	<210> 17	

ES 2 574 311 T3

	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Nicotiana sp.	
5	<400> 17	
	gaaatagagg gtgatagttt ca	22
	<210> 18	
10	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Nicotiana sp.	
	<400> 18	
15	catttcagcg taatgcagaa tta	23
	<210> 19	
	<211> 22	
20	<212> ADN	
	<213> Nicotiana sp.	
	<400> 19	
25	ggtgaatagc attcttgctg tg	22
	<210> 20	
	<211> 21	
	<212> ADN	
30	<213> Nicotiana sp.	
	<400> 20	
	cttgttctga gcatcttcga c	21
35	<210> 21	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Nicotiana sp.	
40	<400> 21	
	gttgaatagc attcttgctg tt	22
45	<210> 22	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Nicotiana tabacum	
50	<400> 22	
	acaaagtgct cggacaccaa	20
	<210> 23	
55	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Nicotiana tabacum	
	<400> 23	
60		

ES 2 574 311 T3

	cttctcggtt gcagagtcct	20
	<210> 24	
	<211> 20	
5	<212> ADN	
	<213> Nicotiana tabacum	
	<400> 24	
10	acaaagtgct cggacaccaa	20
	<210> 25	
	<211> 20	
	<212> ADN	
15	<213> Nicotiana tabacum	
	<400> 25	
20	cttctcggtt gcagagtcta	20
	<210> 26	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Nicotiana tabacum	
25	<400> 26	
30	ctctatgccg acaccgttcc	20
	<210> 27	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Nicotiana tabacum	
35	<400> 27	
40	tcacacggtg gaaggttgag	20
	<210> 28	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Nicotiana tabacum	
45	<400> 28	
50	ggcgaaatgg gtcgtttgat c	21
	<210> 29	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Nicotiana tabacum	
	<400> 29	
55	cgttccgttc gccgaagtcg	20
	<210> 30	
	<211> 21	
	<212> ADN	
60	<213> Nicotiana tabacum	

ES 2 574 311 T3

	<400> 30	
5	tgactcttat tatttccgca t	21
	<210> 31	
	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Nicotiana tabacum	
10	<400> 31	
	gatgactctt attatttccg cattctctct tttgtattcc	40
15	<210> 32	
	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Nicotiana tabacum	
20	<400> 32	
	gaatgcggaataaataagag tcatcaaaga gaatcaatga	40
	<210> 33	
25	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Nicotiana tabacum	
30	<400> 33	
	gaatacggaa ataattagag tcttcacagg tctgtgatatg	40
	<210> 34	
35	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Nicotiana tabacum	
	<400> 34	
40	gaagactcta attatttccg tattctacat atatattcct	40
	<210> 35	
	<211> 21	
	<212> ADN	
45	<213> Nicotiana tabacum	
	<400> 35	
50	tggatcttat catttccgca t	21
	<210> 36	
	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Nicotiana tabacum	
55	<400> 36	
	gatggatctt atcatttccg cattctctct tttgtattcc	40
60	<210> 37	

ES 2 574 311 T3

	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Nicotiana tabacum	
5	<400> 37	
	gaatgCGGaa atgataagat ccatcaaaga gaatcaatga	40
	<210> 38	
10	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Nicotiana tabacum	
	<400> 38	
15	gaatacggaa atgattagat ccttcacagg tcgtgatatg	40
	<210> 39	
	<211> 40	
20	<212> ADN	
	<213> Nicotiana tabacum	
	<400> 39	
25	gaaggatcta atcatttccg tattctacat atatattcct	40
	<210> 40	
	<211> 21	
	<212> ADN	
30	<213> Nicotiana tabacum	
	<400> 40	
35	ttcattagta taacatggcc t	21
	<210> 41	
	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Nicotiana tabacum	
40	<400> 41	
	gattcattag tataacatgg ccttctctct tttgtattcc	40
45	<210> 42	
	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Nicotiana tabacum	
50	<400> 42	
	gaaggccatg ttataactaat gaatcaaaga gaatcaatga	40
	<210> 43	
55	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Nicotiana tabacum	
	<400> 43	
60		

ES 2 574 311 T3

	gaagaccatg ttatagtaat gattcacagg tcgtgatatg	40
	<210> 44	
	<211> 40	
5	<212> ADN	
	<213> Nicotiana tabacum	
	<400> 44	
10	gaatcattac tataacatgg tcttctacat atatattcct	40
	<210> 45	
	<211> 21	
	<212> ADN	
15	<213> Nicotiana tabacum	
	<400> 45	
20	tgatTTTTagc tagagtctca a	21
	<210> 46	
	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Nicotiana tabacum	
25	<400> 46	
30	gatgatttta gctagagtct caatctctct tttgtattcc	40
	<210> 47	
	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Nicotiana tabacum	
35	<400> 47	
40	gattgagact ctagctaaaa tcatcaaaga gaatcaatga	40
	<210> 48	
	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Nicotiana tabacum	
45	<400> 48	
50	gaagattttt gctagagtct taatctacat atatattcct	40
	<210> 49	
	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Nicotiana tabacum	
	<400> 49	
55	gattaagact ctagcaaaaa tottcacagg tcgtgatatg	40
	<210> 50	
	<211> 21	
	<212> ADN	
60	<213> Nicotiana tabacum	

ES 2 574 311 T3

	<400> 50	
5	tgatttttagc aagagtctca a	21
	<210> 51	
	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Nicotiana tabacum	
10	<400> 51	
	gatgatttta gcaagagtct caatctctct tttgtattcc	40
15	<210> 52	
	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Nicotiana tabacum	
20	<400> 52	
	gattgagact cttgctaaaa tcatcaaaga gaatcaatga	40
25	<210> 53	
	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Nicotiana tabacum	
30	<400> 53	
	gattaagact cttgcaaaaa tcttcacagg tctgtgatatg	40
35	<210> 54	
	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Nicotiana tabacum	
40	<400> 54	
	gaagattttt gcaagagtct taatctacat atatattcct	40
45	<210> 55	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Nicotiana tabacum	
50	<400> 55	
	cccgctcgag tgagagcaag tcaggtcac cga	33
55	<210> 56	
	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> Nicotiana tabacum	
60	<400> 56	
	cggggtaccc tgtggtacat ccagctcttg a	31
60	<210> 57	

ES 2 574 311 T3

<211> 32
<212> ADN
<213> Nicotiana tabacum

5 <400> 57
tgctctagat gagagcaagt caggatcatcc ga 32

<210> 58
10 <211> 31
<212> ADN
<213> Nicotiana tabacum

<400> 58
15 cccatcgatc tgtggtacat ccagctcttg a 31

<210> 59
<211> 192
20 <212> ADN
<213> Nicotiana tabacum

<400> 59

25 tgagagcaag tcaggatcatc cgatggcagc cgctctgggtg gactatgcac aatcaaattc 60
cgttgagcca aagcctgata gagttgagca gtttcaaat tttcctgggtg aagggatatt 120
tggaagaatt gatggaatgg aaatctatgt cgggaatagg aaaatttctt caagagctgg 180
atgtaccaca gg 192

REIVINDICACIONES

1. Planta de tabaco que comprende por lo menos una mutación en un gen HMA, en la que el gen HMA no mutado comprende la secuencia nucleotídica de SEC ID nº:1 o una secuencia homóloga con una identidad de por lo menos 90% respecto a la secuencia de SEC ID nº:1, en la que la mutación provoca una sustitución o una supresión o una inserción de por lo menos un aminoácido en el polipéptido codificado por la secuencia nucleotídica y en la que la mutación reduce la absorción de metal pesado por las hojas de la planta en por lo menos 30% en relación con la absorción de metal pesado de plantas que comprenden SEC ID nº:1 o la homóloga.
2. Planta de tabaco según la reivindicación 1, en la que la planta de tabaco es una planta de *Nicotiana tabacum*.
3. Planta de tabaco según la reivindicación 1 o 2, en la que la reducción de la absorción de metal pesado se determina haciendo crecer plantas de tabaco con y sin la mutación en condiciones idénticas sobre un medio líquido que contiene el metal pesado y comparando la concentración del metal pesado en la hoja, tallo o brote de la planta de tabaco con la mutación con la concentración del metal pesado en la hoja, tallo o brote de la planta de tabaco que no presenta la mutación.
4. Planta de tabaco según una de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la mutación reduce la absorción del metal pesado en por lo menos 40%, por lo menos 50%, por lo menos 75% o por lo menos 95%.
5. Planta de tabaco según una de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la mutación reduce la absorción de cadmio, plomo o arsénico.
6. Planta de tabaco según una de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la mutación es una mutación de sentido erróneo, una mutación sin sentido o una mutación de corte y empalme.
7. Planta de tabaco según la reivindicación 6, en la que la mutación se selecciona de entre el grupo que comprende las mutaciones: G294A, C576T, G406A, G347A, G363A, G553A, G290A, C374T, G964A, G1168A, G1211A, G1126A, C980T, G1195T, G1156A, G1070A, C2302T, G2208A, C2217T, G2190A, C2206T o C2277T en SEC ID nº:1 o la homóloga.
8. Planta de tabaco según una de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la planta comprende una mutación en más de un gen HMA 4.
9. Planta de tabaco según una de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la planta es homocigótica para la mutación en el gen HMA 4.
10. Planta de tabaco según una de las reivindicaciones 1 a 9, en la que la planta es homocigótica para mutaciones en ambos genes HMA 4.
11. Parte de una planta de tabaco según una de las reivindicaciones 1 a 10, en la que la parte es una hoja, una lámina, una hoja, raíz, brote, tallo, flor o semilla cortados y/o curados, y en la que la parte comprende por lo menos una mutación en un gen HMA, en la que el gen HMA no mutado comprende la secuencia nucleotídica de SEC ID nº:1 o una secuencia homóloga con una identidad de por lo menos 90% respecto a la secuencia de SEC ID nº:1, en la que la mutación provoca una sustitución o una supresión o una inserción de por lo menos un aminoácido en el polipéptido codificado por la secuencia nucleotídica, y en la que la mutación reduce la absorción de metal pesado por las hojas de la planta en por lo menos 30% en relación con la absorción de metal pesado de las plantas que comprenden SEC ID nº:1 o la homóloga.
12. Parte de una planta de tabaco según la reivindicación 11, en la que la planta de tabaco es una planta de *Nicotiana tabacum*.
13. Producto de tabaco que comprende una planta de tabaco según una de las reivindicaciones 1 a 10 o una parte de una planta de tabaco según la reivindicación 11 o 12.
14. Producto de tabaco según la reivindicación 13, en el que el producto de tabaco es un tabaco cortado, extracto de tabaco o tabaco reconstituido, o un producto de tabaco sin humo, como tabaco de mascar de tipo snus o rapé.
15. Artículo para fumar que comprende plantas de tabaco según una de las reivindicaciones 1 a 10 o partes de una planta de tabaco según las reivindicaciones 11 a 12.
16. Artículo para fumar según la reivindicación 15, que es un cigarrillo, un purito, cigarrito, un puro o un artículo para fumar simulado que contiene tabaco.

	250	260	270	280	290	300
Cóntigo						
N. sylvestris_seq1	ACTACAAAATCTAAAATGGTAGTATAGTATTTCTTTCATGCTTCATTATTTAGTGGCTGAAAC					
N. sylvestris_seq2	ACTACAAAATCTAAAATGGTAGTATAGTATTTCTTTCATGCTTCATTATTTAGTGGCTGAAAC					
N. sylvestris_seq3	ACTACAAAATCTAAAATGGTAGTATAGTATTTCTTTCATGCTTCATTATTTAGTGGCTGAAAC					
N. sylvestris_seq4	ACTACAAAATCTAAAATGGTAGTATAGTATTTCTTTCATGCTTCATTATTTAGTGGCTGAAAC					
N. sylvestris_seq5	ACTACAAAATCTAAAATGGTAGTATAGTATTTCTTTCATGCTTCATTATTTAGTGGCTGAAAC					
N. tabacum_seq6	ACTACAAAATCTAAAATGGTAGTATAGTATTTCTTTCATGCTTCATTATTTAGTGGCTGAAAC					
N. tabacum_seq7	ACTACAAAATCTAAAATGGTAGTATAGTATTTCTTTCATGCTTCATTATTTAGTGGCTGAAAC					
N. tabacum_seq8	ACTACAAAATCTAAAATGGTAGTATAGTATTTCTTTCATGCTTCATTATTTAGTGGCTGAAAC					
N. tabacum_seq9	ACTACAAAATCTAAAATGGTAGTATAGTATTTCTTTCATGCTTCATTATTTAGTGGCTGAAAC					
N. tabacum_seq10	ACTACAAAATCTAAAATGGTAGTATAGTATTTCTTTCATGCTTCATTATTTAGTGGCTGAAAC					
N. tabacum_seq11	ACTACAAAATCTAAAATGGTAGTATAGTATTTCTTTCATGCTTCATTATTTAGTGGCTGAAAC					
N. tabacum_seq12	ACTACAAAATCTAAAATGGTAGTATAGTATTTCTTTCATGCTTCATTATTTAGTGGCTGAAAC					
N. tabacum_seq13	ACTACAAAATCTAAAATGGTAGTATAGTATTTCTTTCATGCTTCATTATTTAGTGGCTGAAAC					
N. tomentosiformis_seq14	ACTACAAAATCTAAAATGGTAGTATAGTATTTCTTTCATGCTTCATTATTTAGTGGCTGAAAC					
N. tomentosiformis_seq15	ACTACAAAATCTAAAATGGTAGTATAGTATTTCTTTCATGCTTCATTATTTAGTGGCTGAAAC					
N. tomentosiformis_seq16	ACTACAAAATCTAAAATGGTAGTATAGTATTTCTTTCATGCTTCATTATTTAGTGGCTGAAAC					

Figura 1

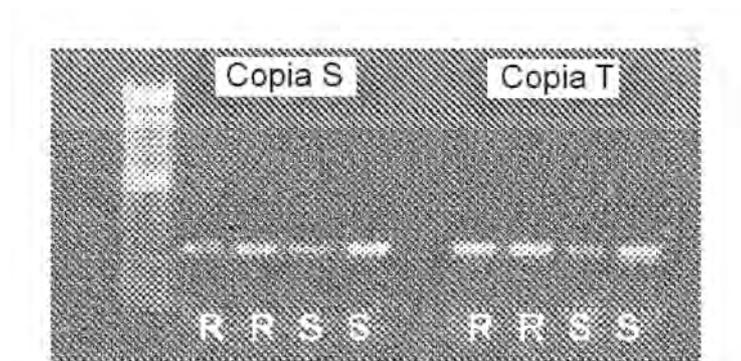


Figura 2

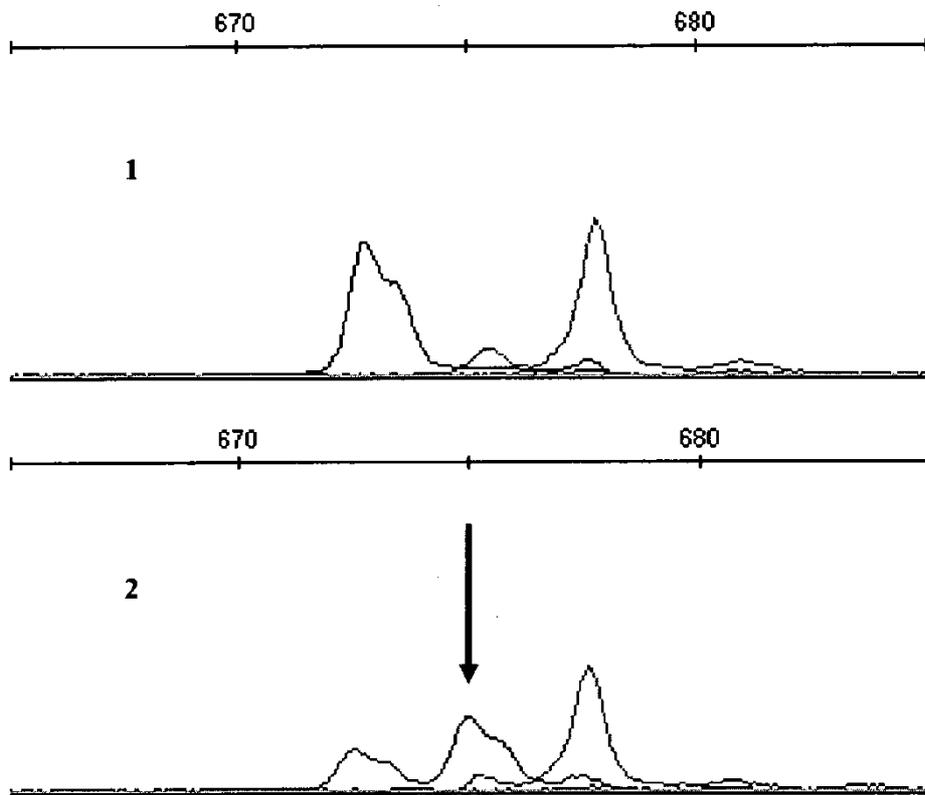


Figura 4

Figura 5/1

Diana	Colección	Identificación ^a	Cambio de nucleótido ^b	Cambio de aminoácido ^b	Puntuación de SIFT ^c
Hma-AS	BB16NN	E1-11C	C515T	G86=	1
Hma-AS	BB16NN	E1-397	G294A	G41D	0
Hma-AS	BB16NN	E2-90	C576T	L107F	0
Hma-AS	BB16NN	E2-1	C620T	Y121=	1
Hma-AS	BB16NN	E2-425	G406A	W78*	0
Hma-AS	BB16NN	E2-229	G290A	A40T	0,02
Hma-AS	BB16NN	E3-32	G579A	V108I	0,01
Hma-AS	BB16NN	E3-1071	C356T	L62=	1
Hma-AS	BB16NN	E3-176	G401A	V77I	0,01
Hma-AS	BB16NN	E3-217	C515T	G86=	1
Hma-AS	BB16NN	E3-271	G347A	E59K	0
Hma-AS	BB16NN	E3-422	G530A	K91=	1
Hma-AS	BB16NN	E3-309	G363A	G64D	0
Hma-AS	BB16NN	E3-372	G616A	R120K	0,09
Hma-AS	BB16NN	E3-1144	G579A	V108I	0,01
Hma-AS	BY02	450	G553A	C99Y	0
Hma-AS	BY02	695	G523A	S89N	0,03
Hma-AS	BY02	793	G582A	E109K	0,02
Hma-AS	BY02	802	C364T	G64=	1
Hma-AT	BB16NN	E1-9	G434A	intrón	-
Hma-AT	BB16NN	E1-314	C556T	A100V	0,3
Hma-AT	BB16NN	E2-357	G290A	A40T	0
Hma-AT	BB16NN	E2-454	G570A	A105T	0,04
Hma-AT	BB16NN	E2-24	G370A	S66=	1
Hma-AT	BB16NN	E2-453	G542A	L95=	1
Hma-AT	BB16NN	E3-1211	G370A	S66=	1
Hma-AT	BB16NN	E3-1315	G555A	A100T	0,4
Hma-AT	BB16NN	E3-888	G537A	A94T	0,02
Hma-AT	BB16NN	E3-1038	C346T	D58=	1
Hma-AT	BY02	390	C374T	P68S	0
Hma-AT	BY02	493	C508T	intrón	-
Hma-AT	BY02	769	G290A	A40T	0
Hma-AT	BY02	874	C571T	A105V	0,62
Hma-AT	BY02	1336	C576T	L107F	0
Hma-AT	V4K1	273	G367A	E65=	1
Hma-AT	V4K1	751	G555A	A100T	0,4
Hma-AT	V4K1	303	G546A	E97K	0,23
Hma-B	BB16NN	E1-84	C1001A*	P144H	0,06
Hma-B	BB16NN	E1-276	G1168A	E200K	0
Hma-B	BB16NN	E1-508	G1211A	G214E	0

Diana	Colección	Identificación ^a	Cambio de nucleótido ^b	Cambio de aminoácido ^b	Puntuación de SIFT ^c
Hma-B	BB16NN	E1-521	G1168A	E200K	0
Hma-B	BB16NN	E2-204	C983T	A138V	0,01
Hma-B	BB16NN	E2-341	G1126A	A186T	0
Hma-B	BB16NN	E2-289	G1078A	A170T	0,03
Hma-B	BB16NN	E3-163	C980T	S137L	0
Hma-B	BY02	71	G1271A	S234N	0,08
Hma-B	BY02	320	G1170A	E200=	1
Hma-B	BY02	355	C983T	A138V	0,26
Hma-B	BY02	399	G1126A	A186T	0
Hma-B	BY02	505	C1203T	D211=	1
Hma-B	BY02	772	G1195T*	A210S	0
Hma-B	BY02	805	G1161A	E197=	1
Hma-B	BY02	936	G1156A	A196T	0
Hma-B	BY02	1024	G1062A	V164=	1
Hma-B	BY02	1445	G1070A	C167Y	0
Hma-B	BY02	1468	G964A	ajuste	-
Hma-B	V4K1	767	C962T	intrón	-
Hma-DT	BB16NN	E1-7	C2272T	A360V	0,4
Hma-DT	BB16NN	E3-64C	C2302T	A370V	0
Hma-DT	BB16NN	E3-1370	G2190A	G333R	0
Hma-DT	BB16NN	E3-259	G2208A	D339N	0
Hma-DT	BB16NN	E3-277	C2217T	R342*	0
Hma-DT	BB16NN	E3-319	G2190A	G333R	0
Hma-DT	BB16NN	E3-1155	C2207T	S338=	1
Hma-DT	BB16NN	E3-1274	C2184T	P331S	0,39
Hma-DT	BB16NN	E3-1275	C2206T	S338F	0
Hma-DT	BY02	506	G2271A	A360T	0,03
Hma-DT	BY02	835	G2276A	G328E	0,14
Hma-DS	BB16NN	E3-906	G2242A	R350K	0,21
Hma-DS	BY02	416	C2277T	L362F	0
Hma-DS	BY02	560	G2252A	K353=	1

Figura 5/2

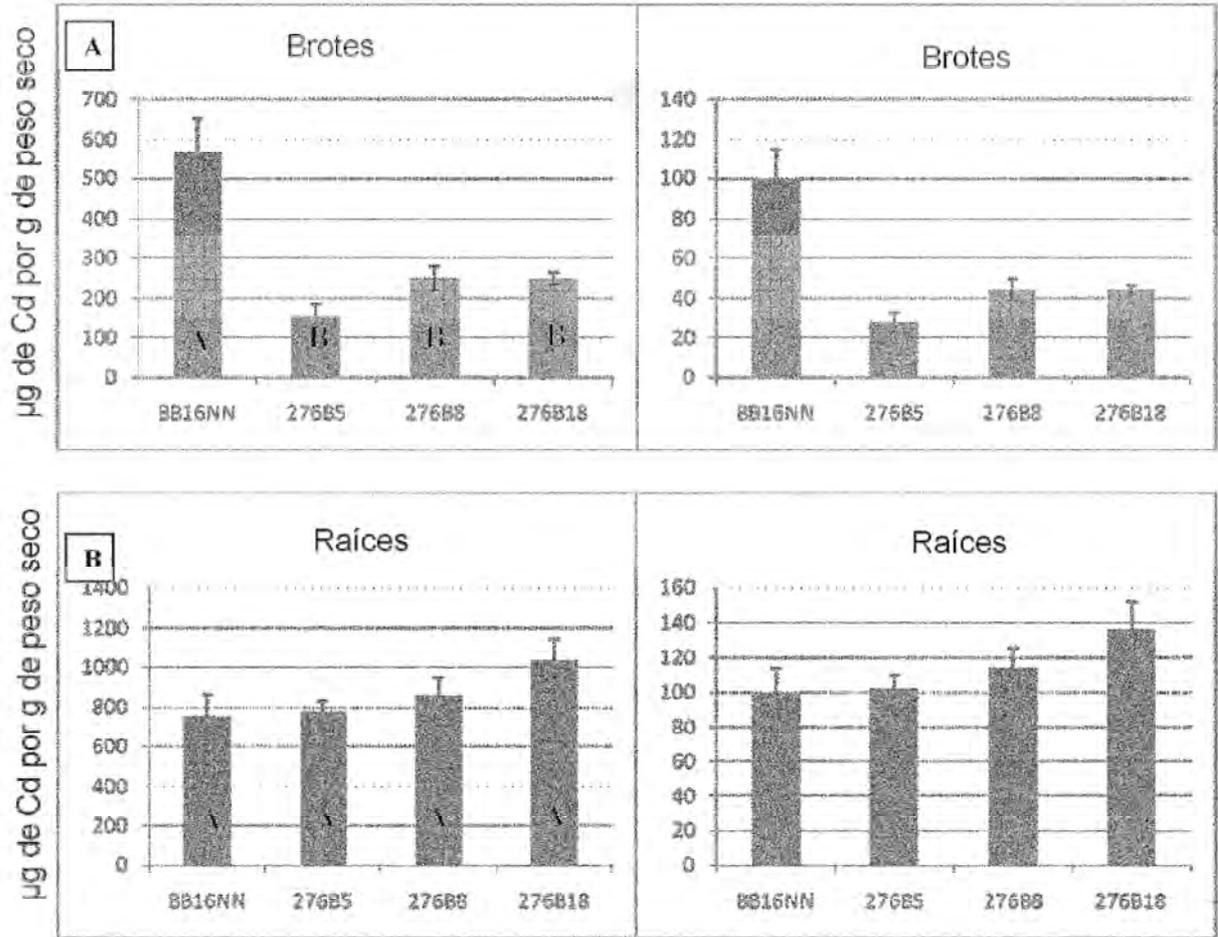


Figura 6



Figura 7

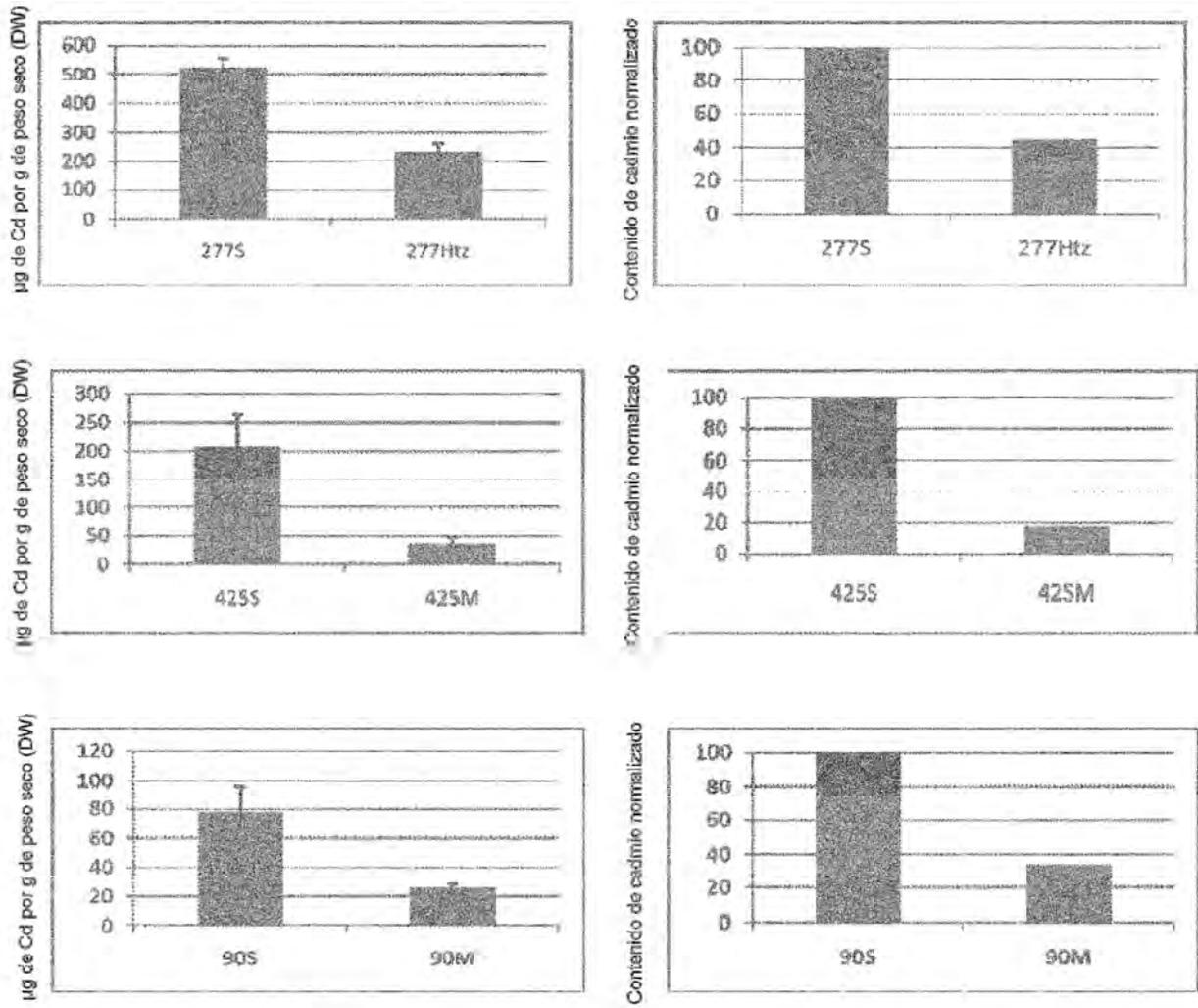


Figura 8

	Acumulación media de cadmio ($\mu\text{g/g}$)	% de tipo salvaje	Eficaz	Valor de p	Diferencia significativa
277S	525,0	***	2	0.0042	Sí
277Htz	232,6	44,3	4		
425S	207,0	***	4	0.0247	Si
425M	36,1	17,4	4		
90S	77,2	***	3	0.0513	No
90M	25,7	33,3	3		

Figura 9.

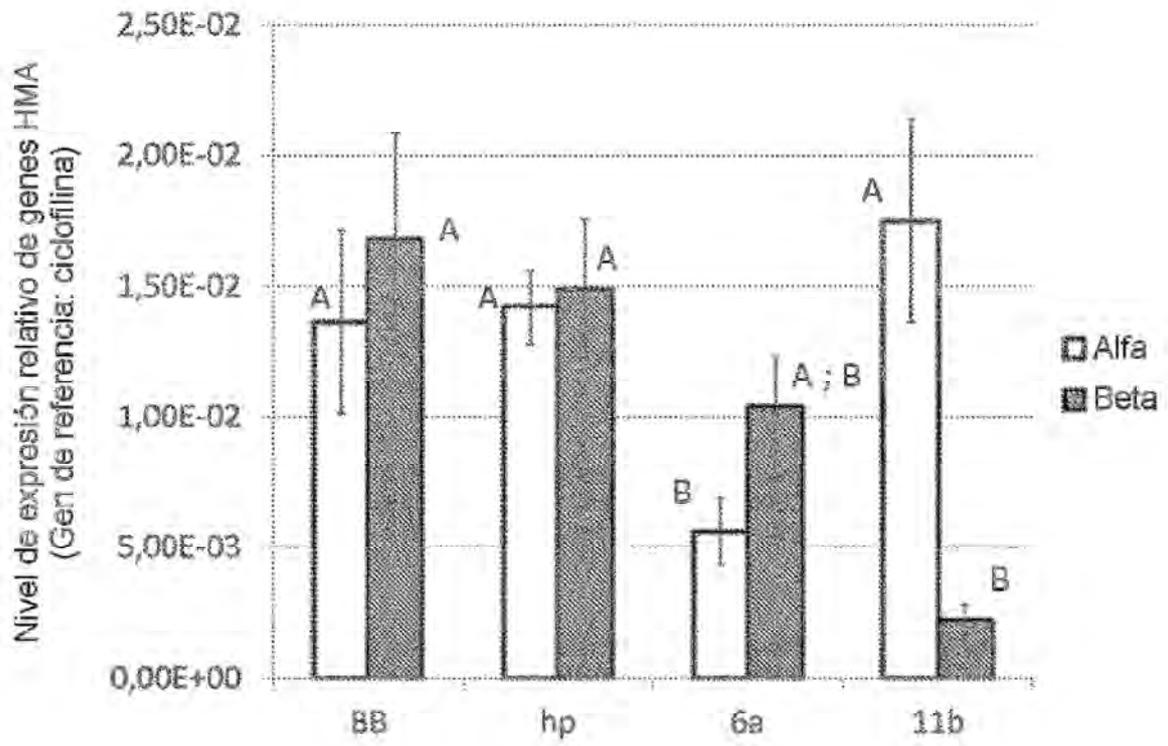


Figura 10

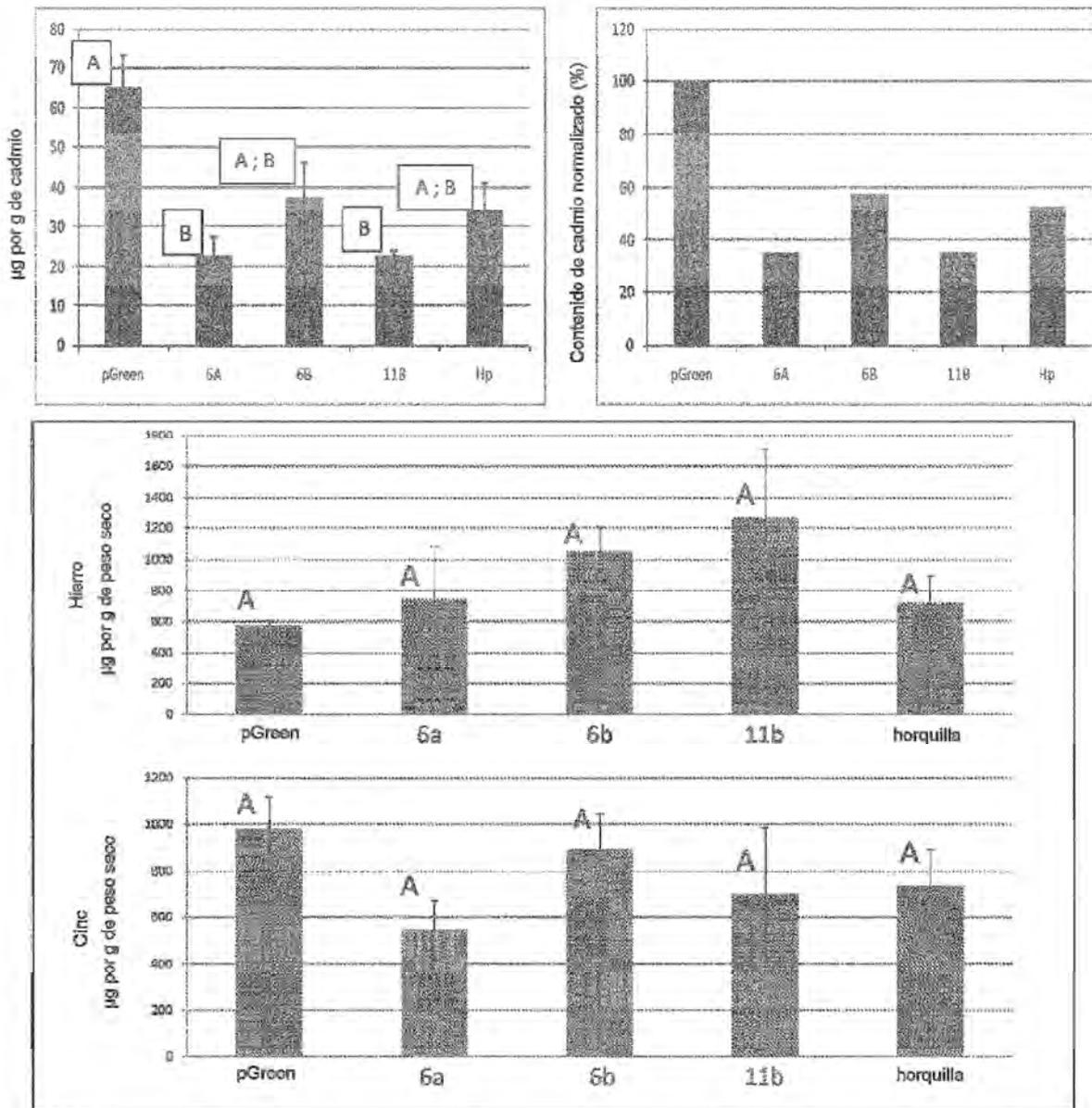


Figura 11

Diana 1	Colección	Identificación	Cambio de aminoácido		Diana 2	Colección	Identificación	Cambio de aminoácido	Nombre del cruce
HMA-AS	BB16NN	E2-425	W78*	x	HMA-AT	BY02	390	P68S	F1CD2-425-390
HMA-AS	BB16NN	E2-425	W78*	x	HMA-AT	BY02	769	A40T	F1CD2-425-769
HMA-AS	BB16NN	E2-425	W78*	x	HMA-DT	BB16NN	E3-1370	G333R	F1CD2-425-1370
HMA-AS	BB16NN	E2-425	W78*	x	HMA-AT	BY02	1336	L107F	F1CD2-425-1336
HMA-AS	BB16NN	E2-425	W78*	x	HMA-DT	BY02	835	G328E	F1CD2-425-835
HMA-AS	BB16NN	E2-425	W78*	x	HMA-DT	BB16NN	E3-259	D339N	F1CD2-425-259
HMA-AS	BB16NN	E2-425	W78*	x	HMA-DT	BB16NN	E3-277	R342*	F1CD2-425-277
HMA-AS	BB16NN	E2-425	W78*	x	HMA-DT	BY02	506	A360T	F1CD2-425-506
HMA-AS	BB16NN	E2-425	W78*	x	HMA-AT	BY02	769	A40T	F1CD2-425-769b
HMA-AS	BY02	450	C99Y	x	HMA-DT	BB16NN	E3-277	R342*	F1CD2-450-277
HMA-B	BB16NN	E3-163	C980T	x	HMA-DT	BB16NN	E3-277	R342*	F1CD2-163-277
HMA-B	BY02	399	A186T	x	HMA-DT	BB16NN	E3-277	R342*	F1CD2-399-277
HMA-B	BY02	936	A196T	x	HMA-DT	BB16NN	E3-277	R342*	F1CD2-936-277
HMA-B	BY02	1468	eyuste	x	HMA-DT	BB16NN	E3-277	R342*	F1CD2-1468-277
HMA-B	BB16NN	E1-276	E200K	x	HMA-AT	BY02	390	P68S	F1CD2-276-390
HMA-B	BB16NN	E1-276	E200K	x	HMA-AT	BY02	769	A40T	F1CD2-276-769
HMA-B	BB16NN	E1-276	E200K	x	HMA-DT	BB16NN	E3-1370	G333R	F1CD2-276-1370
HMA-B	BB16NN	E1-276	E200K	x	HMA-AT	BY02	1336	L107F	F1CD2-276-1336
HMA-B	BB16NN	E1-276	E200K	x	HMA-DT	BY02	835	G328E	F1CD2-276-835
HMA-B	BB16NN	E1-276	E200K	x	HMA-DT	BB16NN	E3-259	D339N	F1CD2-276-259
HMA-DS	BY02	416	L362F	x	HMA-AT	BY02	390	P68S	F1CD2-416-390
HMA-DS	BY02	416	L362F	x	HMA-AT	BY02	769	A40T	F1CD2-416-769
HMA-DS	BY02	416	L362F	x	HMA-DT	BB16NN	E3-1370	G333R	F1CD2-416-1370
HMA-DS	BY02	416	L362F	x	HMA-AT	BY02	1336	L107F	F1CD2-416-1336
HMA-DS	BY02	416	L362F	x	HMA-DT	BY02	835	G328E	F1CD2-416-835
HMA-DS	BY02	416	L362F	x	HMA-DT	BB16NN	E3-259	D339N	F1CD2-416-259
HMA-AS	BY02	793	E109K	x	HMA-AT	BY02	390	P68S	F1CD2-793-390
HMA-AS	BY02	793	E109K	x	HMA-AT	BY02	769	A40T	F1CD2-793-769
HMA-AS	BY02	793	E109K	x	HMA-DT	BB16NN	E3-1370	G333R	F1CD2-793-1370

Figura 12

Diana 1	Colección	Identificación	Cambio de aminoácido		Diana 2	Colección	Identificación	Cambio de aminoácido	Nombre del cruce
HMA-AS	BY02	793	E109K	x	HMA-AT	BY02	1336	L107F	FICD2-793-1336
HMA-AS	BY02	793	E109K	x	HMA-DT	BY02	835	G328E	FICD2-793-835
HMA-AS	BY02	793	E109K	x	HMA-DT	BB16NN	E3-259	D339N	FICD2-793-259
HMA-AS	BY02	450	C99Y	x	HMA-DT	BY02	506	A360T	FICD2-450-506
HMA-AS	BY02	450	C99Y	x	HMA-AT	BY02	390	P68S	FICD2-450-390
HMA-AS	BY02	450	C99Y	x	HMA-AT	BY02	769	A40T	FICD2-450-769
HMAB	BB16NN	E3-163	S137L	x	HMA-DT	BY02	506	A360T	FICD2-163-506
HMAB	BB16NN	E3-163	S137L	x	HMA-AT	BY02	390	P68S	FICD2-163-390
HMAB	BB16NN	E3-163	S137L	x	HMA-AT	BY02	769	A40T	FICD2-163-769
HMA-B	BY02	399	A186T	x	HMA-DT	BY02	506	A360T	FICD2-399-506
HMA-B	BY02	399	A186T	x	HMA-AT	BY02	390	P68S	FICD2-399-390
HMA-B	BY02	399	A186T	x	HMA-AT	BY02	769	A40T	FICD2-399-769
HMA-B	BY02	936	A196T	x	HMA-DT	BY02	506	A360T	FICD2-936-506
HMA-B	BY02	936	A196T	x	HMA-AT	BY02	390	P68S	FICD2-936-390
HMA-B	BY02	936	A196T	x	HMA-AT	BY02	769	A40T	FICD2-936-769
HMA-B	BY02	1445	C167Y	x	HMA-DT	BY02	506	A360T	FICD2-1445-506
HMA-B	BY02	1445	C167Y	x	HMA-AT	BY02	390	P68S	FICD2-1445-390
HMA-B	BY02	1445	C167Y	x	HMA-AT	BY02	769	A40T	FICD2-1445-769
HMA-B	BY02	1468	ayuste	x	HMA-DT	BY02	506	A360T	FICD2-1468-506
HMA-B	BY02	1468	ayuste	x	HMA-AT	BY02	390	P68S	FICD2-1468-390
HMA-B	BY02	1468	ayuste	x	HMA-AT	BY02	769	A40T	FICD2-1468-769

Figura 12 (cont.)

Colección	Identificación	Gen mutado	Cambio de nucleótido	Cambio de aminoácido	Puntuación de SIFT
BB16NN	90	Alfa	C576T	L107F	0
BB16NN	425	Alfa	G406A	W78*	0
BY02	1468	Alfa	G964A	ajuste	N.D.
BB16NN	277	Beta	C2217T	R342*	0
BB16NN	1275	Beta	C2206T	S338F	0

Figura 13

Número	Gen seleccionado	Exón seleccionado	Secuencias seleccionadas	Conjunto de cebadores usado
6a	Alfa	5	TGACTCTTATTATTCGGCAT	I miR-s gaTGACTCTTATTATTCGGCATtctctcttttgattcc
				II miR-a gaATGCGGAAATAAATAAGAGTCAcaagagaatcaatga
				III miR*s gaATACGGAAATAAATTAGAGTCTccacaggctgatgatg
				IV miR*a gaAGACTCTAAATTATTCGGTATctacatatataattcct
6b	Beta	6	TGGATCTTATCATTCGGCAT	I miR-s gaTGGATCTTATCATTCGGCATtctctcttttgattcc
				II miR-a gaATGCGGAAATGATAAGATCCATcaagagaatcaatga
				III miR*s gaATACGGAAATGATTAGATCCTccacaggctgatgatg
				IV miR*a gaAGGATCTAATCATTCGGTATctacatatataattcct
9	Alfa y Beta	9	TTCATTAGTATAACATGGCCT	I miR-s gaTTCATTAGTATAACATGGCCTtctctcttttgattcc
				II miR-a gaAGGCCATGTTTACTAATAATGAAtcaagagaatcaatga
				III miR*s gaAGACCATGTTTATAGTAATGATccacaggctgatgatg
				IV miR*a gaATCATTACTATAACATGGTCTctacatatataattcct
11a	Alfa	11	TGATTTAGCTAGAGTCTCAA	I miR-s gaTGATTTTAGCTAGAGTCTCAAtctctcttttgattcc
				II miR-a gaTTGAGACTTAGCTAATAAATCAcaagagaatcaatga
				III miR*s gaTTAAGACTTAGCAAAAATCTccacaggctgatgatg
				IV miR*a gaAGATTTTGTAGAGTCTTAAtctacatatataattcct
11b	Beta	11	TGATTTAGCAAGAGTCTCAA	I miR-s gaTGATTTTAGCAAGAGTCTCAAtctctcttttgattcc
				II miR-a gaTTGAGACTCTGTAAAATCAcaagagaatcaatga
				III miR*s gaTTAAGACTCTTGCAAAAATCTccacaggctgatgatg
				IV miR*a gaAGATTTTGTAGAGTCTTAAtctacatatataattcct

Figura 14

A.

Par de cebadores	Nombre	Secuencia
1	HpEx11FwXhoI	CCCGCTCGAGtgagagcaagtcaggtcatccga
	HpEx11RevKpnI	CGGGGTACCctgtggtacatccagctcttga
2	HpEx11FwXbaI	TGCTCTAGAtgagagcaagtcaggtcatccga
	HpEx11RevClaI	CCCATCGATctgtggtacatccagctcttga

B.

```
tgagagcaagtcaggtcatccgatggcagccgctctggtggactatgcacaatcaaattccgttgagccaaagcctgatagagttgagcagttc
aaaatttctggtgaagggatattggaagaattgatggaatggaaatctaigtcggaataggaaaattcttcaagagctggatgtaccaca
gg
```

Figura 15

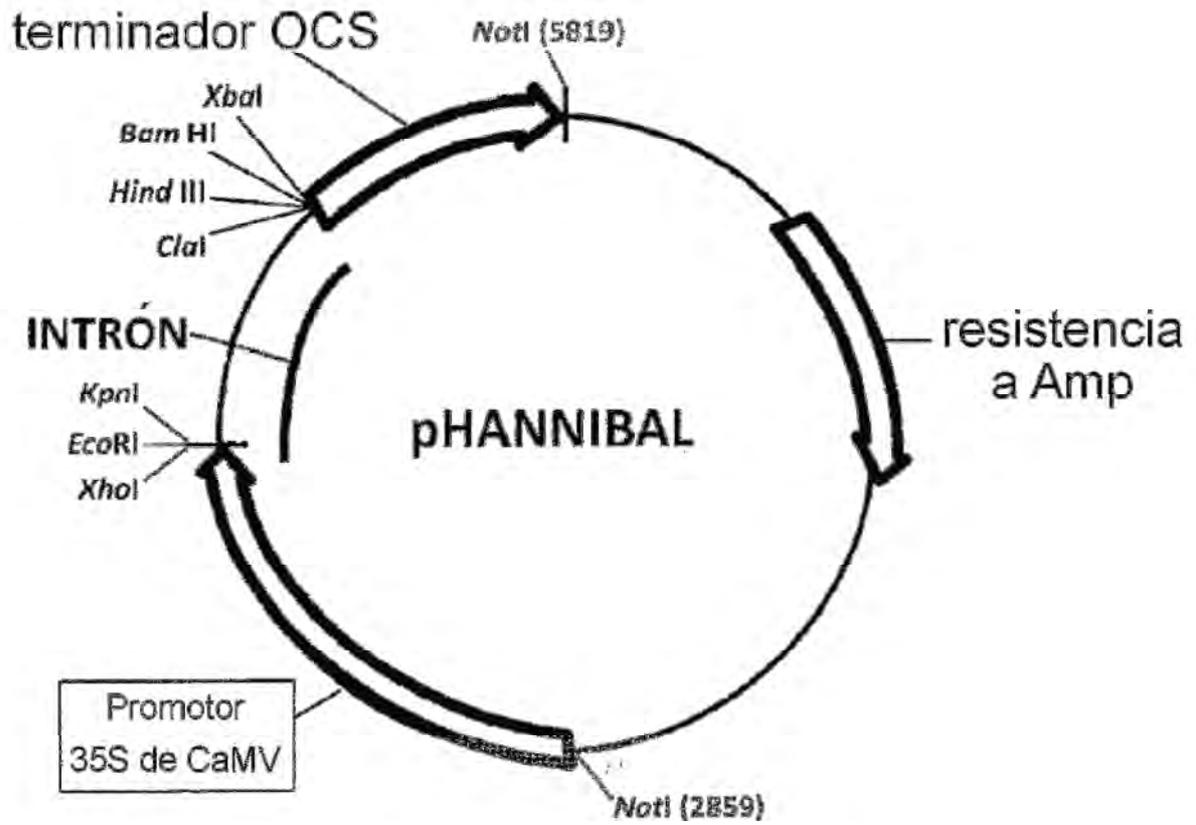


Figura 16

Genotipo	Número de plantas	Media para Cd	Media para Zn	Media para Fe	Error estándar para Cd	Error estándar para Zn	Error estándar para Fe
276M	12	37,74	329,99	410,37	9,02	168,84	336,27
276W	10	68,13	492,35	470,04	13,23	198,72	254,38
416M	8	31,07	340,55	256,70	12,01	178,18	149,82
425M	8	31,73	468,43	629,07	7,59	46,77	117,82
425W	10	60,81	374,87	356,70	15,37	185,12	250,46
90M	10	34,87	461,76	534,14	6,52	165,63	265,21
90W	9	47,68	407,53	455,80	9,36	198,59	304,47
amiRNAi	4	20,45	536,55	1045,81	3,48	148,28	530,32
BB16NN	9	55,75	522,82	575,28	9,70	153,98	422,14
BY02	5	45,29	364,86	373,15	5,05	109,60	162,35

Figura 17A

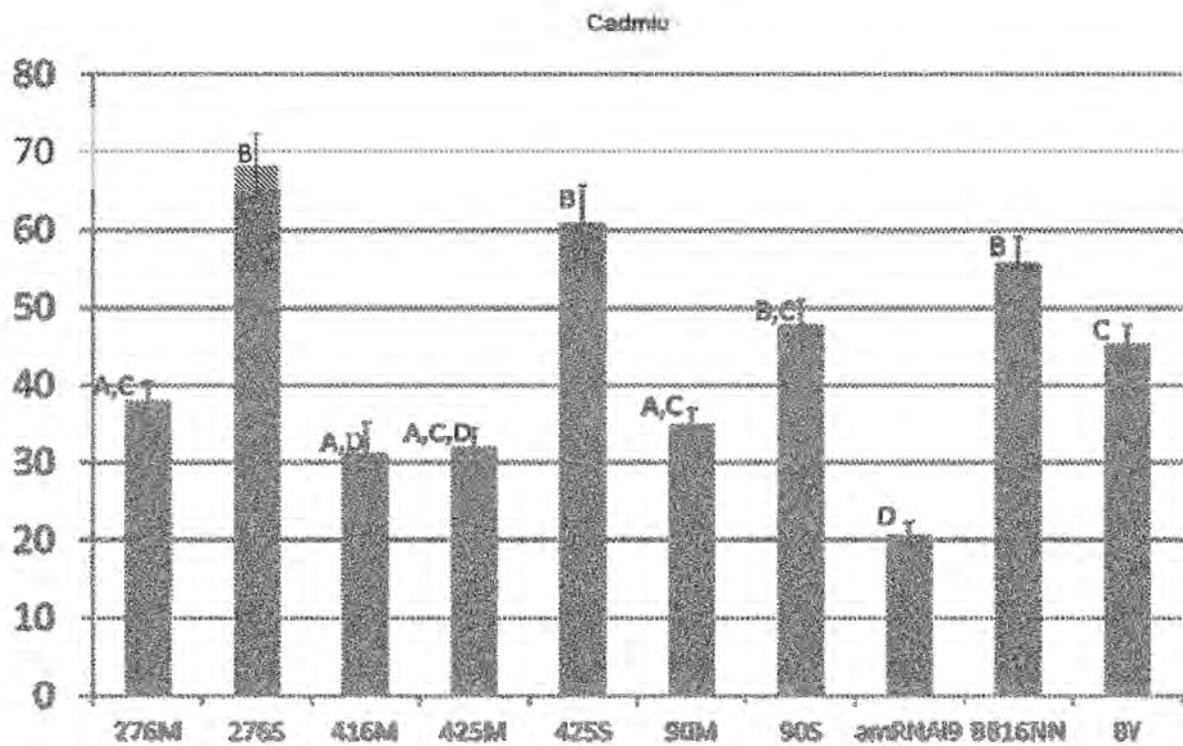


Figura 17B

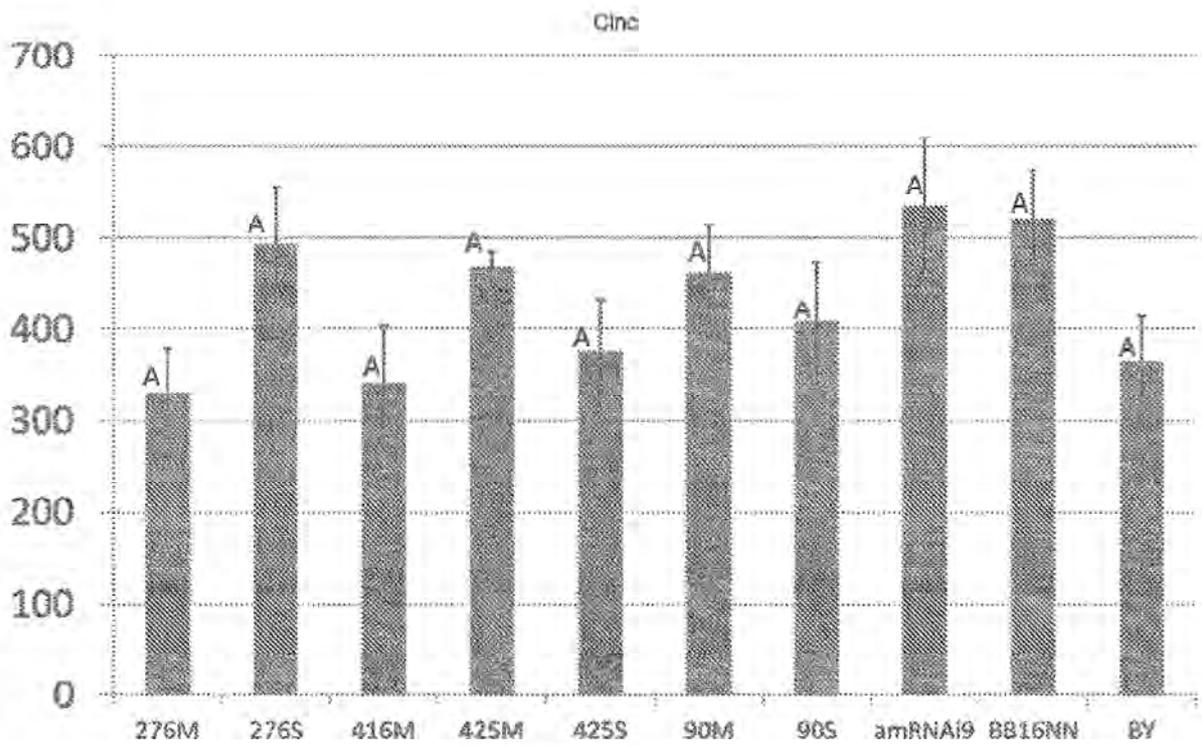


Figura 18A

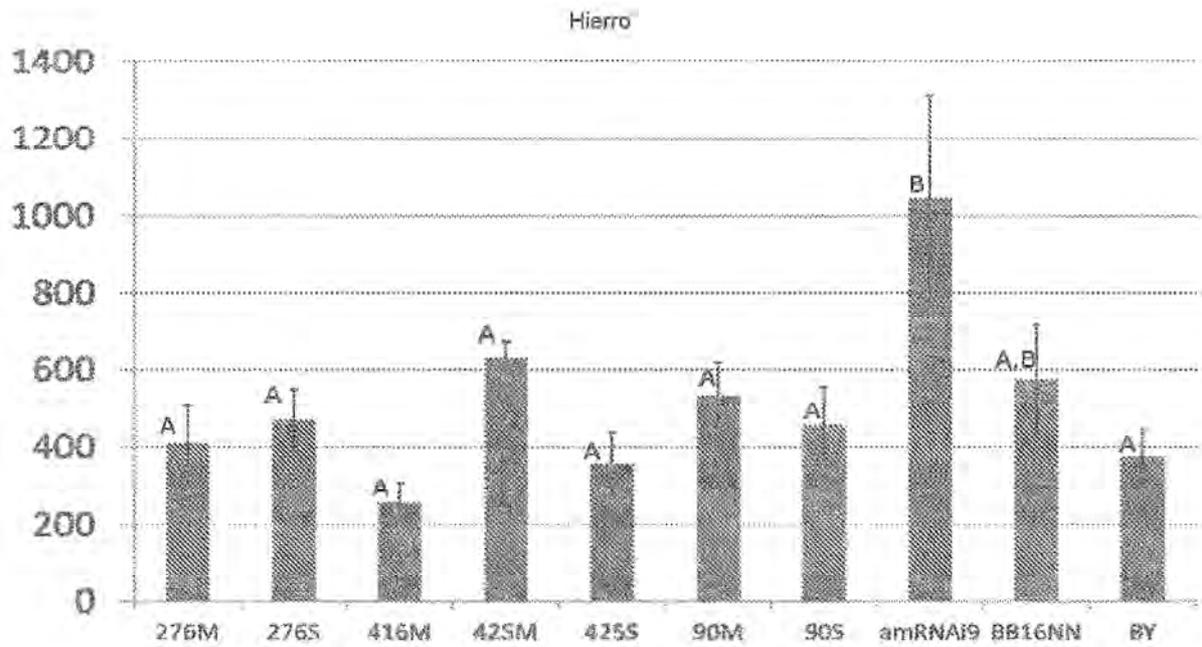


Figura 18B