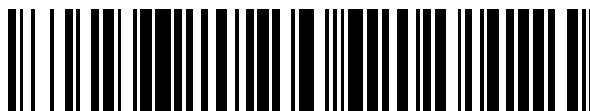


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 658 622**

51 Int. Cl.:

C07K 14/415 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.07.2010 PCT/NL2010/050461**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.01.2011 WO11008096**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.07.2010 E 10736844 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.12.2017 EP 2454277**

54 Título: **Regulación de la deficiencia de zinc y tolerancia en plantas**

30 Prioridad:

16.07.2009 EP 09165714

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

12.03.2018

73 Titular/es:

WAGENINGEN UNIVERSITEIT (100.0%)

**Droevendaalsesteeg 4
6708 PB Wageningen, NL**

72 Inventor/es:

**GONÇALVES LEITE DE ASSUNÇÃO, ANA y
AARTS, MARTINUS GERARDUS MARIA**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

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

ES 2 658 622 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

Regulación de la deficiencia de zinc y tolerancia en plantas

5 Campo de la invención

La invención se refiere a la biotecnología en plantas, más específicamente a modular la sensibilidad de las plantas a los metales, más específicamente al Zn. Particularmente, la invención se refiere a la adaptación de la planta a los cambios en la disponibilidad del Zn en el ambiente.

10

Antecedentes de la invención

El zinc es un micronutriente esencial para todos los organismos vivos, incluidas las plantas. Típicamente el zinc es el segundo metal de transición más abundante en los organismos después del hierro (Fe), y el único metal representado en las seis clases de enzimas (oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas). También existen sitios de unión al zinc en una amplia variedad de otras proteínas, lípidos de membrana y moléculas de ADN/ARN. La mayor clase de proteínas de unión al Zn en los organismos son las proteínas que contienen dominios de dedos de zinc que funcionan como reguladores de la transcripción.

15

20

El Zn está presente en el suelo principalmente en tres fracciones: (i) Zn soluble en agua (que incluye Zn^{2+} y fracciones orgánicas solubles), (ii) Zn adsorbido e intercambiable en la fracción coloidal (asociado con partículas de arcilla) y (iii) complejos de Zn insolubles y minerales. El zinc se adquiere de la solución del suelo principalmente como Zn^{2+} , pero además potencialmente en forma de complejos con ligandos orgánicos, por las raíces que alimentan sus brotes por medio del xilema.

25

Ante una escasez en el suministro de zinc, las plantas se adaptan al aumentar la capacidad de absorción de zinc. Se considera que las plantas controlan la homeostasis del Zn mediante una red muy regulada de sensores del estado de zinc y transductores de señal que controlan la expresión coordinada de transportadores de Zn implicados en la adquisición de Zn del suelo, la movilización entre órganos y tejidos y el secuestro dentro de los componentes celulares (Clemens, S., 2001, Planta 212:475-486).

30

En años recientes se han realizado numerosos estudios para descifrar las vías bioquímicas de la absorción y el transporte de Zn. En estos estudios, sin embargo, aún no se ha encontrado cuáles son las proteínas responsables de la absorción de Zn del suelo (Palmer, C.M. y Guerinot, M.L., 2009, Nature Chem. Biol. 5:333-340). Aunque se han identificado genes candidatos para los transportadores de Zn requeridos, los denominados transportadores ZIP ZIP1, ZIP2, ZIP3 y ZIP4 (Grotz, N. et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci USA 95:7220-7224), parecen ser necesarias más proteínas para explicar el fenómeno de la hiperacumulación de Zn, tales como los transportadores de metales pesados HMA2, 3 y 4 (Hanikenne et al, 2008, Nature 453:391-395). También la nicotianamina, producida por la nicotianamina sintasa (NAS), parece jugar un papel en el transporte vascular de zinc, y el transportador de citrato FRD3 (Durrett, T.P. et al., 2007, Plant Physiol. 144:197-205). Para el transporte entre los tejidos y órganos parecen estar implicadas numerosas proteínas. Los miembros del grupo YSL, una subfamilia de la familia de transportadores a la que pertenece el transportador de oligopéptidos (OPT), son proteínas que se han mencionado. Para el transporte intracelular de Zn, las proteínas NRAMP ZIP y ZIF parecen estar implicadas. El transporte de Zn hacia la vacuola se realiza mediante MTP (proteínas de tolerancia a metales, denominadas además como proteínas facilitadoras de la difusión de cationes - CDF).

45

(La falta de) adaptación de las plantas a una concentración cambiante de Zn en el ambiente funciona en ambos sentidos: deficiencia de zinc y toxicidad por zinc. Después de la deficiencia de Fe, la deficiencia de Zn es la deficiencia de micronutriente más común en la agricultura, que afecta principalmente regiones de Asia (Turquía y el Cercano Oriente, Asia Central, Sur y Centro del China), Sahel y África subsahariana y Australia. Dado que las plantas son frecuentemente la principal fuente dietética de micronutrientes para el consumo humano, muchas personas en todo el mundo sufren de deficiencias de Fe y Zn ya que las plantas, especialmente los cereales, son notoriamente pobres en su contenido de Fe y Zn biodisponibles.

50

Algunos suelos no tienen deficiencia de minerales, pero se han contaminado con grandes cantidades de metales pesados, tales como Zn o Cd. La toxicidad por Zn en los cultivos está mucho menos extendida que la deficiencia de Zn. Sin embargo, los síntomas de toxicidad usualmente se observan a concentraciones de Zn de más que 300 mg de Zn kg^{-1} en las hojas. Se conoce que algunas plantas son capaces de crecer en un suelo que tiene una alta concentración de Zn, tal como *Silene vulgaris*, *Thlaspi caerulescens*, *Arabidopsis halleri* y *Viola calaminaria* (véase además la Tabla 3 en Broadley, M.R. et al., 2007, New Phytologist 173:677-702). Se ha sugerido el uso de estos hiperacumuladores de Zn como plantas de saneamiento para extraer el zinc del suelo, de manera que el metal se concentra en la biomasa, que puede cosecharse, incinerarse y eliminarse de manera adecuada. Un método de este tipo, conocido como fitorremediación, actualmente no es atractivo ya que las plantas hiperacumuladoras de metales conocidas son relativamente pequeñas, por lo tanto, no producen suficiente biomasa para producir una gran capacidad de extracción de metales.

60

65

Los métodos para mejorar la tolerancia de una planta al zinc y la acumulación de zinc en las plantas se conocieron a partir de Ghandilyan et al., 2006, *Physiol. Plant.* 126:407-417, donde se encontró que la sobreexpresión de AtHMA4 conduce a un aumento en la concentración de Zn en los brotes y Cakmak, 2008, *Plant Soil* 302:1-17, donde se analiza que existen evidencias de la participación de la familia de transportadores ZIP para el aumento de la concentración de Zn en las plantas. Además, van der Zaal et al., 1999, *Plant Physiol.* 119:1047-1055 describieron que la sobreexpresión de ZAT dio como resultado un aumento de la tolerancia al Zn 5 en plantas y un aumento en la concentración de Zn en las raíces.

Sin embargo, todavía existe la necesidad de alternativas para ser capaces de controlar la adaptación de las plantas a los cambios en la concentración de zinc en el ambiente.

Resumen de la invención

La invención se refiere ahora a un método para cambiar la capacidad de una planta para su adaptación a los cambios en la concentración de zinc en el ambiente, especialmente el suelo, que comprende proporcionar a dicha planta con un nucleótido que codifica una proteína bZIP19 y/o bZIP23 u ortólogos de estas, en donde los ortólogos han retenido la función de bZIP19 o bZIP23 y tienen una secuencia de aminoácidos que es idéntica en un 90 % o más respecto a bZIP19 o bZIP23, y que sobreexpresa dicha/s proteína/s. Preferentemente en un método de este tipo aumenta la tolerancia a la deficiencia de Zn. En otra modalidad en un método de este tipo dicha planta es capaz de hiperacumular zinc. En otra modalidad dicha planta es capaz de aumentar las concentraciones de zinc en las partes comestibles.

En los métodos mencionados anteriormente, la planta se proporciona preferentemente con un nucleótido que codifica una proteína bZIP19 y un nucleótido que codifica una proteína bZIP23. Con mayor preferencia, dicha planta se proporciona adicionalmente con uno o más polinucleótidos que codifican una proteína seleccionada del grupo que consiste en transportadores de metales pesados, preferentemente HMA2, HMA3 o HMA4, proteínas YSL, preferentemente YSL, preferentemente YSL1 o YSL3, proteínas ZIP o IRT, proteínas ZIF, proteínas NAS, proteínas MRP, FRD3 y MTP.

La descripción se refiere, además, a una planta transformada con un polinucleótido que codifica una proteína bZIP19 y/o una bZIP23.

La invención comprende además un método de acuerdo a como se describió anteriormente o una planta como se describió anteriormente, en donde el polinucleótido se deriva de *Arabidopsis*, con mayor preferencia *A. thaliana*.

La descripción se refiere, además, a una planta producida mediante un método de acuerdo con la invención, preferentemente en donde dicha planta sobreexpresa una proteína bZIP19 y/o una bZIP23. Preferentemente dicha planta es tolerante a la deficiencia de Zn. Alternativamente, dicha planta es una hiperacumuladora de Zn y/o tiene una cantidad elevada de Zn biodisponible en sus partes comestibles.

Un método para la fitorremediación también es parte de la descripción, el cual comprende cultivar una planta de acuerdo con la invención en suelo que está contaminado con Zn, cosechar dicha planta y eliminar la biomasa. También es parte de la descripción un método para la biofortificación, que comprende cultivar una planta de acuerdo con la invención en suelo que está contaminado con Zn, cosechar dicha planta y eliminar la biomasa.

Además, es parte de la invención el uso de (los nucleótidos que codifican) la proteína bZIP19 y/o bZIP en los métodos de la invención y/o para producir las plantas de la invención.

Leyenda de las figuras

Figura 1: Secuencias de aminoácidos de las proteínas bZIP 19, bZIP23 y bZIP24 de *Arabidopsis thaliana*. Los aminoácidos resaltados en verde corresponden al dominio bZIP. Los aminoácidos resaltados en gris corresponden a dos motivos conservados ricos en residuos de histidina. Un asterisco o punto debajo de las secuencias alineadas indican aminoácidos idénticos o similares, respectivamente.

Figura 2: Cebos de un híbrido en levadura y expresión génica de bZIP en el grupo F. (A) Diagrama esquemático de los cebos (A-G) usados para la construcción de los vectores reporteros en el ensayo de un híbrido en levadura. La caja gris representa el motivo palindrómico de 10 pb. (B) Niveles relativos del transcrito (RTL) de bZIP19, bZIP23 y bZIP24 en plántulas de *Arabidopsis* de 3 semanas de edad cultivadas en medio MS, sin (Zn-), con 30 µM (Zn+) o con 300 µM de ZnSO₄ (Zn++). Las barras de error indican SE.

Figura 3: Expresión génica y transporte de zinc del transportador de zinc ZIP4 de *Arabidopsis*. (A) Niveles relativos de transcritos (RTL) de ZIP4 en plántulas de *Arabidopsis* de 3 semanas de edad cultivadas en medio MS, con 30 µM de ZnSO₄ (Zn+) o sin (Zn-). Las barras de error indican SE. (B) El cultivo de células *zrt1zrt2 S. cerevisiae* que portan el vector vacío (*zrt1zrt2 Ø*) o expresan ZIP4 (*zrt1zrt2 ZIP4*) se analizó al rociar diluciones en serie de las células (la OD₆₀₀ se muestra a la izquierda) en medio selectivo SD-URA con 0.4 o 0.8 mM de ZnCl₂. (C) Mediciones de OD en los

intervalos de tiempo indicados de *zrt1zrt2* Δ y *zrt1zrt2 ZIP4* en medio líquido selectivo SD-URA con 0.4 mM de $ZnCl_2$. Las barras de error indican SE.

5 Figura 4: El mutante doble por inserción de T-ADN *m19m23* es hipersensible a la deficiencia de zinc. (A) Efecto de la deficiencia de zinc sobre las plántulas de *Arabidopsis* de 3 semanas de edad (WT), mutantes por inserción de T-ADN de *bZIP19*, *m19*, mutantes por inserción de T-ADN de *bZIP23*, *m23*, y mutantes dobles por inserción de T-ADN, *m19m23*, cultivadas en medio MS sin (Zn^-) y con 30 μM de $ZnSO_4$ (Zn^+). (B) Efecto del suministro de zinc en plantas de *Arabidopsis* de 4 semanas de edad (WT), *m19*, *m23* y *m19m23*, cultivadas en hidropónicos a 0.05 μM (Zn^-), 2 μM (Zn^+) y 25 μM de $ZnSO_4$ (Zn^{++}). (C) Concentración de zinc, en $mg\ kg^{-1}$ de peso seco, y peso seco (DW), en g, de las raíces (barras blancas) y los brotes (barras grises) de plantas WT de 4 semanas de edad, *m19*, *m23* y *m19m23*, cultivadas en hidropónicos a 0.05 μM de $ZnSO_4$ (Zn^-). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; representan diferencias significativas de la media en comparación con la media del WT. Las barras de error indican SE.

15 Figura 5: (A) Dibujo esquemático del alelo mutante de *bZIP19* (*m19*) y el alelo mutante de *bZIP23* (*m23*). Los triángulos indican inserciones de T-ADN. Las cajas blancas indican exones, las cajas grises indican intrones, las líneas indican secuencias no traducidas en 5' y 3'. (B) Niveles relativos de transcritos (RTL) de *bZIP19* (barras blancas) y *bZIP23* (barras grises) en plántulas de 3 semanas de edad de plantas de *Arabidopsis* de tipo silvestre (WT), mutantes por inserción de T-ADN de *bZIP19* homocigotos (*m19*), mutantes por inserción de T-ADN de *bZIP23* (*m23*) homocigotos, y mutantes dobles por inserción de T-ADN (*m19m23*) cultivadas en medio MS. Las barras de error indican SE.

20 Figura 6: Concentración de zinc (en $mg\ kg^{-1}$ de peso seco) y peso seco (DW; en g) de raíces (barras blancas) y brotes (barras grises) de plantas de tipo silvestre (WT) de 4 semanas de edad, de mutantes simples de *bZIP19* (*m19*) y *bZIP23* (*m23*) y de mutantes dobles (*m19m23*), cultivadas en hidropónicos a 2 μM de $ZnSO_4$ (Zn^+). Las barras de error indican SE.

25 Figura 7: Concentración de zinc (en $mg\ kg^{-1}$ de peso seco) y peso seco (DW; en g) de raíces (barras blancas) y brotes (barras grises) de plantas de tipo silvestre (WT) de 4 semanas de edad, de mutantes simples de *bZIP19* (*m19*) y *bZIP23* (*m23*) y de mutantes dobles (*m19m23*), cultivadas en hidropónicos a 25 μM de $ZnSO_4$ (Zn^+). Las barras de error indican SE.

30 Figura 8: Estudio de complementación y análisis de la expresión de genes objetivo putativos. (A) Las plantas de *Arabidopsis* de tipo silvestre (WT), mutantes dobles por inserción de T-ADN (*m19m23*) y mutantes dobles que expresan constitutivamente *bZIP19* (*m19m23*-OX19) o *bZIP23* (*m19m23*-OX23), cultivadas durante 4 semanas en medio MS sin (Zn^-) y con 30 μM de $ZnSO_4$ (Zn^+). (B) Niveles relativos de transcritos (RTL) de *ZIP4*, *ZIP1*, *ZIP3*, *ZIP5*, *ZIP9*, *ZIP12*, *IRT3* y *ZIP2* en plántulas de *Arabidopsis* de tipo silvestre de 3 semanas de edad (WT) (barras blancas) y mutantes dobles *m19m23* (barras grises) cultivadas en medio MS con 30 μM de $ZnSO_4$ (Zn^+) o sin (Zn^-). Las barras de error indican SE.

35 Figura 9: Fenotipos visibles de OX 19 (# 19, 14, 15), OX 23 (# 16, 17, 18) y plantas Col de *Arabidopsis* no transformadas (WT), cultivadas durante 6 semanas en medio de hidropónico al que no se le ha añadido Zn (0 μM de Zn), lo que crea fuertes síntomas de deficiencia de zinc. Las líneas 19, 16 y 17 parecen tener rosetas más grandes y hojas verdes más oscuras, lo que muestra menos sensibilidad a la deficiencia de zinc, en comparación con WT.

40 Figura 10: Comparaciones del peso seco total de la planta de OX 19 (# 19, 14, 15), OX 23 (# 16, 17, 18) y plantas Col de *Arabidopsis* no transformadas (WT), cultivadas durante 6 semanas en medio de hidropónico al que no se le ha añadido Zn (0 μM de Zn) (A, panel izquierdo); o en medio de hidropónico que contiene Zn normal (2 μM de Zn) (B, panel derecho). Solo para el tratamiento bajo en Zn, se encontró que la línea # 16 fue significativamente diferente de WT.

45 Figura 11: Concentraciones de zinc de OX 19 (# 19, 14, 15), OX 23 (# 16, 17, 18) y plantas Col de *Arabidopsis* no transformadas (WT), cultivadas durante 6 semanas en medio de hidropónico al que no se le ha añadido Zn (0 μM de Zn).

50 Figura 12: Fenotipos visibles de pZIP4::bZIP19 (# 4, 5, 6, 7, 8, 9) y plantas Col de *Arabidopsis* no transformadas (# 1, 2, 3), cultivadas durante 3 semanas en medio de hidropónico al que no se le ha añadido Zn (0 μM de Zn). Las plantas todavía no muestran síntomas de una deficiencia de Zn. Aunque existe alguna variación dentro de las líneas debido a plantas que germinan más tarde que el resto, en general, las plantas pZIP4::bZIP19 muestran diámetros más grandes de las rosetas que las plantas no transformadas.

55 Figura 13: Secuencia de ADN y dibujo esquemático de la construcción proZIP4::bZIP19 (pBG0072) usada para generar *Arabidopsis* transgénica que expresa el ADNc de bZIP19 bajo el control del promotor de ZIP4 sensible a la deficiencia de zinc.

Definiciones

60 El término "gen" se usa ampliamente para referirse a cualquier segmento de ácido nucleico asociado con una función biológica. Por lo tanto, los genes incluyen secuencias codificantes y/o las secuencias reguladoras requeridas para su

expresión. Por ejemplo, un gen se refiere a un fragmento de ácido nucleico que expresa ARNm o ARN funcional, o codifica una proteína específica, y que incluye secuencias reguladoras. Los genes incluyen además segmentos de ADN no expresados que, por ejemplo, forman secuencias de reconocimiento para otras proteínas. Los genes pueden obtenerse a partir de una variedad de fuentes, que incluyen la clonación a partir de una fuente de interés o la síntesis a partir de una información de la secuencia conocida o predicha, y pueden incluir secuencias diseñadas para tener parámetros deseados.

El término gen "nativo" o "de tipo silvestre" se refiere a un gen que está presente en el genoma de una célula no transformada, es decir, una célula que no tiene una mutación conocida. El término "nativo" o "de tipo silvestre" está destinado a abarcar las variantes alélicas del gen.

Un "gen marcador" codifica un rasgo seleccionable o que puede tamizarse. El término "marcador de selección" se refiere a una secuencia de polinucleótido que codifica un rasgo metabólico que permite la separación de los organismos transgénicos y no transgénicos y generalmente se refiere a la provisión de resistencia a antibióticos. Un marcador de selección es por ejemplo el marcador de resistencia a la kanamicina codificado por *aph* (*npt*), o el gen de *hpt*, el gen que codifica resistencia a la higromicina. Otros marcadores de selección son por ejemplo genes reporteros tales como cloranfenicol acetil transferasa, β -galactosidasa, luciferasa y proteína fluorescente verde. Los métodos de identificación para los productos de los genes reporteros incluyen, pero no se limitan a, ensayos enzimáticos y ensayos fluorimétricos. Los genes reporteros y los ensayos para detectar sus productos se conocen bien en la técnica y se describen, por ejemplo, en *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel et al., Greene Publishing and Wiley-Interscience: Nueva York (1987) y actualizaciones periódicas.

El término "gen quimérico" se refiere a cualquier gen que contenga 1) secuencias de nucleótidos, que incluyen secuencias reguladoras y codificantes, que no se encuentran juntas en la naturaleza, o 2) secuencias de nucleótidos que codifican partes de proteínas que naturalmente no están unidas, o 3) partes de promotores que naturalmente no están unidos. En consecuencia, un gen quimérico puede comprender secuencias reguladoras y secuencias codificantes que se derivan de diferentes fuentes, o puede comprender secuencias reguladoras y secuencias codificantes derivadas de la misma fuente, pero que están dispuestas en una manera diferente a la que se encuentra en la naturaleza.

Un "transgén" se refiere a un gen que se ha introducido en el genoma mediante transformación y que preferentemente se mantiene de manera estable. Los transgenes pueden incluir, por ejemplo, genes que son heterólogos u homólogos a los genes de una planta particular que se va a transformar. Adicionalmente, los transgenes pueden comprender genes nativos insertados en un organismo no nativo o en genes quiméricos. El término "gen endógeno" se refiere a un gen nativo en su ubicación natural en el genoma de un organismo. Un gen "foráneo" se refiere a un gen que no se encuentra normalmente en el organismo huésped, sino que se introduce mediante transferencia de genes.

Un "oligonucleótido", por ejemplo, para usar en reacciones de sondas o de amplificación, puede ser de aproximadamente 30 o menos nucleótidos de longitud (por ejemplo, 9, 12, 15, 18, 20, 21 o 24, o cualquier número entre 9 y 30). Generalmente los cebadores específicos tienen más de 14 nucleótidos de longitud. Para una especificidad y rentabilidad óptimas, pueden preferirse cebadores de 16 a 24 nucleótidos de longitud. Los expertos en la técnica están bien versados en el diseño de cebadores para usar en procesos tales como PCR. Si es necesario, el sondeo puede realizarse con los fragmentos de restricción completos del gen descrito en la presente el cual puede ser de 100 o incluso de 1000 nucleótidos de longitud.

Los términos "proteína", "péptido" y "polipéptido" se usan indistintamente en la presente descripción.

"Secuencia codificante" se refiere a una secuencia de nucleótidos (ADN o ARN) que codifica una secuencia de aminoácidos específica y excluye las secuencias no codificantes. Puede constituir una "secuencia codificante ininterrumpida", es decir, que carece de un intrón, tal como en un ADNc o puede incluir uno o más intrones unidos por uniones de empalme adecuadas. Un "intrón" es una secuencia de ARN que está contenida en el transcrito primario pero que se elimina mediante escisión y re-ligadura del ARN dentro de la célula para crear el ARNm maduro que puede traducirse a una proteína. Además, el ADN que codifica dicha secuencia de ARN se diseña como "intrón". Los "exones" son las partes codificantes de la secuencia de ADN o ARN, que están separadas entre sí por los intrones.

Las "secuencias reguladoras" se refieren a secuencias de nucleótidos ubicadas hacia el extremo 5' (secuencias no codificantes en 5'), dentro, o hacia el extremo 3' (secuencias no codificantes en 3') de una secuencia codificante, y que influyen en la transcripción, el procesamiento de ARN o la estabilidad, o la traducción de la secuencia codificante asociada. Las secuencias reguladoras incluyen potenciadores, promotores, secuencias líder de la traducción, intrones, y secuencias señal de poliadenilación. Incluyen secuencias naturales y sintéticas, así como secuencias que pueden ser una combinación de secuencias naturales y sintéticas. Como se señaló anteriormente, el término "secuencias reguladoras adecuadas" no se limita a los promotores.

"Promotor" se refiere a una secuencia de nucleótidos, usualmente hacia el extremo 5' de su secuencia codificante, que controla la expresión de la secuencia codificante al proporcionar el reconocimiento para la ARN polimerasa y otros factores requeridos para una transcripción adecuada. "Promotor" incluye un promotor mínimo que es una secuencia corta de ADN compuesta de una caja TATA y otras secuencias que sirven para especificar el sitio de iniciación de la

transcripción, al que se añaden elementos reguladores para el control de la expresión. "Promotor" se refiere además a una secuencia de nucleótidos que incluye un promotor mínimo más elementos reguladores, que es capaz de controlar la expresión de una secuencia codificante o ARN funcional. Este tipo de secuencia promotora consiste en elementos hacia el extremo 5' proximales y más distales, los últimos elementos frecuentemente referidos como potenciadores. En consecuencia, un "potenciador" es una secuencia de ADN que puede estimular la actividad del promotor y puede ser un elemento innato del promotor o un elemento heterólogo insertado para potenciar el nivel o la especificidad tisular de un promotor. Es capaz de funcionar en ambas orientaciones (normal o invertido), y es capaz de funcionar incluso cuando se mueve hacia el extremo 5' o hacia el extremo 3' del promotor. Tanto los potenciadores como otros elementos del promotor hacia el extremo 5' se unen a proteínas de unión al ADN específicas de la secuencia, las cuales median sus efectos. Los promotores pueden derivarse en su totalidad de un gen nativo, o pueden estar compuestos de diferentes elementos derivados de diferentes promotores que se encuentran en la naturaleza, o incluso estar compuestos de segmentos sintéticos de ADN. Un promotor puede contener además secuencias de ADN que están implicadas en la unión de factores proteicos que controlan la efectividad de la iniciación de la transcripción en respuesta a condiciones fisiológicas o del desarrollo.

El "sitio de iniciación" es la posición alrededor del primer nucleótido que es parte de la secuencia transcrita, que además se define como la posición +1. Con respecto a este sitio se enumeran el resto de las secuencias del gen y sus regiones de control. Las secuencias hacia el extremo 3' (es decir, otras secuencias que codifican la proteína en la dirección 3') se denominan positivas, mientras que las secuencias hacia el extremo 5' (la mayoría de las regiones de control en la dirección 5') se denominan negativas.

"Expresión constitutiva" se refiere a la expresión mediante el uso de un promotor constitutivo.

La "expresión condicional" y "regulada" se refiere a la expresión controlada mediante un promotor regulado.

"Promotor constitutivo" se refiere a un promotor que es capaz de expresar el marco abierto de lectura (ORF) que controla en todos o casi todos los tejidos vegetales durante todas o casi todas las etapas del desarrollo de la planta.

Los términos "marco abierto de lectura" y "ORF" se refieren a la secuencia de aminoácidos codificada entre los codones de iniciación y terminación de la traducción de una secuencia codificante. Los términos "codón de iniciación" y "codón de terminación" se refieren a una unidad de tres nucleótidos adyacentes ('codón') en una secuencia codificante que especifica la iniciación y la terminación de la cadena, respectivamente, de la síntesis de proteínas (traducción del ARNm).

"Promotor regulado" se refiere a promotores que dirigen la expresión génica no constitutivamente, sino de una manera temporal y/o espacialmente regulada, e incluye promotores específicos de un tejido e inducibles. Incluye secuencias naturales y sintéticas, así como secuencias que pueden ser una combinación de secuencias naturales y sintéticas. Diferentes promotores pueden dirigir la expresión de un gen en diferentes tejidos o tipos celulares, o en diferentes etapas del desarrollo, o en respuesta a diferentes condiciones ambientales. Constantemente se están descubriendo nuevos promotores de diversos tipos que son útiles en las células vegetales, y pueden encontrarse numerosos ejemplos en la compilación realizada por Okamoto, J.K. y Goldberg, R.B. (1989) Capítulo 1, "Regulation of Plant Gene Expression: General Principles" en Stumpf, P.K. y Conn, E.E. Eds., The Biochemistry of Plants: A comprehensive treatise. Academic Press, NY Estados Unidos).

"Promotor específico de un tejido" se refiere a promotores regulados que no se expresan en todas las células vegetales sino solo en uno o más tipos celulares en órganos específicos (tales como raíces, tallos, hojas o semillas), tejidos específicos (tales como el embrión o cotiledón), o tipos celulares específicos (tales como el parénquima de las hojas o las células de almacenamiento de las semillas).

"Unido operativamente" se refiere a la asociación de secuencias de ácido nucleico en un solo fragmento de ácido nucleico de manera que la función de una se afecta por la otra. Por ejemplo, una secuencia de ADN reguladora se dice que está "unida operativamente a" o "asociada con" una secuencia de ADN que codifica un ARN o un polipéptido si las dos secuencias se ubican de manera que la secuencia de ADN reguladora afecta la expresión de la secuencia codificante de ADN (es decir, que la secuencia codificante o ARN funcional está bajo el control transcripcional del promotor). Las secuencias codificantes pueden estar unidas operativamente a secuencias reguladoras en orientación sentido o antisentido.

"Expresión" se refiere a la transcripción y/o traducción de un gen endógeno, ORF o porción de estos, o un transgén en plantas. La expresión se refiere a la transcripción y acumulación estable de ARN sentido (ARNm) o funcional. La expresión puede referirse además a la producción de proteína.

"Expresión específica" es la expresión de productos génicos que está limitada a uno o a pocos tejidos vegetales (limitación espacial) y/o a una o a pocas etapas del desarrollo de la planta (limitación temporal). Se reconoce que apenas existe una verdadera especificidad: los promotores parecen activarse preferentemente en algunos tejidos, mientras que en otros tejidos puede haber poca o ninguna actividad. Este fenómeno se conoce como expresión con

fugas. Sin embargo, en esta invención la expresión específica de un tejido se refiere a una expresión preferible en uno o pocos tejidos vegetales.

Los términos "secuencia de ADN heteróloga", "segmento de ADN exógeno" o "ácido nucleico heterólogo", como se usan en la presente, cada uno se refiere a una secuencia que se origina de una fuente foránea respecto a una célula huésped en particular o, si es de la misma fuente, está modificada respecto de su forma original. Por lo tanto, un gen heterólogo en una célula huésped incluye un gen que es endógeno respecto de la célula huésped en particular pero se ha modificado mediante, por ejemplo, el uso de barajado de ADN. Los términos incluyen además múltiples copias de origen no natural de una secuencia de ADN de origen natural. Por lo tanto, los términos se refieren a un segmento de ADN que es foráneo o heterólogo a la célula, u homólogo a la célula pero en una posición dentro del ácido nucleico de la célula huésped en donde el elemento no se encuentra normalmente. Los segmentos de ADN exógenos se expresan para producir polipéptidos exógenos. Una secuencia de ADN "homóloga" es una secuencia de ADN que se asocia naturalmente con una célula huésped en la cual se introduce.

"Homólogo a" en el contexto de identidad de secuencias de nucleótidos o aminoácidos se refiere a la similitud entre la secuencia de nucleótidos de dos moléculas de ácidos nucleicos o entre las secuencias de aminoácidos de dos moléculas proteicas. Los estimados de dicha homología se proporcionan por hibridación ADN-ADN o ADN-ARN en condiciones de rigurosidad como conocen bien los expertos en la técnica (como se describe en Haines y Higgins (eds.), *Nucleic Acid Hybridization*, IRL Press, Oxford, U. K.), o mediante la comparación de similitud de secuencias entre dos ácidos nucleicos o proteínas. Dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos son homólogas cuando sus secuencias tienen una similitud de secuencia de más de 60 %, preferentemente más de 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o incluso 98 %.

El término "sustancialmente similar" se refiere a secuencias de nucleótidos y aminoácidos que representan equivalentes funcionales y/o estructurales de las secuencias descritas en la presente. Por ejemplo, las secuencias de nucleótidos alteradas que simplemente reflejan la redundancia del código genético pero sin embargo codifican secuencias de aminoácidos que son idénticas a una secuencia de aminoácidos en particular son sustancialmente similares a las secuencias particulares. Además, las secuencias de aminoácidos que son sustancialmente similares a una secuencia en particular son aquellas en donde la identidad de aminoácidos en general es al menos 65 % o mayor a las presentes secuencias. Las modificaciones que dan como resultado secuencias de nucleótidos o aminoácidos equivalentes están dentro de la experiencia habitual de la técnica. Además, el experto reconoce que las secuencias de nucleótidos equivalentes que se incluyen en esta invención también pueden definirse por su capacidad para hibridar, en condiciones de baja, moderada y/o gran rigurosidad (por ejemplo, SSC 0.1X, SDS al 0.1 %, 65 °C), con las secuencias de nucleótidos que están dentro del alcance literal de las presentes reivindicaciones.

El término "transformación" se refiere a la transferencia de un fragmento de ácido nucleico al genoma de una célula huésped, lo que resulta en una herencia genéticamente estable. Las células huésped que contienen los fragmentos de ácido nucleico transformados se denominan células "transgénicas", y los organismos que comprenden células transgénicas se denominan "organismos transgénicos". Los ejemplos de métodos de transformación de plantas y células vegetales incluyen transformación mediada por *Agrobacterium* (De Blaere et al., 1987) tecnología de bombardeo con partículas (Klein et al. 1987; patente de Estados Unidos núm. 4,945,050), microinyección, precipitación con CaPO₄, lipofección (fusión con liposomas), uso de una pistola de genes y transportador de vectores de ADN (Wu et al., 1992). Las plantas completas pueden regenerarse a partir de células transgénicas mediante métodos bien conocidos para el experto (véase, por ejemplo, Fromm et al., 1990).

"Transformado", "transgénico" y "recombinante" se refieren a un organismo huésped tal como una bacteria o una planta en la cual se ha introducido una molécula de ácido nucleico heterólogo. La molécula de ácido nucleico heterólogo puede integrarse establemente en el genoma que se conoce generalmente en la técnica y se describe en Sambrook et al., 1989. Véase además Innis et al., 1995 y Gelfand, 1995; y Innis y Gelfand, 1999. Por ejemplo, plantas o callos "transformados", "transformantes" y "transgénicos" han pasado a través del proceso de transformación y contienen un gen foráneo integrado en su cromosoma. El término "no transformado" se refiere a plantas normales que no han pasado a través del proceso de transformación.

"Transformado transitoriamente" se refiere a células en las cuales se han introducido transgenes y ADN foráneo (por ejemplo, mediante métodos como transformación mediada por *Agrobacterium* o bombardeo biolístico), pero no se seleccionan por un mantenimiento estable.

"Transformado establemente" se refiere a células que se han seleccionado y regenerado en un medio de selección después de la transformación.

"Estable genéticamente" y "heredable" se refieren a elementos genéticos integrados en el cromosoma que se mantienen establemente en la planta y se heredan establemente por la progenie a través de generaciones sucesivas.

"Integrado en el cromosoma" se refiere a la integración de un gen foráneo o construcción de ADN en el ADN del huésped mediante enlaces covalentes. Cuando los genes no se "integran en el cromosoma" pueden "expresarse transitoriamente". La expresión transitoria de un gen se refiere a la expresión de un gen que no se integra en el

cromosoma del huésped pero funciona independientemente, como parte de un plásmido o casete de expresión de replicación autónoma, por ejemplo, o como parte de otro sistema biológico tal como un virus.

5 "Transformante primario" se refiere a plantas transgénicas que son de la misma generación genética que el tejido que se transformó inicialmente (es decir, que no han experimentado meiosis ni fertilización después de la transformación).

10 "Los transformantes secundarios" y las "generaciones T1, T2, T3, etcétera" se refieren a plantas transgénicas derivadas de transformantes primarios a través de uno o más ciclos meióticos y de fertilización. Pueden derivarse de autofertilización de transformantes primarios o secundarios o cruces de transformantes primarios o secundarios con otras plantas transformadas o no transformadas. Los transformantes secundarios son un aspecto de la presente invención.

"Genoma" se refiere al material genético completo de un organismo.

15 El término "ácido nucleico" o "polinucleótido" se refiere a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros de estos en forma monocatenaria o bicatenaria, compuestos de monómeros (nucleótidos) que contienen un azúcar, fosfato y una base que es una purina o pirimidina. A menos que se limite específicamente, el término abarca ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares al ácido nucleico de referencia y se metabolizan de manera similar a los nucleótidos de origen natural. A menos que se indique lo contrario, una secuencia de ácido nucleico particular implícitamente abarca además sus variantes modificadas de forma conservadora (por ejemplo, sustituciones de codones redundantes) y las secuencias complementarias, así como la secuencia que se indica explícitamente. Específicamente, las sustituciones de codones redundantes pueden lograrse mediante la generación de secuencias en las cuales la tercera posición de uno o más (o todos) los codones seleccionados se sustituye con residuos con base mezclada y/o desoxiinosina (Batzner et al., 1991; Ohtsuka et al. 1985, Rossolini et al., 1994). Un "fragmento de ácido nucleico" es una fracción de una molécula de ácido nucleico determinada. En plantas superiores, el ácido desoxirribonucleico (ADN) es el material genético mientras que el ácido ribonucleico (ARN) participa en la transferencia de información contenida dentro del ADN a proteínas. El término "secuencia de nucleótidos" se refiere a un polímero de ADN o ARN que puede ser monocatenario o bicatenario, opcionalmente que contiene bases de nucleótidos sintéticas, no naturales o alteradas capaces de incorporarse a polímeros de ADN o ARN. Los términos "ácido nucleico" o "secuencia de ácido nucleico" también pueden usarse indistintamente con un gen, ADNc, ADN y ARN codificado por un gen.

35 Las secuencias de nucleótidos usadas en aspectos de la invención incluyen tanto las secuencias de origen natural como las formas mutantes (variantes). Dichas variantes poseerán la actividad deseada, es decir, la actividad del promotor o la actividad del producto codificado por el marco abierto de lectura de la secuencia de nucleótidos no variante.

40 Por lo tanto, por "variante" se hace referencia a una secuencia sustancialmente similar. Para las secuencias de nucleótidos que comprenden un marco abierto de lectura, las variantes incluyen aquellas secuencias que, debido a la redundancia del código genético, codifican la secuencia de aminoácidos idéntica de la proteína nativa. Las variantes alélicas de origen natural tales como estas pueden identificarse con el uso de técnicas de biología molecular bien conocidas, como, por ejemplo, con técnicas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) e hibridación. Las variantes de secuencias de nucleótidos incluyen además secuencias de nucleótidos derivadas sintéticamente, tales como las generadas, por ejemplo, mediante el uso de mutagénesis dirigida a un sitio y por los marcos abiertos de lectura, codifican la proteína nativa, así como las que codifican un polipéptido que tiene sustituciones de aminoácidos respecto de la proteína nativa. Generalmente, las variantes de una secuencia de nucleótidos de la invención tendrán al menos 40, 50, 60, a 70 %, por ejemplo, preferentemente 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, a 79 %, generalmente al menos 80 %, por ejemplo, 81 %-84 %, al menos 85 %, por ejemplo, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, a 98 % y 99 % de identidad de secuencia de nucleótidos con la secuencia de nucleótidos nativa (tipo silvestre o endógena).

50 El término "identidad de secuencia de nucleótidos" u "homología de secuencia de nucleótidos" como se usa en la presente denota el nivel de similitud, o el nivel de homología, respectivamente, entre dos polinucleótidos. Los polinucleótidos tienen secuencias "idénticas" si la secuencia de nucleótidos en las dos secuencias es la misma. Los polinucleótidos tienen secuencias "homólogas" si la secuencia de nucleótidos en las dos secuencias es la misma cuando se alinean para una correspondencia máxima. La comparación de secuencias entre dos o más polinucleótidos se realiza generalmente mediante la comparación de las porciones de las dos secuencias sobre una ventana de comparación para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. La ventana de comparación es generalmente de aproximadamente 20 a 200 nucleótidos contiguos. El "porcentaje de identidad de secuencia" o el "porcentaje de homología de secuencia" para los polinucleótidos, tal como 50, 60, 70, 80, 90, 95, 98, 99 o 100 por ciento de identidad u homología de secuencia se puede determinar por comparación de dos secuencias óptimamente alineadas sobre una ventana de comparación, en donde la parte de la secuencia del polipéptido en la ventana de comparación puede incluir adiciones o deleciones (es decir, interrupciones) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para una alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula para: (a) determinar el número de posiciones en las que la base de ácido nucleico idéntica ocurre en ambas secuencias para producir el número de posiciones coincidentes; (b) dividir el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación; y (c) multiplicar el resultado por 100 para obtener el

porcentaje de homología de secuencia. La alineación óptima de las secuencias para su comparación se puede llevar a cabo mediante implementaciones computarizadas de algoritmos conocidos, o por inspección visual. Algoritmos para la comparación de secuencias y la alineación de múltiples secuencias que están disponibles fácilmente son, respectivamente, los programas de la Herramienta de búsqueda de alineación local básica (BLAST) (Altschul *et al.*, 1990; Altschul *et al.*, 1997) y ClustalW, ambos disponibles en internet. Otros programas adecuados incluyen, pero sin limitarse a, GAP, BestFit, PlotSimilarity, y FASTA en el Paquete de Programas para Genética de Wisconsin (Genetics Computer Group (GCG), Madison, WI, EE.UU.) (Devereux *et al.*, 1984).

Las secuencias de ácido nucleico de la invención pueden "optimizarse" para un aumento de su expresión en plantas de interés. Véase, por ejemplo, EP 0359472 o WO 91/16432. De esta manera, los marcos abiertos de lectura en los genes o fragmentos génicos pueden sintetizarse con la utilización de codones preferidos en plantas. Por lo tanto, las secuencias de nucleótidos pueden optimizarse para la expresión en cualquier planta.

Por "variante" de polipéptido se entiende un polipéptido derivado de la proteína nativa mediante delección (denominado truncamiento) o adición de uno o más aminoácidos al extremo N-terminal y/o C-terminal de la proteína nativa; delección o adición de uno o más aminoácidos a uno o más sitios en la proteína nativa; o sustitución de uno o más aminoácidos en uno o más sitios en la proteína nativa. Dichas variantes pueden resultar, por ejemplo, de polimorfismo genético o de la manipulación del ser humano. Los métodos para tales manipulaciones generalmente se conocen en la técnica. En la definición de variante de polipéptido se incluyen además los polipéptidos "ortólogos" (ortólogos), que son péptidos codificados por genes en diferentes especies que evolucionan a partir de un gen ancestral común por especiación. Normalmente, los ortólogos retienen la misma función en el curso de la evolución

Por lo tanto, los polipéptidos pueden alterarse en diversas maneras que incluyen sustituciones, delecciones, truncamientos, e inserciones de aminoácidos. Los métodos para tales manipulaciones generalmente se conocen en la técnica. Se prefieren las sustituciones conservadoras, tales como el intercambio de un aminoácido con otro que tiene propiedades similares. Las sustituciones, delecciones o adiciones individuales que alteran, añaden o eliminan un solo aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos (típicamente menos de 5 %, más típicamente menos del 1 %) en una secuencia codificada son "variaciones modificadas de manera conservadora", donde las alteraciones dan como resultado la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar.

"Casete de expresión" como se usa en la presente se refiere a una secuencia de ADN capaz de dirigir la expresión de una secuencia de nucleótidos en particular en una célula huésped adecuada, que comprende un promotor unido operativamente a la secuencia de nucleótidos de interés que está unida operativamente a señales de terminación. Típicamente comprende además las secuencias requeridas para una adecuada traducción de la secuencia de nucleótidos. La región codificante usualmente codifica una proteína de interés pero puede codificar además un ARN funcional de interés, por ejemplo un ARN antisentido o un ARN no traducido, en la dirección sentido o antisentido. El casete de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos de interés puede ser quimérico, lo que significa que al menos uno de sus componentes es heterólogo con respecto a al menos uno de sus otros componentes. El casete de expresión también puede ser uno que es de origen natural pero que se ha obtenido en una forma recombinante útil para su expresión heteróloga. La expresión de la secuencia de nucleótidos en el casete de expresión puede estar bajo el control de un promotor constitutivo o de un promotor inducible que inicia la transcripción solo cuando la célula huésped se expone a algún estímulo externo en particular. En el caso de un organismo multicelular, el promotor puede, además, ser específico para un tejido u órgano o etapa de desarrollo en particular.

El término "vector" como se usa en la presente se refiere a una construcción compuesta de material genético diseñada para dirigir la transformación de una célula objetivo. Un vector contiene múltiples elementos genéticos orientados posicional y secuencialmente, es decir, unidos operativamente con otros elementos necesarios de manera que el ácido nucleico en un casete de ácido nucleico puede transcribirse y cuando sea necesario, traducirse en las células transformadas. Se define que un "vector" incluye, entre otros, cualquier plásmido, cósmido, fago o vector binario de *Agrobacterium* en forma bicatenaria o monocatenaria lineal o circular que puede o no ser autotransmisible o movilizable, y que puede transformar un huésped procarionta o eucariota mediante integración en el genoma celular o existir de manera extracromosómica (por ejemplo, plásmido de replicación autónoma con un origen de replicación). Específicamente se incluyen vectores lanzadera mediante lo cual se hace referencia a un vehículo de ADN capaz, naturalmente o por su diseño, de replicación en dos organismos huésped diferentes, que pueden seleccionarse de actinomicetes y especies relacionadas, bacterias y eucariotas (por ejemplo, células de plantas superiores, de mamífero, de levadura o fúngicas). Preferentemente, el ácido nucleico en el vector está bajo el control de, y unido operativamente a, un promotor adecuado u otros elementos reguladores para la transcripción en una célula huésped, tal como una célula microbiana, por ejemplo, bacteriana, o vegetal. El vector puede ser un vector de expresión bifuncional que funciona en múltiples huéspedes. En el caso de ADN genómico, este puede contener su propio promotor u otros elementos reguladores y en el caso de ADNc este puede estar bajo el control de un promotor adecuado u otros elementos reguladores para la expresión en la célula huésped.

Los "vectores de clonación" típicamente contienen uno o un pequeño número de sitios de reconocimiento de endonucleasas de restricción en donde las secuencias de ADN foráneas pueden insertarse de una manera determinable sin pérdida de la función biológica esencial del vector, así como un gen marcador que sea adecuado para usar en la identificación y selección de células transformadas con el vector de clonación.

Una "planta transgénica" es una planta que tiene una o más células vegetales que contienen un vector de expresión.

5 "Tejido vegetal" incluye plantas o tejidos diferenciados y no diferenciados, que incluyen, pero sin limitarse a, raíces, tallos, brotes, hojas, polen, semillas, tejido tumoral y diversas formas de células y cultivo tales como células individuales, protoplastos, embriones, y tejido calloso. El tejido vegetal puede estar en plantas o en órganos, tejido o cultivo celular.

10 El término "planta," como se usa en la presente, se refiere a cualquier tipo de planta. Los inventores proporcionan más adelante una descripción ilustrativa de algunas plantas que pueden usarse con la invención. Sin embargo, la lista se proporciona con fines ilustrativos solamente y no es limitante, ya que los expertos en la técnica conocerán otros tipos de plantas que pueden usarse con la invención.

15 Una clase común de plantas explotadas en la agricultura son los cultivos de vegetales, que incluyen alcachofas, colirrábano, rúcula, puerros, espárragos, lechuga (por ejemplo, cabeza, hoja, romana), bok choy, malanga, brócoli, melones (por ejemplo, melón, sandía, crenshaw, melón verde, cantalupo), coles de Bruselas, repollo, cardones, zanahorias, napa, coliflor, quimbombó, cebollas, apio, perejil, garbanzos, chirivías, achicoria, col china, pimientos, coles, patatas, plantas de pepino (calabacines, pepinos), calabazas, cucurbitáceas, rábanos, cebollas secas, colinabo, berenjena, salsifí, escarola, chalotes, endivia, ajo, espinacas, cebollín, calabaza, lechuga, remolacha (remolacha azucarera y remolacha forrajera), camote, acelga, rábano picante, tomates, col rizada, nabos y especias.

20 Otros tipos de plantas que frecuentemente tienen uso comercial incluyen cultivos de frutas y vides como manzanas, albaricoques, cerezas, nectarinas, melocotones, peras, prunus, ciruelas, membrillo, almendros, castaños, avellanas, pacanas, pistachos, nueces, cítricos, arándanos, moras, arándanos rojos, grosellas, moras rojas, frambuesas, fresas, zarzamoras, uvas, aguacates, plátanos, kiwi, caquis, granada, piña, frutas tropicales, poros, melón, mango, papaya y lichi.

30 Muchas de las plantas más ampliamente cultivadas son plantas de cultivo tales como onagra, espuma de pradera, maíz (de campo, dulce, palomero), lúpulo, jojoba, cacahuètes, arroz, cártamo, granos pequeños (cebada, avena, centeno, trigo, etc.), sorgo, tabaco, kapok, plantas leguminosas (frijoles, lentejas, guisantes, soya), plantas oleaginosas (colza, mostaza, amapola, olivo, girasoles, coco, plantas de aceite de ricino, grano de cacao, maní), plantas de fibra (algodón, lino, cáñamo, yute), *Lauraceae* (canela, alcanfor) o plantas como café, caña de azúcar, té y plantas de caucho natural.

35 Especialmente aplicables en la presente invención son las plantas con una alta biomasa, como las plantas que también se utilizan en la producción de biocombustibles, tales como *Miscanthus*, pasto varilla, álamo, eucalipto, pino del loblolly, sauce, arce plateado, alfalfa, *Jatropha*, y *Pongamia pinnata*.

40 Otro grupo de plantas económicamente importantes son las plantas ornamentales. Ejemplos de plantas ornamentales cultivadas comúnmente incluyen *Alstroemeria* (por ejemplo, *Alstroemeria brasiliensis*), aster, azalea (por ejemplo, *Rhododendron* sp.), begonias (por ejemplo, *Begonia* sp.), campanula, buganvilla, cactus (por ejemplo, *Cactaceae schumbergera truncata*), camelia, clavel (por ejemplo, *Dianthus caryophyllus*), crisantemos (por ejemplo, *Chrysanthemum* sp.), clemátide (por ejemplo, *Clematis* sp.), cresta de gallo, colombinas, ciclamen (por ejemplo, *Cyclamen* sp.), narcisos (por ejemplo, *Narcissus* sp.), falso ciprés, freesia (por ejemplo, *Freesia refracta*), geranios, gerbera, gladiolos (por ejemplo, *Gladiolus* sp.), acebo, hibiscus (por ejemplo, *Hibiscus rosasanensis*), hortensia (por ejemplo, *Macrophylla hydrangea*), enebro, lirios (por ejemplo, *Lilium* sp.), magnolia, minirosas, orquídeas (por ejemplo, miembros de la familia *Orchidaceae*), petunias (por ejemplo, *Petunia hybrida*), flor de Pascua (por ejemplo, *Euphorbia pulcherima*), primaveras, rododendro, rosas (por ejemplo, *Rosa* sp.), Antirrhinum (por ejemplo, *Antirrhinum* sp.), arbustos, árboles tales como forestales (árboles de hojas anchas y perennifolios, tales como las coníferas) y tulipanes (por ejemplo, *Tulipa* sp.).

50 El término "parte de la planta", como se usa en la presente, incluye referencia a, pero sin limitaciones, células individuales y tejidos a partir de microsporas, polen, óvulos, hojas, embriones, raíces, puntas de raíces, anteras, flores, frutos, semillas, tallos, brotes, vástagos, rizomas, protoplastos, callos, tejidos meristemáticos y similares.

55 El término "planta de cultivo", como se usa en la presente, se refiere a una planta que se cosecha o proporciona un producto cosechable.

60 Los términos "plántula" y "plantón", como se usan en la presente, son intercambiables y se refieren a la planta juvenil cultivada a partir de un brote, embrión o una semilla en germinación y generalmente incluyen cualquier planta pequeña que muestre cotiledones verdes bien desarrollados y alargamiento de las raíces y que se propagan antes de trasplantarlas en la ubicación final en donde van a madurar.

El término "cultivo de tejidos", como se usa en la presente, se refiere a un cultivo de células vegetales en donde las células se propagan en un medio nutriente en condiciones controladas.

65 Un "aumento significativo" es un aumento que es más grande que el margen de error inherente a la técnica de medición, preferentemente un aumento de aproximadamente 10 %-50 %, o incluso de 2 veces o más.

"Significativamente menor" significa que la disminución es mayor que el margen de error inherente a la técnica de medición, preferentemente una disminución de aproximadamente 2 veces o más.

5 El término "endógeno" como en "producido endógenamente" se refiere a que se produce dentro de la planta (célula).

El término "área de producción", como se usa en la presente, se refiere a un lugar donde las plantas se cultivan y donde los productos en la forma de plantas o partes de las plantas se producen para la cosecha. El tamaño del área de producción se expresa generalmente en metros cuadrados o acres de tierra. Un área de producción puede ser un campo abierto o un invernadero.

El término "producción de biomasa", como se usa en la presente, se refiere a la producción de material orgánico derivado de plantas.

15 El término "contenido de materia seca", como se usa en la presente, se refiere a la fracción de masa (%) que queda después que la fracción de agua (%) se ha eliminado mediante secado.

Secuencias de ADN para la transformación

20 Virtualmente cualquier composición de ADN puede usarse para administrar a las células vegetales receptoras, para producir finalmente plantas transgénicas fértiles de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, pueden emplearse segmentos de ADN en la forma de vectores y plásmidos, o fragmentos de ADN lineales, en algunos casos que contienen solo el elemento de ADN a expresar en la planta, y similares. La construcción de vectores que pueden emplearse junto con la presente invención será conocida para los expertos en la técnica a la luz de la presente descripción (véase, por ejemplo, Sambrook et al., 1989; Gelvin et al., 1990). Los vectores, que incluyen plásmidos, cósmidos, YAC (cromosomas artificiales de levadura), BAC (cromosomas artificiales bacterianos) y segmentos de ADN para usar en la transformación de células, de acuerdo con la presente invención comprenderán, por supuesto, el ADNc, gen o genes necesarios para la producción de isopreno en el transformante.

30 El vector de la invención puede introducirse en cualquier planta. Los genes y secuencias a introducir pueden usarse convenientemente en casetes de expresión para la introducción y expresión en cualquier planta de interés. Dichos casetes de expresión comprenderán una región de iniciación de la transcripción (un promotor) unida al gen que codifica el gen de la isopreno sintasa de interés. Un casete de expresión de este tipo se proporciona preferentemente con una pluralidad de sitios de restricción para la inserción del gen de interés para que esté bajo la regulación transcripcional de las regiones reguladoras, tal como el promotor designado. El casete de expresión puede contener adicionalmente genes de marcadores de selección adecuados para el organismo huésped en particular.

35 El casete de transcripción incluirá en la dirección 5' a 3' de la transcripción, las regiones de iniciación de la transcripción y la traducción, una secuencia de ADN de interés, y regiones de terminación de la transcripción y la traducción funcionales en plantas.

La región de terminación puede ser nativa con la región de iniciación de la transcripción, puede ser nativa con la secuencia de ADN de interés, o puede derivarse de otra fuente.

45 Regiones de terminación convenientes están disponibles del plásmido Ti de *A. tumefaciens*, tal como las regiones de terminación de la octopina sintasa y nopalina sintasa. Véase además, Guerineau et al. (1991) Mol. Gen. Genet. 262: 141-144; Proudfoot (1991) Cell 64: 671- 674; Sanfacon et al. (1991) Genes Dev. 5: 141-149; Mogen et al. (1990) Plant Cell 2: 1261-1272; Munroe et al. (1990) Gene 91: 151-158; Ballas et al. (1989) Nucleic Acids Res. 17: 7891-7903; Joshi et al. (1987) Nucleic Acid Res. 15: 9627-9639.

50 En la técnica se describen metodologías para la obtención de construcciones de transformación en plantas.

En una modalidad de la invención, las plantas se transforman con el nucleótido que codifica bZIP19 o bZIP23. Estos genes pueden derivarse de *Arabidopsis*. Alternativamente, pueden usarse ortólogos de bZIP19 y bZIP23, tales como los de *Populus trichocarpa* (PtrbZIP38 o XM_002305485.1 y PtrbZIP39 o XM_002313671.1); arroz (OsbZIP48 o AK071639.1), *Helianthus annuus* (CD852649.1), *Medicago truncatula* (TA25329_3880), *Solanum tuberosum* (TA33339_3880), *Glycine max* (TA50226_3847; TA50224_3847), *Sorghum bicolor* (TA23717_4558), *Zea mays* (TA111061_4577; TA111059_4577; CO451643), u *Hordeum vulgare* (TA45897_4513).

60 Los métodos para la transformación de plantas con una construcción que codifica la proteína bZIP19 o la bZIP23 ya se conocían a partir del documento US 2007/0022495 (Mendel Biotechnology), pero este documento no dice nada sobre el efecto que tal transformación produciría.

65 Las secuencias de aminoácidos de las proteínas de *Arabidopsis* se proporcionan en la Figura 1, los genes para estas proteínas pueden encontrarse en las bases de datos de genes con núm. de acceso At4g35040 o NM_119670.4 (bZIP19) y At2g16770 o NM_119670.4 (bZIP23). Las secuencias se listan además como la sec. con núm. de ident.: 2 y

la sec. con núm. de ident.: 1, respectivamente. Todas las proteínas bZIP contienen un dominio básico característico y muy conservado, que se une al ADN, y un motivo de dimerización con cremallera de leucina. Las bZIP pueden formar homo y/o heterodímeros, que se unen al ADN de una manera específica de la secuencia y son capaces de unirse a secuencias objetivo palindrómicas cortas o pseudo-palindrómicas (Fyjii., Y. et al., 2000, Nature 7:889-893). Las bZIP de plantas son importantes para la regulación de la defensa contra patógenos, señalización ambiental y desarrollo, pero hasta el momento no se les ha asignado una función a aproximadamente dos tercios de los miembros bZIP (Hakoby, M. et al., 2002, Trends Plant Sci. 7:106-111). Entre estos están los genes de *bZIP19* y *bZIP23*. Estos pertenecen al grupo F, uno de los diez grupos en los que se divide esta familia. Este grupo contiene un tercer miembro, *bZIP24*, no identificado en el ensayo de un híbrido en levadura. Las secuencias predichas de las proteínas bZIP19 y bZIP23 comparten un 69 % de identidad de la secuencia de aminoácidos y solo 28 y 32 %, respectivamente, con bZIP24. Los tres miembros del grupo F contienen dos motivos ricos en histidina característicos (fig. 1).

Como puede observarse, bZIP19 y bZIP23 comparten el dominio de bZIP en el aminoácido 79-110 (bZIP23) y el aminoácido 94-125 (bZIP19) y dos motivos ricos en histidina en el aminoácido 36-48 y 51-60 (bZIP23) y el aminoácido 44-56 y 59-68 (bZIP19).

Aunque es posible obtener una sobreexpresión de bZIP19 o bZIP23 en una planta al proporcionar a dicha planta con las secuencias de nucleótidos mencionadas anteriormente, una modalidad preferida de la invención es una planta en la cual se sobreexpresan ambas proteínas. Como se ejemplifica en la parte experimental, los genes actúan de manera redundante, y *bZIP19* solo es parcialmente redundante. Los factores de transcripción de bZIP generalmente actúan como dímeros. Su redundancia sugiere que *bZIP19* y *bZIP23* actúan como homo(di)meros, en línea con predicciones anteriores (Deppmann, C.D. et al., 2006, Mol. Biol. Evol. 23:1480-1492).

La sobreexpresión de bZIP19 y/o bZIP23 pueden lograrse mediante inserción de una o más de una copia extra del gen seleccionado. No es desconocido que las plantas o su progenie, originalmente transformadas con una o más copias adicionales de una secuencia de nucleótidos exhiben sobreexpresión.

Obtener suficientes niveles de la expresión de transgenes en los tejidos vegetales adecuados es un aspecto importante en la producción de cultivos modificados genéticamente. La expresión de secuencias de ADN heterólogas en una planta huésped es dependiente de la presencia de un promotor unido operativamente que sea funcional dentro de la planta huésped. La elección de la secuencia promotora determinará cuándo y dónde dentro del organismo se expresa la secuencia de ADN heteróloga. Las proteínas de la presente invención se expresan preferentemente en las raíces, donde el Zn es absorbido del suelo y transportado, y en otras células de la planta que actualmente están implicadas en el transporte y la acumulación de zinc. El experto en la técnica conoce bien dichos promotores específicos de la raíz y pueden escogerse del de RoID, RPL16A, Tub-1, ARSK1, PsMT_a (WO97/20057), y promotor de Atao1 (Moller, S.G. y McPherson, M.J., 1998, The Plant J., 13:781-791), el promotor de AAP6 (Okumoto, S. et al., 2002, J. Biol. Chem. 277:54338-54346), el promotor de RB7 de tabaco (Yamamoto, Y.T. et al., 1991, Plant Cell 3:371-382.), el promotor de ADH de *Arabidopsis* (McKendree, W.L. et al., 1992, Plant Mol Biol. 19:859-862), el promotor de PHT1 de *Arabidopsis* (Koyama, T. et al., 2004, J. Biosci. Bioeng. 99:38-42), el promotor de pyk10 de *Arabidopsis* (Nitz, I. et al., 2001, Plant Sci. 161:337-346), el promotor del gen de la peroxidasa (prxEa) de *Arabidopsis* (Wanapu y Shinmyo, 1996, Ann N. Y. Acad. Sci. 782: 107-114), el promotor de SIREO de tomate (Jones, M.O. et al., 2008, Funct. Plant Biol. 35:1224-1233), el promotor de MsPRP2 de la alfalfa (Winicov, I. et al.), los promotores de ZRP3 y ZRP4 del arroz (ref?), los promotores de RCc2 y RCc3 del maíz (ref?), el promotor de FaRB7 de la fresa (Vaughan, S.P. et al., 2006, J. Exp. Botany doi: 10.1093/jxb/erl185) los promotores según se describen en los documentos US 5,459,252, US 5,837,876, WO 97/005261, WO 2001/53502, WO2001/044454, WO 2006/024291 y WO 2006/022467. Alternativamente, pueden usarse promotores de genes que normalmente están controlados en su expresión por bZIP19 o bZIP23, por ejemplo, los mencionados en la Tabla 3. Se considera que estos promotores se prefieren especialmente ya que se expresan en las células donde normalmente actúan las proteínas y ya que se inducirán por la presencia de Zn y por lo tanto amplificarán la señal de la deficiencia de Zn lo que provoca una respuesta más temprana y particularmente más fuerte.

Aunque se conoce que algunos enfoques transgénicos sí influyen en la adaptación de las plantas a los cambios en las concentraciones de zinc en el ambiente, estos enfoques son todos intentos de hacer que las plantas sean transgénicas para proteínas transportadoras de zinc (tales como ZAT, véase van der Zaal, B.J., 1999, Plant Physiol. 119:1047-1055; AtHMA4, véase Verret, F. et al., 2004, FEBS Lett 576:306-312; y NAS, véase Takahashi, M. et al., 2003, Plant Cell 15:1263-1280). La presente invención intenta interferir con la regulación, absorción, transporte y almacenamiento de zinc en la planta, mediante la modulación de la expresión de genes que son reguladores, entre otros, de estas proteínas de transporte. Por lo tanto, la invención interfiere a un nivel más basal, que tiene la ventaja que existe menos influencia por los mecanismos de retroalimentación y otros procesos reguladores implicados en el procesamiento de zinc.

Aunque en la parte experimental se demuestra que bZIP19 y bZIP23 juegan un papel principal en el control de la adaptación a los cambios en el contenido de zinc del suelo y aunque transformar las plantas con alguna o ambas de esas proteínas volvería a las plantas capaces de adaptarse a la deficiencia de Zn o actuar como (hiper)acumuladores de Zn, estas propiedades pueden aumentarse mediante la sobreexpresión de proteínas adicionales que se conoce que participan en la homeostasis del Zn. Estas proteínas se escogen preferentemente de transportadores de metales pesados, preferentemente proteínas HMA2, HMA3 o HMA4, proteínas YSL, preferentemente YSL, preferentemente

YSL1 o YSL3, ZIP o IRT, proteínas ZIF, proteínas NAS, proteínas MRP, FRD3 y MTP (proteínas transportadoras de metales).

5 Como puede observarse en esta Tabla, los genes que codifican estas proteínas están disponibles para el experto en la técnica y la transformación de las secuencias que codifican estos genes puede realizarse de acuerdo con los métodos como se describen en la presente.

Tabla A. Proteínas implicadas en la absorción, transporte y almacenamiento de Zn

Nombre	Descripción	Núm. de Acc. del gen	Núm. de Acc. de la proteína
HMA2	ATPasa transportadora de cadmio	NM_ 119157.3	NP_ 194740.1
HMA3	transportador de metales pesados de Zn/Cd potencial	AY434729.1	AAR10768.1
HMA4	transportador transmembrana de iones de cadmio/ATPasa transportadora de cadmio/transportador transmembrana de iones de zinc	NM_ 127468.4	NP_ 179501.1
YSL1	Transportador de oligopéptidos	NM_ 118544.3	NP_ 567694.2
YSL2	Transportador de oligopéptidos	NM_ 122346.3	NP_ 197826.2
YSL3	Transportador de oligopéptidos	NM_ 124735.2	NP_ 200167.2
ZIP1	Transportador transmembrana de iones de zinc	NM_ 112111.3	NP_ 187881.1
ZIP2	Transportador transmembrana de iones de zinc	NM_ 125344.2	NP_ 200760.1
ZIP3	Transportador transmembrana de iones de zinc	NM_ 128786.3	NP_ 180786.1
ZIP4	Transportador transmembrana de iones de cobre	NM_ 100972.4	NP_ 172566.2
ZIP5	Transportador transmembrana de iones metálicos	NM_ 202033.1	NP_ 973762.1
ZIP6	Transportador transmembrana de iones metálicos	NM_ 128563.1	NP_ 180569.1
ZIP7	Transportador transmembrana de iones metálicos	NM_ 126440.2	NP_ 178488.1
ZIP8	Transportador transmembrana de iones de zinc	NM_ 001161290. 1	NP_ 001154762.1
ZIP9	Transportador transmembrana de iones de zinc	NM_ 119456.1	NP_ 195028.1
ZIP10	Transportador transmembrana de iones de zinc	NM_ 102864.2	NP_ 174411.2
ZIP11	Transportador transmembrana de iones metálicos	NM_ 104468.2	NP_ 564703.1
ZIP12	Transportador transmembrana de iones de zinc	NM_ 125609.1	NP_ 201022.1
IRT3	Transportador transmembrana de iones metálicos	NM_ 104776.4	NP_ 564766.1
ZIF1	Transportador transmembrana de carbohidratos	NM_ 121377.4	NP_ 196878.2
NAS1	nicotianamina sintasa	NM_ 120577.3	NP_ 196114.1
NAS2	nicotianamina sintasa	NM_ 124990.1	NP_ 200419.1
NAS3	nicotianamina sintasa	NM_ 100794.3	NP_ 172395.1
NAS4	nicotianamina sintasa	NM_ 104521.2	NP_ 176038.1
MRP3	ATPasa exportadora de glutatión S-conjugado	NM_ 112147.2	NP_ 187915.1
FRD3	antiproteo/transportador	NM_ 111683.1	NP_ 187461.1
MTP1	Transportador transmembrana de iones de zinc	NM_ 180128.2	NP_ 850459.1
MTP2		NM_ 116059.2	NP_ 191753.1
MTP3	transportador transmembrana de iones de zinc	NM_ 115743.3	NP_ 191440.2
MTP8	proteína de tolerancia a metales	NM_ 115668.2	NP_ 191365.2

10 La (sobre)expresión de bZIP19 y/o bZIP23 en plantas junto con una o más de las proteínas mencionadas anteriormente produciría plantas que serían capaces de absorber más zinc que una planta de tipo silvestre normal o de responder más rápido a deficiencias locales en el suministro de zinc. Por estas características, tales plantas serían muy adecuadas para crecer en un suelo con alto contenido de zinc y por lo tanto serían capaces de actuar como fitorremediadores,

limpiando el suelo de un metal tóxico, o serían capaces de crecer en suelo con un contenido de zinc normal o bajo, pero aún tienen cantidades de zinc dietéticamente suficientes en sus partes comestibles, o serían menos sensibles a las deficiencias de zinc.

5 Los vectores para usar en la transformación de genes de manera específica de tejidos en plantas transgénicas típicamente incluirán promotores específicos de tejidos y pueden incluir además otros elementos de control específicos de tejidos tales como secuencias potenciadoras.

10 Adicionalmente, los vectores pueden construirse y emplearse en el direccionamiento intracelular de un producto génico específico dentro de las células de una planta transgénica. Esto se logrará generalmente mediante la unión de una secuencia de ADN que codifica una secuencia peptídica señal o de tránsito a la secuencia codificante de un gen en particular. El péptido resultante de tránsito, o señal, transportará la proteína a un destino intracelular, o extracelular particular, respectivamente, y después se eliminará postraduccionalmente. Los péptidos de tránsito o señal actúan al facilitar el transporte de las proteínas a través de las membranas intracelulares, por ejemplo, membranas de las vacuolas, vesículas, plástidos y mitocondrias, mientras que los péptidos señal dirigen las proteínas a través de la membrana extracelular.

20 Un ejemplo particular de dicho uso se refiere a la dirección de una proteína (enzima) a un organelo en particular tal como la vacuola en lugar del citoplasma. Los péptidos señal de proteínas vacuolares, tales como el propéptido N-terminal (NTPP) de sporamina de la papa dulce y el propéptido C-terminal (CTPP) de quitinasa de tabaco pueden usarse para dirigir la expresión de una proteína a la vacuola.

25 Al facilitar el transporte de la proteína hacia los compartimentos dentro de la célula, estos péptidos de tránsito pueden aumentar la acumulación de producto génico mediante la protección de la degradación proteolítica.

Producción y caracterización de plantas transformadas establemente

30 Las especies de plantas pueden transformarse por ejemplo mediante la transformación mediada por ADN de los protoplastos de la célula vegetal y posterior regeneración de la planta a partir de los protoplastos transformados de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica.

35 Cualquier tejido vegetal capaz de una propagación clonal posterior, mediante organogénesis o embriogénesis, puede transformarse con un vector de la presente invención. El término "organogénesis", como se usa en la presente, se refiere a un proceso mediante el cual se desarrollan brotes y raíces secuencialmente a partir de centros meristemáticos; el término "embriogénesis", como se usa en la presente, se refiere a un proceso mediante el cual los brotes y raíces se desarrollan en conjunto de una manera concertada (no secuencialmente), a partir de células somáticas o gametos. El tejido en particular escogido variará en dependencia de los sistemas de propagación clonal disponibles, y más adecuados, para la especie en particular que se transforma. Los objetivos tisulares ilustrativos incluyen discos foliares, polen, embriones, cotiledones, hipocótilos, megagametofitos, tejido caloso, tejido meristemático existente (por ejemplo, meristemas apicales, yemas axilares, y meristemas radiculares), y tejido meristemático inducido (por ejemplo, meristemo de cotiledón y meristemo utililane).

45 Las plantas de la presente invención pueden tener una variedad de formas. Las plantas pueden ser quimeras de células transformadas y células no transformadas; las plantas pueden ser transformantes clonales (por ejemplo, todas las células se transforman para contener el casete de expresión); las plantas pueden comprender injertos de tejidos transformados y no transformados (por ejemplo, un material de raíz transformado injertado en un vástago no transformado en especies de cítricos). Las plantas transformadas pueden propagarse mediante una variedad de medios, tales como mediante propagación clonal o técnicas de reproducción clásicas. Por ejemplo, las plantas transformadas de la primera generación (o T1) pueden autofecundarse para producir plantas transformadas homocigotas de segunda generación (o T2), y las plantas T2 se propagan adicionalmente mediante técnicas de reproducción clásicas. Un marcador de selección dominante (tal como npt II) puede asociarse con el casete de expresión para asistir en la reproducción.

55 Por lo tanto, la presente invención proporciona una célula vegetal transformada (transgénica), in planta o ex planta, que incluye un plástido u otro organelo transformado, por ejemplo, núcleo, mitocondria o cloroplasto.

60 La transformación de plantas puede llevarse a cabo con una sola molécula de ADN o múltiples moléculas de ADN (es decir, co-transformación), y ambas técnicas son adecuadas para usar con los casetes de expresión de la presente invención. Muchos vectores de transformación están disponibles para la transformación de plantas, y los casetes de expresión de esta invención pueden usarse junto con cualquiera de esos vectores. La selección del vector dependerá de la técnica de transformación preferida y la especie objetivo para la transformación.

65 Los métodos adecuados para transformar células vegetales incluyen, pero no se limitan a, microinyección (Crossway et al., 1986), electroporación (Riggs et al., 1986), transformación mediada por *Agrobacterium* (Hinchee et al., 1988), transferencia directa de genes (Paszowski et al., 1984), y aceleración de partículas balísticas mediante el uso de dispositivos disponibles de Agracetus, Inc., Madison, Wis. And BioRad, Hercules, Calif. (véase, por ejemplo, Sanford et

al., patente de Estados Unidos núm. 4,945,050; y McCabe et al., 1988). Además véase, Weissinger et al., 1988; Sanford et al., 1987 (cebolla); Christou et al., 1988 (soja); McCabe et al., 1988 (soja); Datta et al., 1990 (arroz); Klein et al., 1988 (maíz); Klein et al., 1988 (maíz); Klein et al., 1988 (maíz); Fromm et al., 1990 (maíz); y Gordon-Kamm et al., 1990 (maíz); Svab et al., 1990 (cloroplasto de tabaco); Koziel et al., 1993 (maíz); Shimamoto et al., 1989 (arroz); Christou et al., 1991 (arroz); solicitud de patente europea EP 0 332 581 (pasto de huerta y otras Pooideae); Vasil et al., 1993 (trigo); Weeks et al., 1993 (trigo). En una modalidad, se emplea el método de transformación de protoplastos para maíz (solicitud de patente europea EP 0 292 435, patente de Estados Unidos. núm. 5,350,689).

Se prefiere usar particularmente los vectores de tipo binario de los plásmidos Ti y Ri de *Agrobacterium* spp. Los vectores derivados de Ti transforman una amplia variedad de plantas superiores, que incluyen plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas, tales como soja, algodón, colza, tabaco y arroz (Pacciotti et al., 1985; Byrne et al., 1987; Sukhapinda et al., 1987; Park et al., 1985; Hiei et al., 1994). El uso de T-ADN para transformar células vegetales ha recibido un extenso estudio y se describe ampliamente (EP 120516; Hoekema, 1985; Knauf, et al., 1983; y An et al., 1985). Para la introducción en plantas, los genes quiméricos de la invención pueden insertarse en vectores binarios como se describe en los ejemplos.

Otros métodos de transformación están disponibles para los expertos en la técnica, tal como la captación directa de construcciones de ADN foráneo (véase EP 0295959), técnicas de electroporación (Fromm et al., 1986) o bombardeo balístico a alta velocidad con partículas metálicas recubiertas con las construcciones de ácido nucleico (Kline et al., 1987, y patente de Estados Unidos núm. 4,945,050). Una vez transformadas, los expertos en la técnica pueden regenerar las células. De particular importancia son los métodos para transformar genes foráneos en cultivos comercialmente importantes, tales como colza (De Block et al., 1989), girasol (Everett et al., 1987), soja (McCabe et al., 1988; Hinchee et al., 1988; Chee et al., 1989; Christou et al., 1989; EP 301749), arroz (Hiei et al., 1994), y maíz (Gordon Kamm et al., 1990; Fromm et al., 1990).

Los expertos en la técnica apreciarán que la elección del método podría depender del tipo de planta, es decir, monocotiledónea o dicotiledónea.

Las células de *Agrobacterium tumefaciens* que contienen un vector que comprende un casete de expresión de la presente invención, en donde el vector comprende un plásmido Ti, son útiles en métodos para la obtención de plantas transformadas. Las células vegetales se infectan con un *Agrobacterium tumefaciens* como se describió anteriormente para producir una célula vegetal transformada, y después se regenera una planta a partir de la célula vegetal transformada. Se conocen numerosos sistemas de vectores de *Agrobacterium* útiles para llevar a cabo la presente invención. Estos portan típicamente al menos una secuencia borde de T-ADN e incluyen vectores tales como pBIN19 (Bevan, 1984).

Los métodos que usan una forma de transferencia directa de genes o transferencia mediada por *Agrobacterium* usualmente, pero no necesariamente, se llevan a cabo con un marcador de selección que puede proporcionar resistencia a un antibiótico (por ejemplo, kanamicina, higromicina o metotrexato) o un herbicida (por ejemplo, fosfinotricina). La elección del marcador de selección para la transformación de plantas, sin embargo, no es crítica para la invención.

Los métodos generales para cultivar tejidos vegetales se proporcionan por ejemplo por Maki et al., (1993); y por Phillips et al. (1988).

Después de la transformación las células vegetales transgénicas se colocan en un medio selectivo adecuado para la selección de células transgénicas que después se cultivan hasta callos. Los brotes se cultivan a partir de los callos y las plántulas se generan a partir del brote mediante el cultivo en medio de enraizamiento. El marcador particular usado permitirá la selección de las células transformadas en comparación con células que carecen del ADN que se ha introducido.

Para confirmar la presencia de los transgenes en las células y plantas transgénicas, puede realizarse una variedad de ensayos. Dichos ensayos incluyen, por ejemplo, ensayos "biológicos moleculares" bien conocidos por los expertos en la técnica, tales como transferencia Southern y Northern, hibridación in situ y métodos de amplificación basados en ácido nucleico tales como PCR o RT-PCR; ensayos "bioquímicos", tales como detectar la presencia de un producto proteico, por ejemplo, mediante medios inmunológicos (ELISA y transferencias Western) o mediante función enzimática.

La invención describe además una planta transgénica transformada con una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína bZIP19 o una bZIP23 o ambas. Adicionalmente, dicha planta puede ser transgénica para una proteína seleccionada del grupo que consiste en transportadores de metales pesados, preferentemente proteínas HMA2, HMA3 o HMA4, proteínas YSL, preferentemente YSL, preferentemente YSL1 o YSL3, ZIP o IRT, proteínas ZIF, proteínas NAS, proteínas MRP, FRD3 y MTP.

Como se mostrará en los Ejemplos, las plantas transgénicas de acuerdo con la invención son tolerantes a una deficiencia de Zn, es decir son capaces de adaptarse a situaciones ambientales en las cuales hay muy poco o ningún contenido de zinc en el sustrato sobre el que se cultiva la planta. Otra ventaja de las plantas transgénicas de la presente

invención es que son capaces de acumular Zn. Esto no es solo una ventaja para la biorremediación, sino en casos de plantas donde el Zn se almacena en partes comestibles (tales como hojas, raíces, remolachas, bayas o tubérculos) las plantas serán adecuadas para dietas en áreas donde la concentración de Zn en el alimento es insuficiente en la dieta normal. Este uso se conoce además con el nombre de 'biofortificación'. Normalmente el Zn en la planta estará menos biodisponible porque parte de éste forma complejos con fitato o polifenoles. Por lo tanto, preferentemente, las plantas usadas en este sentido son plantas que comprenden bajos niveles de fitato o y/o polifenoles.

Por otra parte, las plantas transgénicas de la invención son muy útiles en circunstancias donde existe un exceso de zinc en el sustrato. Las plantas transgénicas de las invenciones son capaces de absorber el metal y almacenarlo en sus tejidos y/o vacuolas. De esta manera, las plantas pueden usarse como plantas de saneamiento para extraer zinc del suelo. Por lo tanto, el metal se concentrará en la biomasa vegetal, que puede cosecharse y eliminarse de una manera conveniente. Este método, conocido como fitorremediación, es especialmente útil para grandes áreas de suelo contaminadas con zinc (como es el caso en las cercanías de las minas de zinc). En dicho caso, la fitorremediación es una manera comercialmente muy atractiva para limpiar el metal en exceso de los alrededores.

Otra parte de la invención es el uso de una proteína bZIP19 y/o una bZIP23 o un ortólogo de estas, o una secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína u ortólogo de este tipo, en donde los ortólogos han retenido la función de bZIP19 o bZIP23 y tienen una secuencia de aminoácidos que es idéntica en un 90 % o más a la de bZIP19 o bZIP23 en los métodos de la invención descritos anteriormente, y/o para producir una planta como se describió anteriormente y una progenie de esta.

Los siguientes Ejemplos sirven para ilustrar adicionalmente la invención, y no están destinados para definir limitaciones o restringir el alcance de la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Materiales y métodos

Cultivo de plantas

En todos los experimentos se usó *Arabidopsis* ecotipo Columbia (Col-0). Las plantas se cultivaron en cámaras climatizadas con 16 h de luz a 22 °C, 8 h a 20 °C, 120 μmol fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 50 % de humedad relativa. Antes de la germinación, las semillas tuvieron un tratamiento de estratificación de 3 días en una habitación fría a 4 °C en la oscuridad para promover una germinación uniforme. Para el análisis genético y la transformación, las plantas se cultivaron en macetas con turba. Para el ensayo basado en placas, se esterilizó la superficie de las semillas mediante el uso de esterilización de semillas en fase de vapor y se sembraron en placas con medio MS (Duchefa Biochemie, Haarlem, Holanda) suplementado con sacarosa al 1 % y ajustado a pH 5.8. El medio MS se preparó sin zinc (Zn-), con 30 μM de ZnSO_4 (Zn+) o con 300 μM de ZnSO_4 (Zn++). Para las plantas cultivadas en hidropónico, las semillas se sembraron en tubos llenos con agar al 0.55 % y se cultivaron en una solución nutritiva de Hoagland modificada de media potencia preparada con 0.05 μM (Zn-), 2 μM de ZnSO_4 (Zn+), o 25 μM de ZnSO_4 (Zn++). El sistema hidropónico consistió de recipientes con capacidad de 8 litros (46 x 31 x 8 cm), con una tapa de plástico gruesa no traslúcida de 3 mm con orificios para colocar los 9x5 tubos llenos con agar. La solución nutritiva se reemplazó una vez en la primera semana y dos veces en las semanas después de eso.

Experimento de complementación en levadura

Un clon de ADNc de longitud completa de 1.3 kb correspondiente a *AtZIP4* (APD09D10R, número de acceso del Genebank AV524735) fue proporcionado amablemente por Kazuza ADN Research Institute (Kisarazu, Chiba, Japón). El marco abierto de lectura de *ZIP4* se amplificó con una ADN polimerasa con corrección de errores (Pfu nativa; Stratagene, La Jolla, CA, Estados Unidos), con condiciones de PCR según recomienda el fabricante, y mediante el uso de los cebadores 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAACTCTTGTCCCATGATC-3' y 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATATTGATTCTACAG-3' que contienen sitios de recombinación Gateway (subrayados). El fragmento se clonó en el vector de entrada pDONR207 (Invitrogen) mediante recombinación dirigida a un sitio *in vitro* para una recombinación posterior en el vector de expresión de levadura pFL613 (20). El codón de iniciación ATG del ADNc de *ZIP4* clonado estaba en marco con el codón de iniciación ATG de pFL613 y sin codones de parada hacia el extremo 5'. La construcción se verificó mediante secuenciación.

Se usaron un mutante *zrt1zrt2* de *Saccharomyces cerevisiae*, ZHY3, y su cepa parental de tipo silvestre DY1457 (6). Las células de levadura se cultivaron en medio líquido definido sintético (SD) suplementado con requerimientos auxotróficos y glucosa al 2 % (p/v). Ambas cepas de levadura se transformaron con el vector vacío pFL613, y *zrt1zrt2* se transformó con pFL613 que contiene *AtZIP4*, mediante el uso de un procedimiento de transformación estándar en levadura (21). La complementación de *zrt1zrt2* se analizó mediante un ensayo de rociado de gotas, rociando cultivos diluidos de una sola colonia de cada transformante en placas de agar con SD-URA selectivo. El medio se produjo limitado en zinc mediante la adición de EDTA (1 mM) y citrato (pH 4.2) (22) y suplementado con 0.4 (medio limitado en zinc) o 0.8 mM de ZnCl_2 . Se analizaron cinco colonias de cada transformante. La complementación de *zrt1zrt2* se analizó además mediante la medición de la OD₆₀₀ en cultivos de 5 ml de medio SD-URA descrito con 0.4 mM de ZnCl_2 inoculado con 60 μl (0.8 mM

de ZnCl₂) de precultivo de una sola colonia durante la noche a OD₆₀₀=1. Se realizaron tres experimentos independientes.

Construcción de vectores reporteros para el ensayo de un híbrido en levadura

5 La secuencia cebo en seis vectores reporteros (nombrados A al F) eran fragmentos amplificados por PCR del promotor de *ZIP4*. Estos fragmentos cubrían el promotor completo, comenzando -1049 pb hacia el extremo 5' del codón de iniciación y tenían una superposición entre fragmentos de 60 a 80 pb. Los fragmentos se amplificaron a partir de ADN genómico de *Arabidopsis* mediante el uso de polimerasa con corrección de errores (Pfu nativa; Stratagene, La Jolla, CA, Estados Unidos), con condiciones de PCR según recomienda el fabricante, y mediante el uso de cebadores con salientes en 5' compatibles con *EcoRI/SacI* (tabla 1). Los fragmentos se clonaron de manera intermedia en el vector pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. El vector TOPO con cada uno de los cebos se digirió con *EcoRI/SacI* y el fragmento de cebo se extrajo a partir del gel de agarosa (Qiagen Gel Extraction kit). El cebo del vector reportero G consistió de un trímero del siguiente motivo: ATGTCGACAT/C. Se sintetizaron dos oligonucleótidos antiparalelos, uno que representa la cadena sentido y el otro su cadena complementaria antisentido, y que contienen salientes en 5' compatibles con *EcoRI/SacI* (tabla 1).

Tabla 1. Cebadores directos e inversos usados para amplificar los fragmentos de cebo A-F del promotor de *ZIP4*, y las cadenas complementarias sentido y antisentido usadas para sintetizar las tres repeticiones en tándem del motivo ATGTCGACAT/C (G), para usar como fragmento de cebo G.

Fragmento		Secuencia del cebador
A	Directo	5'-GAATTC AAGCTTTGGAAAGTGAAGTGG A-3'
	Inverso	5'-GAGCTCCAATTTCAAACCAAGTA-3'
B	Directo	5'-GAATTC TGTATATCTGATCTTCTCTGCTG-3'
	Inverso	5'-GAGCTCAAGCTAAAAGGACGGTAACT-3'
C	Directo	5'-GAATTC TTCATCCTATTGCTTGG-3'
	Inverso	5'-GAGCTCATTTTCCCATTTGTTCCAC-3'
D	Directo	5'-GAATTC TCTGCAGTAGACTTGAC-3'
	Inverso	5'-GAGCTCCCCAATCTTGTCTAT-3'
E	Directo	5'-ATCGGAATTCGTGAGAAAACAGAATAACGC-3'
	Inverso	5'-GAGCTCCCATGGGAACAAGAGTTTAT-3'
F	Directo	5'-A TCGGAA TTCGTGAGAAAACAGAA T AACGC-3'
	Inverso	5'-CGTAGAGCTCTGGAGAAAGAGTGAAAGAGT-3'
G	Directo	5'-AATTCATGTCGACATATGTCGACATATGTCGACACGAGCT-3'
	Inverso	5'-CGTGTGTCGACATATGTCGACATATGTCGACATG-3'

25 Se mezcló 0.1 µg de cada cadena de oligonucleótido en 10 µl de NaCl 50 mM, se hibridaron mediante calentamiento a 70 °C durante 5 min, y se enfrió lentamente hasta la temperatura ambiente. Los cebos derivados por PCR y digeridos (A a F) y el oligonucleótido hibridado (G), se clonaron en pHis, previamente digerido con *EcoRI/SacI* de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Cada vector reportero se confirmó mediante análisis por digestión y secuenciación.

30 Tamizaje del híbrido de levadura

35 La genoteca de expresión de ADNc se construyó con ARNm a partir de la inflorescencia de *Arabidopsis* que se obtuvo mediante el uso de un kit de purificación de ARNm (Amersham Bioscience). Posteriormente, una genoteca de entrada de ADNc compatible con Gateway se construyó con el uso del kit de Construcción de genotecas de ADNc de CloneMiner (Invitrogen, Carlsbad). Esta genoteca de entrada de ADNc tuvo un título de 5 x 10⁷ cfu ml⁻¹ y se transfirió al vector pDEST22 (Invitrogen) por medio de una reacción de recombinación de LR según el protocolo proporcionado por el fabricante, lo que produjo una genoteca de expresión con un título de 2 x 10⁶ cfu ml⁻¹. Los vectores reporteros se introdujeron en la cepa de levadura PJ69-4A (James, P. et al., 1996, Genetics 144:1425-1436). Para este propósito, las células de levadura se transformaron con el vector reportero pHis linealizado y digerido (*XhoI*) mediante el uso de un procedimiento de transformación estándar en levadura (Gietz, R.D. et al., 2002, Meth. Enzymol. 350:87-96). El vector pHis vacío, digerido y no digerido, y un vector reportero no integrativo se usaron como controles. El tamizaje de la genoteca de expresión de ADNc se realizó siguiendo un Protocolo de Transformación en Levadura a Gran Escala (PT3024-1; Clontech) que produjo una eficiencia de transformación de 5 a 9 x 10⁵ cfu µg⁻¹ de ADN. El tamizaje con

todas las cepas reporteras se realizó en medio que carece de His y en la presencia de 3-aminotriazol 20-40 mM (3AT, la concentración óptima se optimizó para cada cepa reportera). En total hubo 18 interacciones positivas (7 con *bZIP19* y 11 con *bZIP23*) cuando se usaron los vectores reporteros E, F y G (Figura 2A). Las colonias positivas se seleccionaron y el clon de ADNc del vector de la genoteca de GAL4-AD se aisló y secuenció.

5

Identificación de mutantes por inserción de T-ADN

10

Las líneas de SALK de T-ADN se obtuvieron del Nottingham Arabidopsis Stock Center (NASC). El T-ADN se insertó 18 pb hacia el extremo 5' del codón de iniciación de *bZIP19* (At4g35040) en *m19* (salk_144252), y 91 pb hacia el extremo 5' del codón de iniciación de *bZIP23* (At2g16770) en *m23* (salk_045200). Los eventos de inserción de T-ADN se confirmaron mediante análisis de PCR con cebadores específicos de genes de LP y RP descritos por el Laboratorio de Análisis Genómico del Instituto Salk y un cebador para el borde de T-ADN LBa1. Se seleccionaron plantas homocigotas para cada inserción de T-ADN. Para obtener un mutante doble por inserción de T-ADN, *m19m23*, la progenie de un cruce entre plantas *m19* y *m23* se seleccionaron mediante análisis de PCR para la homocigosidad de cada inserto de T-ADN.

15

Análisis de RT-PCR cuantitativa

20

Se cosecharon las plántulas de Arabidopsis tipo silvestre (wt), y los mutantes por inserción de T-ADN *m19*, *m23* y *m19m23* cultivadas durante tres semanas en medio MS en condiciones de Zn-, Zn+ o Zn++. Las plántulas de una sola placa, por genotipo y por tratamiento se combinaron (6 a 8 plántulas) y se homogeneizaron en nitrógeno líquido. Para cada genotipo y tratamiento, las plántulas se cosecharon a partir de 3-4 placas diferentes, que representan experimentos independientes. El ARN total de las plántulas se extrajo con un kit de ARN de planta RNeasy (Qiagen) y se trató con DNAsa para eliminar cualquier ADN genómico (Fermentas). Los kits se usaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADNc de primera cadena se sintetizó a partir de 1 µg de ARN total mediante el uso del Kit de síntesis de ADNc iScript™ (Bio-Rad). Los cebadores específicos de genes para la RT-PCR cuantitativa se diseñaron de acuerdo con la información del genoma de base de datos de la secuencia para Arabidopsis y mediante el uso del software Vector NTI (Invitrogen) (tabla 2).

25

30

Tabla 2. Cebadores directos e inversos usados en la RT-PCR cuantitativa para determinar la expresión de transcritos de los genes *ZIP4*, *ZIP1*, *ZIP3*, *ZIP5*, *ZIP9*, *ZIP12*, *IRT3*, *ZIP2*, *bZIP19*, *bZIP23* y *bZIP24*.

Fragmento		Secuencia del cebador
<i>ZIP4</i>	Directo	5'-GATCTTCGTCGATGTTCTTTGG-3'
	Inverso	5'-TGAGAGGTATGGCTACACCAGCAGC-3'
<i>ZIP1</i>	Directo	5'-GGACACACACATGGTTTCGAC-3'
	Inverso	5'-GATAGTGCAGCCATGAGTGG-3'
<i>ZIP3</i>	Directo	5'-CAGAAACATGTTTCTTCTTCGTCAC -3'
	Inverso	5'-CGCAATAAATCCGGTGAACG -3'
<i>ZIP5</i>	Directo	5-CGGGATTGTTGGCGTGAAT-3'
	Inverso	5-CCAAGACCCTCGAAGCATTG-3'
<i>ZIP9</i>	Directo	5'-CAATAATCATAGGAATATCGCTTGG-3'
	Inverso	5-AGAAAGCCATCATGGCAGAT-3'
<i>ZIP12</i>	Directo	5'-CAATGTTGATTGAATCCTTTGC-3'
	Inverso	5'-CCATGAGAATGTCCTTGTGA-3'
<i>IRT3</i>	Directo	5'-ATATGTTGGCGGGTGGCACG-3'
	Inverso	5'-GCTTCCCTCTCTTGCTCCG-3'
<i>ZIP2</i>	Directo	5'-TAATAACAACCACGTCGGAG-3'
	Inverso	5'-AGCAAAGCTGTGTCTCCAAA-3'
<i>bZIP19</i>	Directo	5'-TTCTCCCGGATGAGAGCGATGA-3'
	Inverso	5'-GCTGATTCACCGCCCTAAGCCT-3'
<i>bZIP23</i>	Directo	5'-TAATCAGCTGTTGAAGAGGT-3'
	Inverso	5'-TCATGTATGAGTAAGGCACG-3'

Fragmento		Secuencia del cebador
<i>bZIP24</i>	Directo	5'-TCTCAGGATCAGCAAGAGAA-3'
	Inverso	5'-TCAGTTTCCACCATTTCTTGG-3'

5 Las longitudes de amplicones estuvieron entre 150 y 240 pb y todas las combinaciones de cebadores tuvieron al menos 85 % de eficiencia. La ausencia de ADN genómico se confirmó al realizar un control de no amplificación (sin reacción de transcriptasa inversa) para cada muestra. Para la reacción de PCR, 5 µl de una dilución de 100x del ADNc, correspondiente aproximadamente a 2.5 ng de ARN, se usaron como molde. Además, la reacción contenía 12.5 µl de iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad) y 5 pmol de los cebadores directo e inverso (Invitrogen) en un volumen total de 25 µl. Las reacciones de PCR se realizaron en una placa de 96 pocillos con un ciclador térmico iCycler y un Sistema de PCR en Tiempo Real iCycler iQ (Bio-Rad). Se usó el siguiente perfil térmico estándar: 3 min a 95.0 °C, seguido por 40 ciclos de 15 seg a 95.0 °C y 1 min a 60.0 °C. Se usó ARNr de 18S como un control interno, para normalizar la cantidad de ADNc molde. Las reacciones se realizaron en 3-4 réplicas biológicas y 2-6 réplicas técnicas por réplica biológica para cada genotipo x tratamiento. Los niveles relativos de transcritos (RTL) se calcularon con el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (24).

15 Determinación de la concentración de zinc

Las raíces y los brotes de *Arabidopsis* de tipo silvestre (wt) de cuatro semanas de edad cultivados en hidropónico, y de los mutantes por inserción de T-ADN *m19*, *m23* y *m19m23*, se cosecharon, lo que consistió en tres plantas por genotipo x tres tratamientos (Zn-, Zn+, Zn++) x dos experimentos independientes. Los sistemas radiculares se desorbieron con PbNO₃ 5 mM frío durante 30 min. Las raíces y los brotes se analizaron en cuanto a la concentración de zinc mediante el uso de espectrometría de absorción atómica por llama (Perkin Elmer 1100B).

Generación de construcciones

25 Para generar las construcciones de sobreexpresión para la transformación del mutante doble por inserción de T-ADN de *Arabidopsis* (*m19m23*), los ADNc de longitud completa de *AtbZIP19* y *AtbZIP23* (clones GSLTSIL54ZH09 y GSLTFB35ZE06, respectivamente) se obtuvieron de CNRGV (Centre National of Ressources Génomiques Végétales, Francia) en el vector de clonación pCMV SPORT6, que contiene sitios de recombinación Gateway. Los ADNc se clonaron en el vector de entrada pDONR207 (Invitrogen) mediante recombinación dirigida a un sitio *in vitro*, para una recombinación posterior en el vector de sobreexpresión pGD625 (De Folter, S. et al., 2005, Plant Cell 17:1424-1433).
30 Las construcciones pCaMV35S::bZIP19 (OX19) y pCaMV35S::bZIP23 (OX23) se verificaron mediante análisis por digestión y secuenciación y se transformaron mediante electroporación en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* AGL0. Posteriormente, las plantas *m19m23* y de tipo silvestre de *Arabidopsis* se transformaron mediante inmersión floral (Clough, S.J. et al., 1998, Plant J. 16:735-743). Se seleccionaron líneas transformadas independientes por un solo locus con inserción mediante resistencia a antibióticos y una relación de segregación de 3:1 de las plántulas T2. La sobreexpresión de *bZIP19* o *bZIP23* se confirmó mediante RT-PCR. Cinco, respectivamente tres líneas independientes de *m19m23*-OX19 y *m19m23*-OX23 se analizaron con 10 plántulas por línea, cultivadas en medio MS en condiciones de Zn- o Zn+, en dos placas de réplica por línea. Se usaron plantas de *Arabidopsis* de tipo silvestre y *m19m23* como controles.

40 Análisis de micromatriz

Las plantas de *Arabidopsis* de tipo silvestre (wt) y plantas dobles mutantes por inserción de T-ADN *m19m23* se cultivaron en medio de hidropónico como se describió anteriormente. Se cultivaron durante tres semanas con suministro normal de zinc (Zn+, 2 µM de ZnSO₄) y una semana con bajo suministro de zinc (Zn-, 0.05 µM de ZnSO₄) o suministro normal de zinc (Zn+). Las raíces de cuatro plantas por genotipo y por tratamiento (Zn-/Zn+) se combinaron en un experimento de dos réplicas biológicas, y el ARN se extrajo con el kit de ARN de plantas RNAeasy (Qiagen). Los transcriptomas se analizaron mediante el uso de 1 µg de ARN total como material de partida. Los objetivos se prepararon con el kit de síntesis de ADNc de un ciclo, seguido por marcaje con biotina con el kit de marcaje IVT (GeneChip One-cycle target labelling y reactivos control, Affymetrix, High Wycombe, Reino Unido) y se hibridaron al chip del gen de ATH1 durante 16 h según recomienda el proveedor (Manual de análisis de expresión génica, Affymetrix). Los archivos de datos en bruto se procesaron y se normalizaron por cuantil en Bioconductor/R (27). La expresión diferencial de cada gen se analizó mediante la aplicación de una prueba *t* regularizada por Empirical Bayes (Smyth, G.K., 2004, Stat. Appl. Genet. Mol. Biol. 3, Iss. 1, Artículo 3)). Los valores de *p* se corrigieron para múltiples pruebas mediante el uso del enfoque de Benjamini y Hochberg (1995, J. Royal Stat., Soc. B 57:289-300), que proporciona un control de la tasa de descubrimientos falsos (FDR).

Estadística

60 El análisis de los datos y la estadística se realizaron mediante el uso de Microsoft Excel y SPSS 15.0 para Windows. El análisis estadístico de los datos de la concentración de zinc y el peso seco, a partir de líneas de *Arabidopsis* y mutantes, se realizó mediante ANOVA de una vía seguido por una prueba de Tukey post-hoc.

Resultados

En *Arabidopsis*, numerosos miembros de la familia de ZIP de transportadores de metales principalmente implicados en la absorción celular, se inducen transcripcionalmente en respuesta a condiciones deficientes de zinc y se piensa que constituyen la puerta principal de zinc a la planta. El gen de *ZIP4* en particular se induce fuertemente en las raíces tras la deficiencia de zinc (Figura 3A). Lo usamos para complementar el requerimiento aumentado de zinc del mutante de *zrt1zrt2* de *Saccharomyces cerevisiae* defectuoso en la absorción de zinc con alta y baja afinidad (Zhao, H. et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:2454-2458)), y mostramos que efectivamente codifica un transportador de zinc (Figura 4, B y C). Clonamos el promotor del gen de *ZIP4* hacia el extremo 5' del gen reportero de GUS y expresamos esta construcción en *Arabidopsis*. La expresión de GUS fue evidente solo cuando las plantas se cultivaron en medio deficiente de zinc, análogo a la expresión génica de *ZIP4* endógeno (datos no mostrados). Para identificar los factores de transcripción que controlan la expresión de *ZIP4*, usamos seis fragmentos del promotor de *ZIP4* superpuestos como cebos en un ensayo de un híbrido en levadura. Además, usamos tres repeticiones en tándem de un motivo palindrómico de 10 pb, presente en dos copias cerca del inicio de la transcripción de *ZIP4* predicho, como cebo adicional (Figura 2A; fragmentos A a G). Se identificaron numerosos clones de dos ADNc, pero solo cuando se tamizaron con cebos que contienen dos o tres copias del palíndromo de 10 pb (Figura 2A; fragmentos E, F y G). Estos ADNc correspondieron a *bZIP19* (At4g35040, NM_119670.4) y *bZIP23* (At2g16770, NM_119670.4), dos genes de la familia de factores de transcripción con motivo de región básica/cremallera de leucina (bZIP). *Arabidopsis* contiene 75 miembros de la familia de bZIP (Jakoby, M. et al., 2002, Trends Plant Sci. 7:106-111).

Para investigar la participación de estos tres genes de *bZIP* en el control de la adaptación de plantas a un bajo suministro de zinc, analizamos los niveles de transcritos mediante RT-PCR cuantitativa (qPCR) en plántulas de tres semanas de edad de tipo silvestre cultivadas en placas de agar a tres concentraciones de zinc diferentes. La expresión de los genes *bZIP19* y *bZIP23* disminuyó a aproximadamente la mitad tras el aumento del suministro de zinc, y *bZIP19* se expresó ligeramente más que *bZIP23* (Figura 2B). *bZIP24* tuvo menores niveles de transcritos que los otros dos, y la expresión no se afectó de manera obvia por el estado de zinc del medio, por lo tanto, se concluyó que *bZIP19* y *bZIP23* están implicados en la respuesta a la deficiencia de zinc en plantas.

Para determinar sus fenotipos mutantes, se obtuvieron líneas con inserción de T-ADN homocigotas para los genes *bZIP19* y *bZIP23* (nombrados respectivamente *m19* y *m23*) que estaban desprovistas del transcrito de longitud completa *bZIP19* o *bZIP23* (fig. 5, A y B). Se realizaron cruces con ambas líneas mutantes individuales para generar una línea doble mutante (*m19m23*). Las plantas de tipo silvestre y mutantes individuales o dobles, cultivadas en suelo no mostraron ninguna diferencia fenotípica obvia (datos no mostrados), sin embargo, cuando se cultivaron en medio agar deficiente de zinc (Zn⁻), solo la línea doble mutante fue hipersensible a la deficiencia de zinc (Figura 4A). Las plántulas de tres semanas de edad mostraron muy poco crecimiento y fuerte clorosis. Para excluir los efectos *in vitro* durante el cultivo de tejidos, cultivamos plantas durante un tiempo más prolongado en medio de hidropónico, donde se pudieron desarrollar normalmente. Las plantas dobles mutantes de cuatro semanas de edad, cultivadas con bajo suministro de zinc (Zn⁻) mostraron una fuerte reducción del crecimiento en comparación con las plantas de tipo silvestre, como se determinó por la comparación del peso seco (Figura 4, B y C). Estas plantas también tuvieron una disminución de la absorción de zinc, con solo 58 % y 73 % de la concentración de zinc en brotes y raíces respectivas de las plantas de tipo silvestre (Figura 4C). Con un bajo suministro de zinc en hidropónicos, también el mutante individual de *m19* mostró reducción en el crecimiento y disminución de la absorción de zinc cuando se comparó con el tipo silvestre (Figura 4B). Cuando se cultivó en medio suficiente de zinc (Zn⁺) o con exceso de zinc (Zn⁺⁺), no se observaron diferencias entre los mutantes y el tipo silvestre (Figura 4, A y B), ni para el contenido de zinc ni el peso seco (fig. 6,7). Para demostrar que las mutaciones en *bZIP19* y *bZIP23* de hecho provocaron el fenotipo del doble mutante *m19m23* expresamos ADNc de *bZIP19* o el de *bZIP23*, cada uno bajo el control del promotor de 35S de CaMV, en el doble mutante. Esto complementó totalmente el fenotipo hipersensible a la deficiencia de zinc (Figura 8A).

Estos hallazgos muestran que *bZIP19* y *bZIP23* codifican factores de transcripción esenciales que controlan la respuesta a la deficiencia de zinc en las plantas. Estos genes actúan de manera redundante, donde *bZIP19* es solo parcialmente redundante. Los factores de transcripción bZIP generalmente actúan como dímeros. Su redundancia sugiere que *bZIP19* y *bZIP23* actúan como homo(di)meros, en línea con predicciones anteriores (Deppmann, C.D. et al., 2006, Mol. Biol. Evol. 23:1480-1492). La secuencia objetivo de ADN para la unión de *bZIP19* y *bZIP23* debe estar dentro del palíndromo imperfecto de 10 pb presente en dos copias en el promotor de *ZIP4*, ya que tres copias en tándem de esta secuencia fueron suficientes para identificar ambos *bZIP* en el ensayo de un híbrido en levadura. Por lo tanto, denominamos a la secuencia consenso del palíndromo (RTGTCGACAY) un Elemento de Respuesta a la Deficiencia de Zinc (ZDRE). El ZDRE no tiene el núcleo ACTG típico como se encuentra en los elementos de ADN de la caja A (TACGTA), la caja C (GACGTC) o la caja G (CACGTG), a los cuales se conoce que las bZIP de plantas se unen preferentemente. Aunque también se han reportado otros sitios de unión (Choi, H. et al., 2000, J. Biol. Chem. 275:1723-1730; Fukazawa, I. Et al., 2000, Plant Cell 12:901-915) el ZDRE no está entre ellos.

Para confirmar adicionalmente que el ZDRE es de hecho el elemento en *cis* característico para los genes objetivo para el control de la transcripción por *bZIP19/23*, se tamizaron los promotores de otros genes de transportadores ZIP en cuanto a los ZDRE. De los 15 genes de ZIP de *Arabidopsis* (Mäser, P. et al., 2001, Plant Physiol. 126:1646-1667), aproximadamente la mitad se describen como que se inducen transcripcionalmente en condiciones con deficiencia de

zinc en comparación con el suministro normal de zinc (Grotz, N. et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci USA 95:7220-7224; Van de Mortel, J.E. et al., 2006, Plant Physiol. 142:1127-1147; Wintz, H. et al., 2003, J. Biol. Chem. 278:47644-47653). Solo ZIP1, ZIP2, ZIP3, ZIP4 y IRT3 codifican proteínas caracterizadas como transportadores de zinc (Grotz, *supra*; Lin, Y.-F. et al., 2009, New Phytol. 182:392-404) aunque probablemente otras también transporten zinc. ZIP1, ZIP3, ZIP4, ZIP5, ZIP9, ZIP12 y IRT3 contienen una o dos copias de ZDRE en sus promotores y estos genes no muestran la típica inducción de la expresión en el doble mutante *m19m23* en condiciones deficientes de zinc como se observó en el tipo silvestre (Figura 8B). La expresión de ZIP2, que no se induce por deficiencia de zinc y no tiene secuencia de ZDRE en su promotor, no se afecta cuando se compara el mutante y el tipo silvestre (Figura 8B). Para determinar el efecto de la pérdida de la función de bZIP19/23 sobre la expresión génica global se realizó un experimento de micromatriz que comparó las raíces de plantas dobles mutantes *m19m23* cultivadas en hidropónico de cuatro semanas de edad con las de plantas de tipo silvestre, tratadas en su última semana con bajo suministro de zinc (Zn-). Solo 23 genes mostraron una alteración estadísticamente significativa de los niveles de transcritos que exceden un umbral de diferencia de 1.5 veces (Tabla 3).

Entre ellos, 16 se regularon negativamente en el doble mutante, incluido *bZIP19* (no se incluyó una sonda para *bZIP23* en la micromatriz usada). De los 15 genes restantes, 11 se conoce que se inducen en las raíces de *Arabidopsis* de tipo silvestre tras la deficiencia de zinc (Van de Mortel et al., *supra*) y nueve contienen una o más copias de ZDRE en sus regiones promotoras. Nosotros pensamos que estos son los objetivos directos de *bZIP19* y *bZIP23*, importantes para la respuesta primaria a la deficiencia de zinc, y los otros genes representan un efecto secundario. Estos hallazgos confirman el importante papel del ZDRE y los genes de *bZIP19/23* en el control de la respuesta a la deficiencia de zinc en *Arabidopsis*. Además muestra que el fuerte efecto negativo sobre el crecimiento y la concentración de zinc del mutante *m19m23* cuando se cultiva con deficiencia de zinc (Figura 4, A, B y C) se explica en gran medida por la reducción en la expresión de un grupo relativamente pequeño de genes para la homeostasis del zinc implicados en la absorción y la translocación de los metales.

Tabla 3. Genes expresados diferencialmente detectados mediante análisis comparativo de micromatriz del transcriptoma de la raíz de plantas de *Arabidopsis* de tipo silvestre y dobles mutantes *m19m23*. Se usaron las raíces de plantas de cuatro semanas de edad cultivadas en hidropónicos expuestas en su última semana a una deficiencia de zinc (Zn-). Cambio en veces (FC) $\geq 1,5$ y valores de p ajustados (Benjamini-Hochberg, BH) $\leq 0,05$ se usaron como valores de corte. El valor de expresión promedio (escala log2) del modelo génico en el conjunto de datos se indica como A.

Anotación (www.arabidopsis.org)	Modelo génico	FC ($\geq 1,5$)	A	Valor de p ajustado (BH)
Regulado negativamente				
proteína de la familia de factores de transcripción bZIP	AT4G35040	-35,87	7,31	9,27E-08
ZIP3 (PRECURSOR DEL TRANSPORTADOR DE ZINC 3)* proteína de la familia de fosfatidilinositol 3- y 4-quinasa /	AT2G32270	-26,23	9,67	1,35E-09
proteína de la familia de ubiquitina	AT5G24240	-8,43	8,20	3,57E-08
ZIP5 (PRECURSOR DEL TRANSPORTADOR DE ZINC 5)*	AT1G05300	-8,34	6,90	4,15E-07
ZIP4 (PRECURSOR DEL TRANSPORTADOR DE ZINC 4)*	AT1G10970	-7,19	7,68	9,27E-08
ZIP9 (PRECURSOR DEL TRANSPORTADOR DE ZINC 9)*	AT4G33020	-3,23	6,90	4,41E-04
ZIP1 (PRECURSOR DEL TRANSPORTADOR DE ZINC 1)*	AT3G12750	-3,21	7,33	1,10E-05
nicotianamina sintasa, putativa*	AT5G56080	-3,02	9,24	1,28E-02
ATPAP27/PAP27 (fosfatasa ácida púrpura 27)	AT5G50400	-2,51	9,79	1,10E-05
nicotianamina sintasa, putativa*	AT1G56430	-2,46	7,68	1,98E-03
ATARP9 (PROTEÍNA RELACIONADA CON ACTINA 9)	AT5G43500	-2,33	7,28	3,16E-05
FRD3 (DEFECTUOSO DE REDUCTASA FÉRRICA 3) prolil oligopeptidasa, putativa / prolil endopeptidasa,	AT3G08040	-1,78	8,61	1,98E-03
enzima de escisión putativa / post-prolina, putativa*	AT1G20380	-1,77	8,28	6,20E-03
WR3 (SENSIBLE A HERIDAS 3)	AT5G50200	-1,60	11,63	2,48E-02
ZIP10 (PRECURSOR DE TRANSPORTADOR DE ZINC 10)* similar a proteína desconocida [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	AT1G31260	-1,60	6,30	3,09E-02
(TAIR:AT1G61260.1)	AT4G04990	-1,59	8,41	4,22E-03
regulado positivamente				

Anotación (www.arabidopsis.org)	Modelo génico	FC (≥1,5)	A	Valor de p ajustado (BH)
LAC2 (laccasa 2)	AT2G29130	1,82	7,01	1,82E-02
ANR1; factor de unión al ADN / de transcripción similar a proteína desconocida [Arabidopsis thaliana]	AT2G14210	1,71	8,90	2,85E-02
(TAIR:AT1G21670.1)	AT1G21680	1,57	8,98	2,85E-02
ATEBP/ERF72/RAP2.3 (RELACIONADO CON AP2 3)	AT3G16770	1,55	9,68	4,18E-02
COBL2 (PRECURSOR DE PROTEÍNA 2 SIMILAR A COBRA)	AT3G29810	1,54	7,40	3,42E-02
proteína de la familia con caja F que contiene repetición de kelch	AT1G80440	1,52	11,05	9,48E-03
ATPSK2 (PRECURSOR DE FITOSULFOCINA 2)	AT2G22860	1,52	9,20	4,24E-02
* Indica genes que contienen una o más copias del ZDRE en su región promotora.				

En resumen, la función de los factores de transcripción *bZIP19* y *bZIP23* es esencial para la respuesta y adaptación de las plantas a un bajo suministro de zinc. La identificación de estos factores de transcripción, así como el elemento ZDRE al cual se unen y los genes objetivo que regulan, constituye una etapa importante dirigida hacia una total comprensión de la homeostasis del zinc en plantas.

Ejemplo 2

Las plantas de *Arabidopsis*, Col de acceso, se transformaron con OX19 o OX23 (para la construcción de estos vectores, véase el Ejemplo 1) y se obtuvieron plantas T3 homocigotas. Se seleccionaron tres líneas con alta expresión que contenían OX19 (genotipos 14, 15, 19) u OX23 (genotipos 16, 17, 18). Las semillas de estas líneas se germinaron y cultivaron en dos réplicas en medio de hidropónico que no contenía Zn adicional (0 µM de Zn; deficiencia de Zn), 2 µM de Zn (Zn normal), o 25 µM de Zn (Zn en exceso). Las plantas se fotografiaron después de 6 semanas y se tomaron muestras para análisis de la biomasa.

Cuando se compararon las plantas cultivadas en condiciones normales de Zn, no hubo una diferencia obvia en el fenotipo visible (datos no mostrados). Sin embargo, cuando se compararon las plantas cultivadas en medio deficiente de Zn, las líneas 19 (OX 19), 16 y 17 (OX23) eran generalmente más grandes y más verdes (Figura 9). Cuando se examinó la producción de biomasa, de hecho, se encontró que todas las líneas produjeron más biomasa que WT, aunque en este experimento a pequeña escala, se encontró que esto solo fue significativo para la línea # 16 (Fig. 10A). Cuando las plantas cultivadas con suministro normal de Zn se examinaron en cuanto a la producción de biomasa, se encontró que generalmente tenían menos o igual biomasa en comparación con WT (Fig. 10B), aunque las diferencias observadas no fueron estadísticamente significativas. Las concentraciones de zinc se determinaron en los brotes de todas las líneas cultivadas con zinc normal y deficiencia de zinc. Las concentraciones de Zn en los brotes de las plantas cultivadas con zinc normal generalmente no fueron diferentes del WT (datos no mostrados), sin embargo, con deficiencia de zinc, la concentración de zinc en todas las líneas fue menor que el WT (Figura 11), donde especialmente las líneas 18 y 19 mostraron solo 60 % de la concentración de Zn de WT. Esto significa que, aunque las plantas no son capaces de adquirir más Zn debido al agotamiento de Zn en el medio, algunas líneas OX 19 y OX23 son capaces de producir más biomasa con la misma cantidad de Zn, lo que indica que son más tolerantes a la deficiencia de Zn y más eficientes para el Zn.

Ejemplo 3

Para este experimento, se obtuvo una nueva construcción pZIP4::bZIP19. Esta contiene el ADNc completo de bZIP19 de *Arabidopsis* fusionado hacia el extremo 3' del promotor del gen de ZIP4 de *Arabidopsis* sensible a la deficiencia de zinc. La racionalidad de los experimentos es probar si la sobreexpresión de la función de bZIP19 o bZIP23 aumentará la tolerancia a la deficiencia de Zn, en comparación con plantas de tipo silvestre de *Arabidopsis*. La sobreexpresión de la función de bZIP19 en este experimento, a diferencia del experimento descrito en el Ejemplo 2, está mediada por el promotor del gen del transportador de zinc ZIP4 transcripcionalmente sensible a una deficiencia de Zn. Por lo tanto, la sobreexpresión de la función de bZIP19 será predominantemente en las células y tejidos donde normalmente la respuesta a la deficiencia de Zn es activa, aunque se espera en niveles mayores que en plantas WT.

Las plantas de *Arabidopsis*, Col de acceso, se transformaron con la construcción pZIP4::bZIP19 y se obtuvieron plantas T3 homocigotas. En total se seleccionaron 6 líneas, que contenían el T-ADN insertado en un locus y que mostraron un fenotipo sin disminución de la resistencia a la higromicina después de tres generaciones sucesivas como evidencia de transformación estable. Las plantas WT y pZIP4::bZIP19 se cultivaron en dos réplicas en medio con Zn normal (2 µM de Zn), o sin adición de Zn (0 µM de Zn) para provocar deficiencia de Zn. Después de cuatro semanas de crecimiento, se tomaron fotografías para determinar cualquier diferencia en los fenotipos visibles (Figura 12). En esta etapa, las plantas

todavía no muestran síntomas visibles de una deficiencia de Zn, pero muestran retardo del crecimiento, en comparación con las plantas cultivadas en Zn normal (datos no mostrados). En esta etapa, es evidente que las plantas WT en general tienen rosetas más pequeñas que las plantas pZIP4::bZIP19 transformadas.

ES 2 658 622 T3

Listado de Secuencias

<110> Wageningen Universiteit
 Goncalves Leite de Assuncao, Ana
 Aarts, Martinus GM
 5

<120> Regulación de la deficiencia de zinc y tolerancia en plantas

<130> P88518PC00
 10

<150> EP 09165714.8
 <151> 2009-07-16

<160> 44
 15

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
 <211> 249
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana
 20

<400> 1

Met Asp Asp Gly Glu Leu Glu Phe Ser Asn Ser Asn Met Gly Gly Glu
 1 5 10 15

Leu Pro Ser Cys Ser Met Asp Ser Phe Phe Asp Glu Leu Leu Arg Asp
 20 25 30

Ser His Ala Cys Thr His Thr His Thr Cys Asn Pro Pro Gly Pro Glu
 35 40 45

Asn Thr His Thr His Thr Cys Leu His Val His Thr Lys Ile Leu Pro
 50 55 60

Asp Lys Val Ser Thr Asp Asp Thr Ser Glu Ser Ser Gly Lys Lys Arg
 65 70 75 80

Pro Leu Gly Asn Arg Glu Ala Val Arg Lys Tyr Arg Glu Lys Lys Lys
 85 90 95

Ala Lys Ala Ala Ser Leu Glu Asp Glu Val Met Arg Leu Lys Ala Val
 100 105 110

Asn Asn Gln Leu Leu Lys Arg Leu Gln Gly Gln Ala Ala Leu Glu Ala
 115 120 125

Glu Val Thr Arg Leu Lys Cys Leu Leu Val Asp Ile Arg Gly Arg Ile
 130 135 140

Asp Gly Glu Ile Gly Ala Phe Pro Tyr Gln Lys Pro Ala Val Thr Asn
 145 150 155 160

25 Val Pro Tyr Ser Tyr Met Met His Pro Cys Asn Met Gln Cys Asp Val

ES 2 658 622 T3

165 170 175

Asp Asn Leu Tyr Cys Leu Gln Asn Gly Asn Asn Gly Glu Gly Ala Ser
180 185 190

Met Asn Glu Gln Gly Leu Asn Gly Cys Glu Phe Asp Gln Leu Glu Cys
195 200 205

Leu Ala Asn Gln Asn Leu Ala Gly Lys Glu Ile Pro Val Cys Ser Asn
210 215 220

Gly Ile Gly Thr Phe Thr Val Asn Gly Ser Gly Val Asn Lys Arg Lys
225 230 235 240

Gly Glu Pro Arg Ala Ala Lys Ala Val
245

<210> 2

<211> 261

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

5

<400> 2

Met Glu Asp Gly Glu Leu Asp Phe Ser Asn Gln Glu Val Phe Ser Ser
1 5 10 15

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

Phe Asp Gly Leu Leu Met Asp Thr Asn Ala Ala Cys Thr His Thr His
35 40 45

Thr Cys Asn Pro Thr Gly Pro Glu Asn Thr His Thr His Thr Cys Phe
50 55 60

His Val His Thr Lys Ile Leu Pro Asp Glu Ser Asp Glu Lys Val Ser
65 70 75 80

Thr Asp Asp Thr Ala Glu Ser Cys Gly Lys Lys Gly Glu Lys Arg Pro
85 90 95

Leu Gly Asn Arg Glu Ala Val Arg Lys Tyr Arg Glu Lys Lys Lys Ala
100 105 110

Lys Ala Ala Ser Leu Glu Asp Glu Val Ala Arg Leu Arg Ala Val Asn
115 120 125

Gln Gln Leu Val Lys Arg Leu Gln Asn Gln Ala Thr Leu Glu Ala Glu
130 135 140

10

ES 2 658 622 T3

Val Ser Arg Leu Lys Cys Leu Leu Val Asp Leu Arg Gly Arg Ile Asp
145 150 155 160

Gly Glu Ile Gly Ser Phe Pro Tyr Gln Lys Pro Met Ala Ala Asn Ile
165 170 175

Pro Ser Phe Ser His Met Met Asn Pro Cys Asn Val Gln Cys Asp Asp
180 185 190

Glu Val Tyr Cys Pro Gln Asn Val Phe Gly Val Asn Ser Gln Glu Gly
195 200 205

Ala Ser Ile Asn Asp Gln Gly Leu Ser Gly Cys Asp Phe Asp Gln Leu
210 215 220

Gln Cys Met Ala Asn Gln Asn Leu Asn Gly Asn Gly Asn Gly Ser Phe
225 230 235 240

Ser Asn Val Asn Thr Ser Val Ser Asn Lys Arg Lys Gly Gly His Arg
245 250 255

Ala Ser Arg Ala Val
260

5 <210> 3
<211> 228
<212> PRT
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 3
Met Phe Cys Cys Lys Asp Cys Arg Gly Asn Gln Arg Val Ser Asn
1 5 10 15

Phe Asp Ser Leu Thr Gly Val Phe Phe Gly Asp Leu Glu Phe Gly Pro
20 25 30

Gln Asn Gln Arg Tyr Ile Lys Met Asn Glu Glu Glu Asp Lys Asp Gln
35 40 45

Asp Arg Val Thr Arg Gly Cys Ser His Thr His Ser Cys Asn Pro Pro
50 55 60

Gly Pro Glu Asp Ala Ser His Ser His Thr Cys Phe His Ala His Thr
65 70 75 80

His Leu Ile Ile Ser Gln Asp Gln Gln Glu Asn Asp His Ser Asp Ser
85 90 95

10 Ser Asn Lys Lys Arg Leu Cys Gly Asn Arg Glu Ala Val Arg Lys Tyr

ES 2 658 622 T3

	100		105		110	
Arg	Glu Lys	Lys Lys	Ala Arg	Thr Ala	Tyr Leu	Glu Asp
	115			120		125
Arg	Leu Gln	Ser Leu	Asn Glu	Gln Phe	Leu Arg	Lys Leu
	130		135			140
Glu	Met Val	Glu Thr	Glu Leu	Ile Arg	Leu Arg	Ala Leu
145			150		155	160
Met	Gln Gly	Lys Ile	Glu Val	Glu Leu	Cys Ser	Phe Ser
		165			170	
Gln	Cys Asn	Gly Ser	Gly Phe	Val Phe	Lys Glu	Asp Gly
		180		185		190
Ala	Thr Ser	Asn Met	Met Cys	Glu Ala	Ala Arg	Val Glu
	195			200		205
Gly	Gln Thr	Leu His	Asp Pro	Ile Gln	Ser Phe	Val Pro
	210		215			220
Pro	Phe Ser	Arg				
	225					

- <210> 4
- 5 <211> 11745
- <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- 10 <223> constructo pBG0072

<400> 4	
ctagagtcct	gctttaatga gatatgcgag acgcctatga tcgcatgata tttgctttca 60
attctgttgt	gcacgttgta aaaaacctga gcatgtgtag ctcagatcct taccgccggt 120
ttcggttcat	tctaatgaat atatcacccg ttactatcgt atttttatga ataatttct 180
ccgttcaatt	tactgattgt accctactac ttatatgtac aatattaaaa tgaaaacaat 240
atattgtgct	gaataggttt atagcgacat ctatgataga gcgccacaat aacaaacaat 300
tgcgttttat	tattacaaat ccaattttta aaaaagcggc agaaccggtc aaacctaaaa 360
gactgattac	ataaatctta ttcaaatttc aaaagtgcc caggggctag tatctacgac 420
acaccgagcg	gcgaactaat aacgctcact gaagggaaact ccggttccc cgggcgcgca 480
tgggtgagat	tccttgaagt tgagtattgg ccgtccgctc tacgaaagtt acgggcacca 540
ttcagcgaca	acatgtcgag gctcagcagg acctgcaggc atgcaaaaaaaa aaaactagt 600
gatgcatatt	ctatagtgtc acctaaatct gcggccgctg accaagtcag ctagcttggc 660

ES 2 658 622 T3

actggccgtc gttttacaac gtcgtgactg ggaaaaacct ggcgttacct aacttaatcg 720
 ccttgagca catccccctt tcgccagctg gcgtaatagc gaagaggccc gcaccgatcg 780
 cccttcccaa cagttagcga gcctgaatgg cgaatgctag agcagcttga gcttgatca 840
 gattgtcgtt tcccgccttc agtttaaact atcagtgttt gacaggatat attggcgggt 900
 aaacctaaaga gaaaagagcg tttattagaa taacggatat ttaaaagggc gtgaaaaggt 960
 ttatccgttc gtccatttgt atgtgcatgc caaccacagg gttcccctcg ggatcaaagt 1020
 actttgatcc aaccctccg ctgetatagt gcagtcggct tctgacgttc agtgcagccg 1080
 tcttctgaaa acgacatgtc gcacaagtcc taagttacgc gacaggctgc cgccctgccc 1140
 ttttctctggc gttttcttgt cgcgtgtttt agtcgcataa agtagaatac ttgcgactag 1200
 aaccggagac attacgccat gaacaagagc gccgccgctg gcctgctggg ctatgcccgc 1260
 gtcagcaccg acgaccagga cttgaccaac caacggggcg aactgcacgc ggccggtgc 1320
 accaagctgt tttccgagaa gatcaccggc accaggcgcg accgcccgga gctggccagg 1380
 atgcttgacc acctacgcc tggcgacgtt gtgacagtga ccaggctaga ccgcctggcc 1440
 cgcagcaccg gcgacctact ggacattgcc gagcgcaccc aggaggccgg cgccggcctg 1500
 cgtagcctgg cagagccgtg ggccgacacc accacgccgg ccggccgcat ggtgttgacc 1560
 gtgttcgccg gcattgccga gttcgagcgt tccetaatca tcgaccgcac ccggagcggg 1620
 cgcgagggcg ccaaggcccg aggcgtgaag tttggcccc gccctacct caccgccgca 1680
 cagatcgcgc acgcccgcga gctgatcgac caggaaggcc gcaccgtgaa agaggcggct 1740
 gcaactgctg gcgtgcatcg ctgcaccctg taccgcgcac ttgagcgcag cgaggaagtg 1800
 acgcccaccg aggccaggcg gcgcgggtgc ttccgtgagg acgcattgac cgaggccgac 1860
 gccctggcgg ccgcccagaa tgaacgcaa gaggaacaag catgaaaccg caccaggacg 1920
 gccaggacga accgttttcc attaccgaag agatcgaggc ggagatgac gcggccgggt 1980
 acgtgttcga gccgcccgcg cacgtctcaa ccgtgcggct gcatgaaatc ctggccgggt 2040
 tgtctgatgc caagctggcg gcctggccgg ccagcttggc cgctgaagaa accgagcgc 2100
 gccgtctaaa aaggatgatgt gtatttgagt aaaacagctt gcgtcatgcg gtcgctgctg 2160
 atatgatgcy atgagtaaat aaacaaatac gcaaggggaa cgcataaggt ttatcgtgt 2220
 acttaaccag aaaggcgggt caggcaagac gaccatcgca acccatctag ccgcgcct 2280
 gcaactcgcc ggggccgatg ttctgttagt cgattccgat ccccagggca gtgcccgcga 2340
 ttggggcgcc gtgcgggaag atcaaccgct aaccgttgtc ggcatcgacc gcccgacgat 2400
 tgaccgcgac gtgaaggcca tcggccggcg cgaactcgta gtgatcgacg gagcgcceca 2460
 ggcggcggac ttggctgtgt ccgcgatcaa ggcagccgac ttcgtgctga ttccggtgca 2520
 gccaaaccct tacgacatat gggccaccgc cgacctggtg gagctgggta agcagcgcac 2580

ES 2 658 622 T3

tgaggtcacg gatggaaggc tacaagcggc ctttgcgtg tcgcgggcca tcaaaggcac 2640
 gcgcatcggc ggtgaggttg ccgagggcct ggccgggtac gagctgccca ttcttgagtc 2700
 ccgtatcacg cagcgcgtga gctaccagg cactgccgcc gccggcaciaa ccgttcttga 2760
 atcagaaccc gagggcgacg ctgcccggca ggtccaggcg ctggccgctg aaattaaatc 2820
 aaaactcatt tgagttaatg aggtaaagag aaaatgagca aaagcaciaa cacgctaagt 2880
 gccggccgct cgagcgcacg cagcagcaag gctgcaacgt tggccagcct ggagacacg 2940
 ccagccatga agcgggtcaa ctttcagttg ccggcggagg atcacaccaa gctgaagatg 3000
 tacgcggtac gccaaaggcaa gaccattacc gagctgctat ctgaatacat cgcgcagcta 3060
 ccagagtaaa tgagcaaatg aataaatgag tagatgaatt ttagcggcta aaggaggcgg 3120
 catgaaaaat caagaacaac caggcaccga cgcctggaa tgccccatgt gtggaggaac 3180
 gggcgggttg ccaggcgtaa gcggctgggt tgtctgccgg ccctgcaatg gactggaac 3240
 cccaagccc gaggaatcgg cgtgacggtc gcaaaccatc cggcccggta caaatcggcg 3300
 cggcgtggg tgatgacctg gtggagaagt tgaagccgc gcaggccgcc cagcggcaac 3360
 gcatcgaggc agaagcacgc cccggtgaat cgtggcaagc ggccgctgat cgaatccga 3420
 aagaatcccg gcaaccgccg gcagccggtg cgcctcgat taggaagccg cccaaggcgg 3480
 acgagcaacc agattttttc gttccgatgc tctatgacgt gggcaccgc gatagtgcga 3540
 gcatcatgga cgtggccggt ttccgtctgt cgaagcgtga ccgacgagct ggcgaggtga 3600
 tccgctacga gcttccagac gggcacgtag aggtttccgc agggccggcc ggcatggcca 3660
 gtgtgtggga ttacgacctg gtactgatgg cggtttccca tctaaccgaa tccatgaacc 3720
 gataccggga agggaaaggga gacaagcccg gccgcgtggt ccgtccacac gttgaggacg 3780
 tactcaagtt ctgcccggca gccgatggcg gaaagcagaa agacgacctg gtagaacct 3840
 gcattcgggt aaacaccacg cacgttgcca tgcagcgtac gaagaaggcc aagaacggcc 3900
 gcctgggtgac ggtatccgag ggtgaagcct tgattagccg ctacaagatc gtaaagagcg 3960
 aaaccggggc gccggagtac atcgagatcg agctagctga ttggatgtac cgcgagatca 4020
 cagaaggcaa gaaccggac gtgctgacgg ttcaccccga ttactttttg atcgatcccg 4080
 gcatcgccg ttttctctac cgctggcac gccgcgccg aggcaaggca gaagccagat 4140
 ggttggtcaa gacgatctac gaacgcagtg gcagcggcg agagtcaag aagtctgtt 4200
 tcaccgtgcg caagctgacg gggtaaatg acctgccgga gtacgatttg aaggaggag 4260
 cggggcaggc tggcccgatc ctagtcatgc gctaccgcaa cctgatcgag ggcaagcat 4320
 ccgccggttc ctaatgtacg gagcagatgc tagggcaaat tgccctagca ggggaaaaag 4380
 gtcgaaaagg tctctttcct gtggatagca cgtacattgg gaacccaaag ccgtacattg 4440
 ggaaccggaa cccgtacatt gggaaccaa agccgtacat tgggaaccgg tcacacatgt 4500
 aagtgactga tataaaagag aaaaaaggcg atttttccgc ctaaaactct ttaaaactta 4560

ES 2 658 622 T3

ttaaaactct taaaaccgc ctggcctgtg cataactgtc tggccagcgc acagccgaag 4620
 agctgcaaaa agcgcctacc cttecggtcgc tgcgetccct acgccccgcc gcttcgcgtc 4680
 ggctatcgc ggccgctggc cgctcaaaaa tggctggcct acggccagggc aatctaccag 4740
 ggcgcggaaca agccgcgccc tcgccactcg accgcccggc cccacatcaa ggcaccctgc 4800
 ctgcgcgctt tcggtgatga cggtgaaaac ctctgacaca tgcagctccc ggagacggtc 4860
 acagcttgtc tgtaagcggg tgccggggagc agacaagccc gtcagggcgc gtcagcgggt 4920
 gttggcgggt gtcggggcgc agccatgacc cagtcacgta gcgatagcgg agtgtatact 4980
 ggcttaacta tgcggcatca gagcagattg tactgagagt gcaccatatg cgggtgtgaaa 5040
 taccgcacag atgcgtaagg agaaaatacc gcatcagggc ctcttccgct tcctcgetca 5100
 ctgactcgtc gcgctcggtc gttcgggtgc ggcgagcggg atcagctcac tcaaaggcgg 5160
 taatacgggt atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc 5220
 agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg cgttgctggc gtttttccat aggctccgcc 5280
 ccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac 5340
 tataaagata ccaggcgttt cccctggaa gctccctcgt gcgctctcct gttccgacct 5400
 tgcgcttac cggatacctg tccgccttc tccctcggg aagcgtggcg etttctcata 5460
 gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc 5520
 acgaaccccc cgttcagccc gaccgctcgc ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca 5580
 acccggtaag acacgactta tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg attagcagag 5640
 cgaggatgt aggcgggtgct acagagttct tgaagtgggt gcctaactac ggctacacta 5700
 gaaggacagt atttggatc tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg 5760
 gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc 5820
 agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc tttgatctt tctacggggt 5880
 ctgacgctca gtggaacgaa aactcacggt aagggatctt ggtcatgcat tctaggtact 5940
 aaaacaattc atccagtaaa atataatatt ttattttctc ccaatcaggc ttgatcccca 6000
 gtaagtcaaa aaatagctcg acatactgtt cttcccgat atcctccctg atcgaccgga 6060
 cgcagaaggc aatgcatcac cacttgctcg ccctgcgct tctcccaaga tcaataaagc 6120
 cacttacttt gccatcttcc aaaaagatgt tgcgtctcc caggtcgcgc tgggaaaaga 6180
 caagttcctc ttcgggcttt tccgtctta aaaaatcata cagctcgcgc ggatctttaa 6240
 atggagtgtc ttctcccag ttttcgcaat ccacatcggc cagatcgtta ttcagtaagt 6300
 aatccaattc ggetaagcgg ctgtctaagc tattegtata gggacaatcc gatatgtcga 6360
 tggagtgaaa gagcctgatg cactccgcat acagctcgat aatcttttca gggctttgtt 6420
 catcttcata ctcttcgag caaaggacgc catcggcctc actcatgagc agattgetcc 6480

ES 2 658 622 T3

agccatcatg ccgttcaaag tgcaggacct ttggaacagg cagctttcct tccagccata 6540
 gcatcatgtc cttttcccggt tccacatcat aggtggtccc tttataccgg ctgtccgtca 6600
 tttttaaata taggttttca ttttctccca ccagcttata taccttagca ggagacattc 6660
 ctcccgatc ttttacgcag cggatatttt cgatcagttt tttcaattcc ggtgatattc 6720
 tcattttagc catttattat ttccttctc ttttctacag tatttaaaga taccccaaga 6780
 agctaattat aacaagacga actccaattc actgttcctt gcattctaaa accttaaata 6840
 ccagaaaaca gctttttcaa agttgttttc aaagttggcg tataacatag tatcgacgga 6900
 gccgattttg aaaccgcggt gatcacaggc agcaacgctc tgtcatcggt acaatcaaca 6960
 tgctaccctc cgcgagatca tccgtgtttc aaaccggca gcttagttgc cgttcttccg 7020
 aatagcatcg gtaacatgag caaagtctgc cgccttacia cggctctccc gctgacgccg 7080
 tcccggactg atgggctgcc tgtatcgagt ggtgattttg tgccgagctg ccggtcgggg 7140
 agctgttggc tggctggtgg caggatata tgtggtgtaa acaaattgac gcttagacaa 7200
 cttataaaca cattgcggac gtttttaatg tactgaatta acgccgaatt aattcggggg 7260
 atctggattt tagtactgga ttttggtttt aggaattaga aattttattg atagaagtat 7320
 tttacaaata caaatacata ctaagggttt cttatatgct caacacatga gcgaaaccct 7380
 ataggaaccc taattccctt atctgggaac tactcacaca ttattatgga gaaactcgag 7440
 ctgtgcgac gacagatccg gtcggcatct actctatttc tttgcctcgc gacgagtgct 7500
 ggggcgtcgg tttccactat cggcgagtac ttctacacag ccatcgggtcc agacggccgc 7560
 gcttctcggg gcgatttgtg tacgcccgc agtcccggct ccggatcggga cgattgcgctc 7620
 gcacgacccc tgcgcccagg ctgcatcadc gaaattgccg tcaaccaagc tctgatagag 7680
 ttggtcaaga ccaatgcgga gcatatacgc ccggagtcgt ggcgatcctg caagctccgg 7740
 atgcctccgc tcgaagtagc gcgtctgctg ctccatacaa gccaaaccag gcctccagaa 7800
 gaagatgttg gcgacctcgt attgggaatc cccgaacatc gcctcgcctc agtcaatgac 7860
 cgctgttatg cggccattgt ccgtcaggac attgttggag ccgaaatccg cgtgcacgag 7920
 gtgccggact tcggggcagt cctcgcccca aagcatcagc tcatcgagag cctgcgcgac 7980
 ggacgcactg acggtgtcgt ccatcacagt ttgccagtga tacacatggg gatcagcaat 8040
 cgcgcatatg aaatcacgcc atgtagtgta ttgaccgatt ccttgccggtc cgaatgggcc 8100
 gaaccgcctc gtctggctaa gatcggccgc agcgatcgca tccatagcct ccgacgaccg 8160
 ttgtagaaca gggggcagtt cgggtttcagg caggtcttgc aacgtgacac cctgtgcacg 8220
 gcgggagatg caataggtca ggctctcgc aaactcccc atgtcaagca cttccggaat 8280
 cgggagcgcg gccgatgcaa agtgccgata aacataacga tctttgtaga aaccatcggc 8340
 gcagctatth acccgcagga catatccacg ccctcctaca tcgaagctga aagcacgaga 8400
 ttcttcgccc tccgagagct gcatcaggtc ggagacgctg tcgaactttt cgatcagaaa 8460

ES 2 658 622 T3

cttctcgaca gacgtcgcgg tgagttcag ctttttcata tctcattgcc cccccggatc 8520
 tgcgaaagct cgagagagat agattttag agagagactg gtgatttcag cgtgtcctct 8580
 ccaaatgaaa tgaacttcct tataatagagg aaggtccttc gaaggatagt gggattgtgc 8640
 gtcacccctt acgtcagtgg agatatcaca tcaatccact tgctttgaag acgtggttgg 8700
 aacgtcttct tttccacga tgetcctcgt ggggtgggggt ccatctttgg gaccactgtc 8760
 ggcagaggca tcttgaacga tagcctttcc tttatcgcaa tgatggcatt thtaggtgcc 8820
 accttccttt tctactgtcc tttgatgaa gtgacagata gctgggcaat ggaatccgag 8880
 gaggtttccc gatattacc tttgttgaag agtctcaata gccctttggg cttctgagac 8940
 tgtatctttg atattcttgg agtagacgag agtgtcgtgc tccaccatgt taccacatca 9000
 atccacttgc tttgaagacg tggttggaac gtcttctttt tccacgatgc tctcgtggg 9060
 tgggggtcca tctttgggac cactgtcggc agaggcactc tgaacgatag cctttccttt 9120
 atcgcaatga tggcatttgt aggtgccacc ttccttttct actgtccttt tgatgaagtg 9180
 acagatagct gggcaatgga atccgaggag gtttcccgat attacccttt gttgaaaagt 9240
 ctcaatagcc ctttggctct ctgagactgt atctttgata ttcttggagt agacgagagt 9300
 gtcgtgctcc accatgttgg caagctgtc tagccaatac gcaaaccgcc tctccccgcg 9360
 cgttggccga ttcattaatg cagctggcac gacaggtttc ccgactggaa agcgggcagt 9420
 gagcgcaacg caattaatgt gagttagctc actcattagg caccaccaggc tttacacttt 9480
 atgcttccgg ctcgatggt gtgtggaatt gtgagcggat aacaatttca cacaggaaac 9540
 agctatgacc atgattacga atttggccaa gtcggcctct aatacgactc actatagggg 9600
 getcggatcc cggggatcct ctagagtcca cctgcaggca tgcaagcttt ggaaagtgaa 9660
 gtggattggt ccaacacttt ggtacatcct ttcttatgca atgttggtac tgatttgctt 9720
 cttttggcct ccatcggaaa aaccaatgag gtatggatc aatctttctg tacttgcctt 9780
 ttatcaatcg ggtgcttatg tggcctggtt taagttccac actaagatct tgtctgtttt 9840
 gtactaacat gtttgaactt tgtatatctg atcttctctg ctgctagtta cacatttttc 9900
 tgatgtatat aactgggttt gaaattgcag gtacctatac gtagctgaca tggagggaaga 9960
 gactgaagaa gaagatgatc tctccactgc agaaaccggg atgaacgcaa caaaggctga 10020
 atacgagagg agtgaaagga agaccctget ggaagcattc atcctattgc ttgggaatat 10080
 accaggggag aagtgaaact ccccatctta caaagttacc gtccttttag cttaaactgc 10140
 ctacttctca tcttttttca gcttaagcta ctctaatca tctttttaa cctacggctt 10200
 taagtttttt ttttaactcat ataactctct gcagtagact tgacttaate ggattttctg 10260
 tttcatgaac ttgttggtag tgtggaacaa atgggaaaat gaatatTTTT ggaacaaatt 10320
 gatTTTTctgt tcatatttaa gttaaatcat tctgtttcca ctgaaataaa ttgttttcca 10380

ES 2 658 622 T3

aaaatcactc cgtttattat gtctttgttt ttaagaaata aaagtgagaa aacagaataa 10440
 cgcgaaaatg tcgacatatt tggctaagta tagacaagat tgggaagctc tgtttagtta 10500
 tgcgctcagtc tctcatcagt gttcaactgc cacggagcga accgattcct aattgcaacg 10560
 tcccgagtcc atagaatgtc gacactcttt cactctttct ccaagttgcc tcctttgagt 10620
 cctttctcat attttataga ctcaacttct gtttcttgat cccgaggaag aagaagaata 10680
 aactcttggt cccatggaag acggtgagct tgatttctcc aatcaggaag tgttttcgag 10740
 ttcggagatg ggtgaattac cacctagcaa ttgttcgatg gatagtttct ttgatgggct 10800
 tttaatggat actaatgctg cttgtacca cactcacacc tgtaacccca ctggaccaga 10860
 gaacactcat actcacacgt gcttccatgt ccacaccaag attctcccgg atgagagcga 10920
 tgaaaaagtt tctactgatg atacagctga gtcttggtgg aagaaggggtg aaaagagacc 10980
 tttgggaaac cgggaagcgg ttagaaagta tagagagaag aagaaggcta aagctgcttc 11040
 tttggaggat gagggtgcaa ggcttagggc ggtgaatcag cagctggtga agaggttgca 11100
 aaatcaggct accttggaag ctgaggtttc gaggcttaag tgtttgcttg tggatttgag 11160
 aggaagaata gatggagaga ttgatcttt tccttatcag aaacctatgg ctgcaaatat 11220
 tccttctttc tcgcacatga tgaatccttg taatgtacaa tgtgatgatg aagtttattg 11280
 ccctcagaat gtgtttgag tgaatagcca agaaggtgcc tcgatcaatg accaagggtt 11340
 aagtggttgt gattttgatc agctacaatg catggctaata cagaacttaa atggaaatgg 11400
 aaacggatca ttcagcaacg tcaatacatc tgtctcgaat aagagaaaag gtgggcatcg 11460
 tgcacatcaaga gcagtttgaa gcatcatcaa gcttgacta tctatttcca ccagcataga 11520
 tattgtattc caaataagtt gtagagttca gctgcaggat cagcttcgct caggttcctt 11580
 tgtatcctca tttttgtttt ttgtttctg actctcttc ccttccattg tatttccttg 11640
 ttgagcttga caaactagaa ggatgatata ttgttaatac aacaaactca aatgttctgt 11700
 gtgttcttgc catttgtttt catacttgag ctgcttcttc ttaaa 11745

5 <210> 5
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Artificial

 10 <220>
 <223> cebador

 <400> 5
 ggggacaagt ttgtacaaa aagcaggctt aactctgtt cccatgatc 49

 15 <210> 6
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Artificial

 20 <220>
 <223> cebador

 <400> 6
 ggggaccact ttgtacaaga aagctgggta tattattga ttctacag 48

 25 <210> 7
 <211> 10

ES 2 658 622 T3

	<212> ADN <213> Artificial	
	<220>	
5	<223> vector reportero del motivo de cebo G	
	<400> 7 atgtcgacay	10
10	<210> 8 <211> 28 <212> ADN <213> Artificial	
15	<220> <223> cebador	
	<400> 8 gaattcaagc ttggaaagt gaagtgga	28
20	<210> 9 <211> 22 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> cebador	
30	<400> 9 gagctccaat ttcaaaccag ta	22
	<210> 10 <211> 29 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> cebador	
40	<400> 10 gaattctgta tatctgatct tctctgctg	29
45	<210> 11 <211> 26 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> cebador	
50	<400> 11 gagctcaagc taaaaggacg gtaact	26
55	<210> 12 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> cebador	
	<400> 12 gaattcttca tcctattgct tgg	23
65	<210> 13 <211> 25	

ES 2 658 622 T3

	<212> ADN <213> Artificial	
5	<220> <223> cebador	
	<400> 13 gagctcatt tcccattgt tccac	25
10	<210> 14 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
15	<220> <223> cebador	
20	<400> 14 gaattctctg cagtagactt gac	23
25	<210> 15 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> cebador	
	<400> 15 gagctcccca atcttgctca t	21
35	<210> 16 <211> 30 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> cebador	
	<400> 16 atcggaattc gtgagaaaac agaataacgc	30
45	<210> 17 <211> 26 <212> ADN <213> Artificial	
50	<220> <223> cebador	
	<400> 17 gagctcccat ggaacaaga gtttat	26
55	<210> 18 <211> 30 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> cebador	
	<400> 18 atcggaattc gtgagaaaac agaataacgc	30
65	<210> 19 <211> 30	

ES 2 658 622 T3

	<212> ADN <213> Artificial	
5	<220> <223> cebador	
	<400> 19 cgtagagctc tggagaaaga gtgaaagagt	30
10	<210> 20 <211> 40 <212> ADN <213> Artificial	
15	<220> <223> cebador	
20	<400> 20 aatcatgctc gacatatgctc gacatatgctc gacacgagct	40
25	<210> 21 <211> 32 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> cebador	
35	<400> 21 cgtgtcgaca tatgtcgaca tatgtcgaca tg	32
40	<210> 22 <211> 22 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> cebador	
50	<400> 22 gatcttcgctc gatgttcttt gg	22
55	<210> 23 <211> 25 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> cebador	
65	<400> 23 tgagaggtat ggctacacca gcagc	25
	<210> 24 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> cebador	
	<400> 24 ggacacacac atggttcgac	20
	<210> 25 <211> 20	

ES 2 658 622 T3

	<212> ADN <213> Artificial	
5	<220> <223> cebador	
	<400> 25 gatagtgcag ccatgagtgg	20
10	<210> 26 <211> 25 <212> ADN <213> Artificial	
15	<220> <223> cebador	
20	<400> 26 cagaaacatg tttctcttc gtcac	25
25	<210> 27 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> cebador	
	<400> 27 cgcaataaat ccggtgaacg	20
35	<210> 28 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> cebador	
	<400> 28 cgggattgtt ggcgtggaat	20
45	<210> 29 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
50	<220> <223> cebador	
	<400> 29 ccaagaccct cgaagcattg	20
55	<210> 30 <211> 25 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> cebador	
	<400> 30 caataatcat aggaatatcg ctgg	25
65	<210> 31 <211> 20	

ES 2 658 622 T3

	<212> ADN <213> Artificial	
5	<220> <223> cebador	
	<400> 31 agaaagccat catggcagat	20
10	<210> 32 <211> 22 <212> ADN <213> Artificial	
15	<220> <223> cebador	
20	<400> 32 caatgttgat tgaatccttt gc	22
25	<210> 33 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> cebador	
35	<400> 33 ccatgagaat gtccttgga	20
40	<210> 34 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> cebador	
50	<400> 34 atatgttggc ggggtggcacg	20
55	<210> 35 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> cebador	
65	<400> 35 gctccctct ctgcttccg	20
70	<210> 36 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
75	<220> <223> cebador	
80	<400> 36 taataacaac cacgtcggag	20
85	<210> 37 <211> 20	

ES 2 658 622 T3

	<212> ADN <213> Artificial	
5	<220> <223> cebador	
	<400> 37 agcaaagctg tgtctcaaaa	20
10	<210> 38 <211> 22 <212> ADN <213> Artificial	
15	<220> <223> cebador	
20	<400> 38 ttctcccgga tgagagcgat ga	22
25	<210> 39 <211> 22 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> cebador	
	<400> 39 gctgattcac cgccctaagc ct	22
35	<210> 40 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> cebador	
	<400> 40 taatcagctg ttgaagaggt	20
45	<210> 41 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
50	<220> <223> cebador	
	<400> 41 tcatgtatga gtaaggcacg	20
55	<210> 42 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> cebador	
	<400> 42 tctcaggatc agcaagagaa	20
65	<210> 43 <211> 21	

ES 2 658 622 T3

	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
5	<223> cebador	
	<400> 43	
	tcagttcca ccatttcttg g	21
10	<210> 44	
	<211> 10	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> Elemento de respuesta a la deficiencia de zinc	
	<400> 44	
20	rtgtcgacay	10

Reivindicaciones

- 5 1. Método para cambiar la capacidad de una planta para su adaptación a los cambios en la concentración de zinc en el ambiente, especialmente el suelo, que comprende proporcionar a dicha planta con un nucleótido que codifica una proteína bZIP19 y/o bZIP23, cuyas secuencias se proporcionan en la sec. con núm. de ident.: 2 y la sec. con núm. de ident.: 1, respectivamente, u ortólogos de estas, en donde los ortólogos han retenido la función de bZIP19 o bZIP23 y tienen una secuencia de aminoácidos que es idéntica en un 90 % o más a la de bZIP19 o bZIP23, y sobreexpresar dicha(s) proteína(s).
- 10 2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde se aumenta la tolerancia a una deficiencia de Zn.
3. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha planta es capaz de hiperacumular zinc.
- 15 4. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha planta es capaz de aumentar las concentraciones de zinc en las partes comestibles.
5. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde a dicha planta se le proporciona un nucleótido que codifica una proteína bZIP19 y un nucleótido que codifica una proteína bZIP23.
- 20 6. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde a dicha planta se le proporciona adicionalmente uno o más polinucleótidos que codifican una proteína seleccionada del grupo que consiste en transportadores de metales pesados, proteínas YSL, proteínas ZIP o IRT, proteínas ZIF, proteínas NAS, proteínas MRP, FRD3 y MTP.
- 25 7. Método de acuerdo con la reivindicación 6, en donde las proteínas de transportadores de metales pesados se escogen del grupo de HMA2, HMA3 o HMA4.
8. Método de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la proteína YSL es YSL, preferentemente YSL1 o YSL3.
- 30 9. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde el polinucleótido se deriva de *Arabidopsis*, con mayor preferencia *A. thaliana*.
- 35 10. Uso de un nucleótido que codifica una proteína bZIP19 y/o bZIP23, cuyas secuencias se proporcionan en la sec. con núm. de ident.: 2 y la sec. con núm. de ident.: 1, respectivamente, u ortólogos de estas, en donde los ortólogos han retenido la función de bZIP19 o bZIP23 y tienen una secuencia de aminoácidos que es idéntica en un 90 % o más a la de bZIP19 o bZIP23, para cambiar la capacidad de una planta para su adaptación a cambios en la concentración de zinc en el ambiente, especialmente el suelo, en donde dicho uso comprende transformar una planta con secuencias que codifican una o ambas proteínas.
- 40 11. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9 o uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el ortólogo se escoge del grupo que consiste en ortólogos de *Populus trichocarpa* (PtrbZIP38 o XM_002305485.1 y PtrbZIP39 o XM_002313671.1); arroz (OsbZIP48 o AK071639.1), *Helianthus annuus* (CD852649.1), *Medicago truncatula* (TA25329_3880), *Solanum tuberosum* (TA33339_3880), *Glycine max* (TA50226_3847; TA50224_3847), *Sorghum bicolor* (TA23717_4558), *Zea mays* (TA111061_4577; TA111059_4577; CO451643), y *Hordeum vulgare* (TA45897_4513).
- 45

Figura 1

```

bZ IP 23 -----MDGGELEFSNSNMGG-----ELPSCSMDSFFDELLRDS-HACTHTHT 41
bZ IP 19 -----MEDGELDFSNQEVFSSSEMGELPFSNCSMDSFFDGLLMDTNAACTHTHT 49
bZ IP 24 MFCCCKDCRGNQRVSNFD SLTGVFFGDLEFGPQNQRYIKMNEEDDKDQDRVTRGCSHTHS 60
      ::          .::: . . . :          .*: . *          .*:***;

bZ IP 23 CNPPGPE-NTRTRTCLHVHTKILP----DKVSTDDTSES SGK---KRP LGNREAVRKYPE 93
bZ IP 19 CNPTGPE-NTRTRTCFHVHTKILPDESDEKVS TDDTAESCGKKGERP LGNREAVRKYRE 108
bZ IP 24 CNPPGPE DASHSHTCFRAHTHLIIS---QDQQENDHSDS SNK---KRLCGNREAVRKYRE 114
      ***.***  ;*:***:*.***:::  . . . :* :*. *  ** *****

bZ IP 23 KKKAKKASLEDEVMPLEKAVNNQLLKR LQQAALAEVTR LKCLLVD IRGRIDGEI GAFPY 153
bZ IP 19 KKKAKKASLEDEVARLRAVNQQLVKRLQNQATLEAEVSR LKCLLVD LRGRIDGEI GSFY 168
bZ IP 24 KKKARTAYLEDEVHRLQS LNEQFLRKLQSQEMVETELIRLRALLVEMQGKIEVELCSFSF 174
      *****: * ***** **:::***:***. *  :*: * :*.***:***: * : *.:

bZ IP 23 QKPAVTNVP-Y SYMMHPCNMQCDVDNLYCLQNG--NNGEGASMNEQGLNGCEF DQLECLA 210
bZ IP 19 QKPMANIP SF SHMNP CNVQCDDEVYCPQNVFGVNSQEGASINDQGLSGCDFDQLQMA 228
bZ IP 24 QK--QCNGSGFVF KEDGCNLATSN-----MMCEARVECEE 208
      ** * . . . ** :          * : :*:

bZ IP 23 NQNLAGEIPVCSNGIGTFTVNGSGVNKRKGE PRAAKAV 249
bZ IP 19 NQNLNGNGSFSN-----VNTSVSNKRKGGHRASRAV 261
bZ IP 24 GQTLHDP IQSFVQ-----PPF SR-- 228
      .* * . . . :          :
  
```

Figura 2

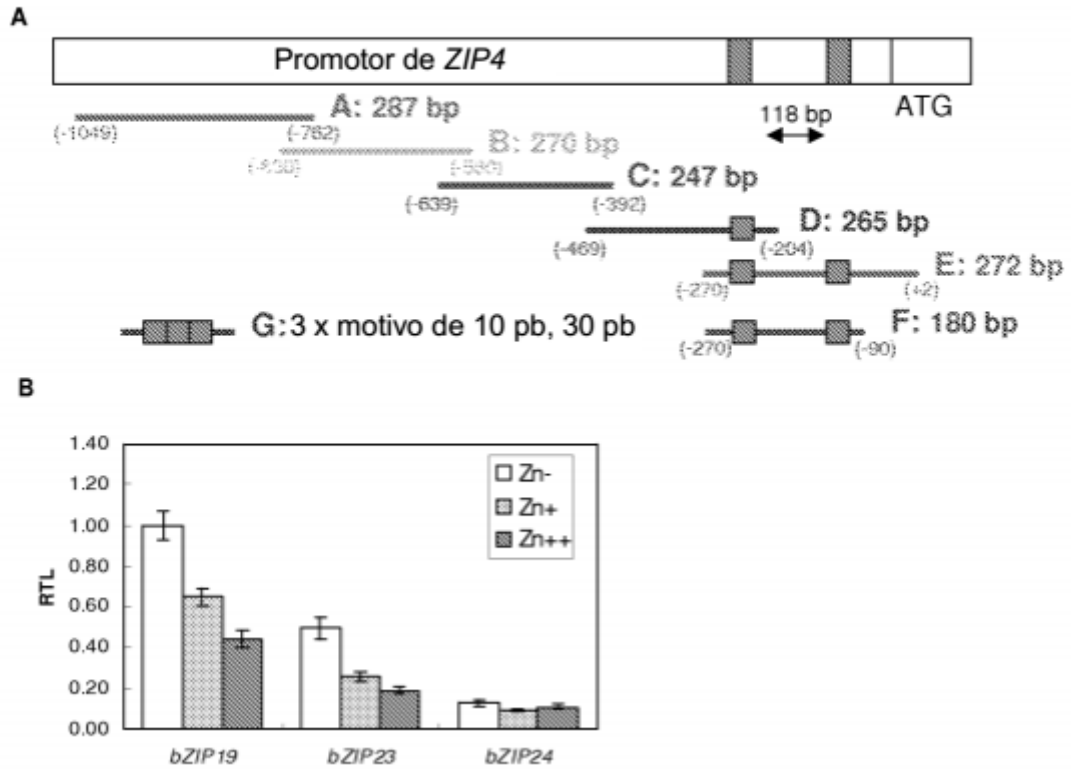


Figura 3

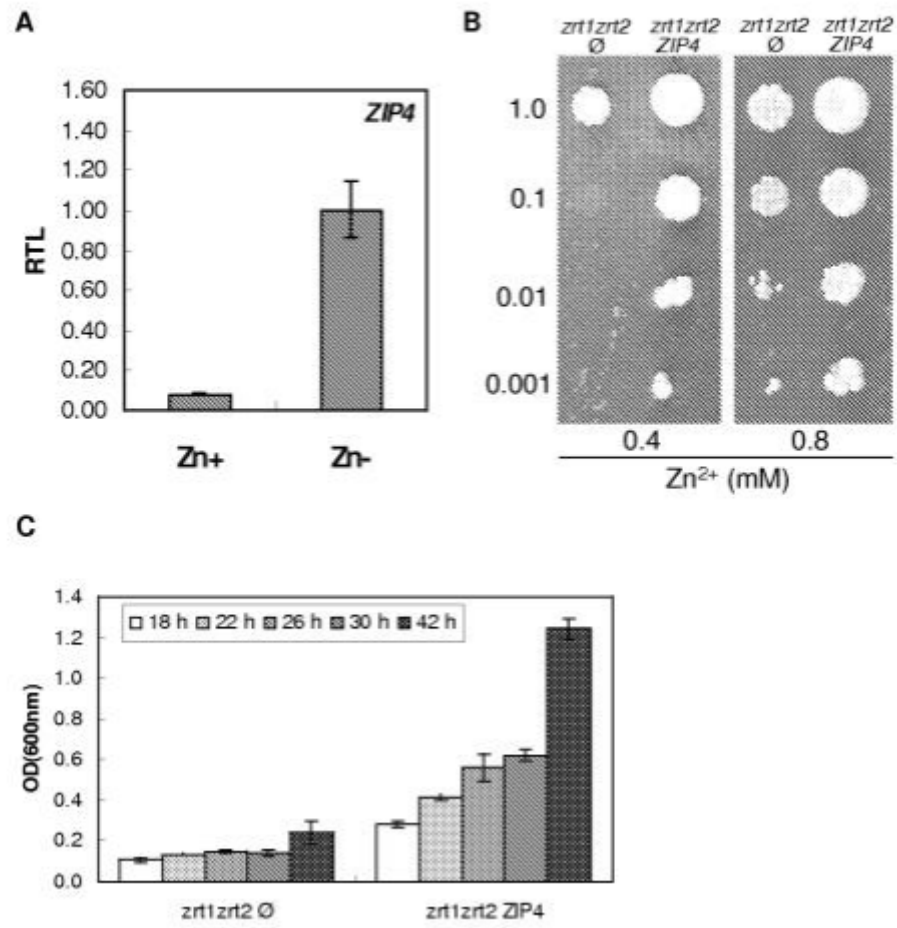


Figura 4

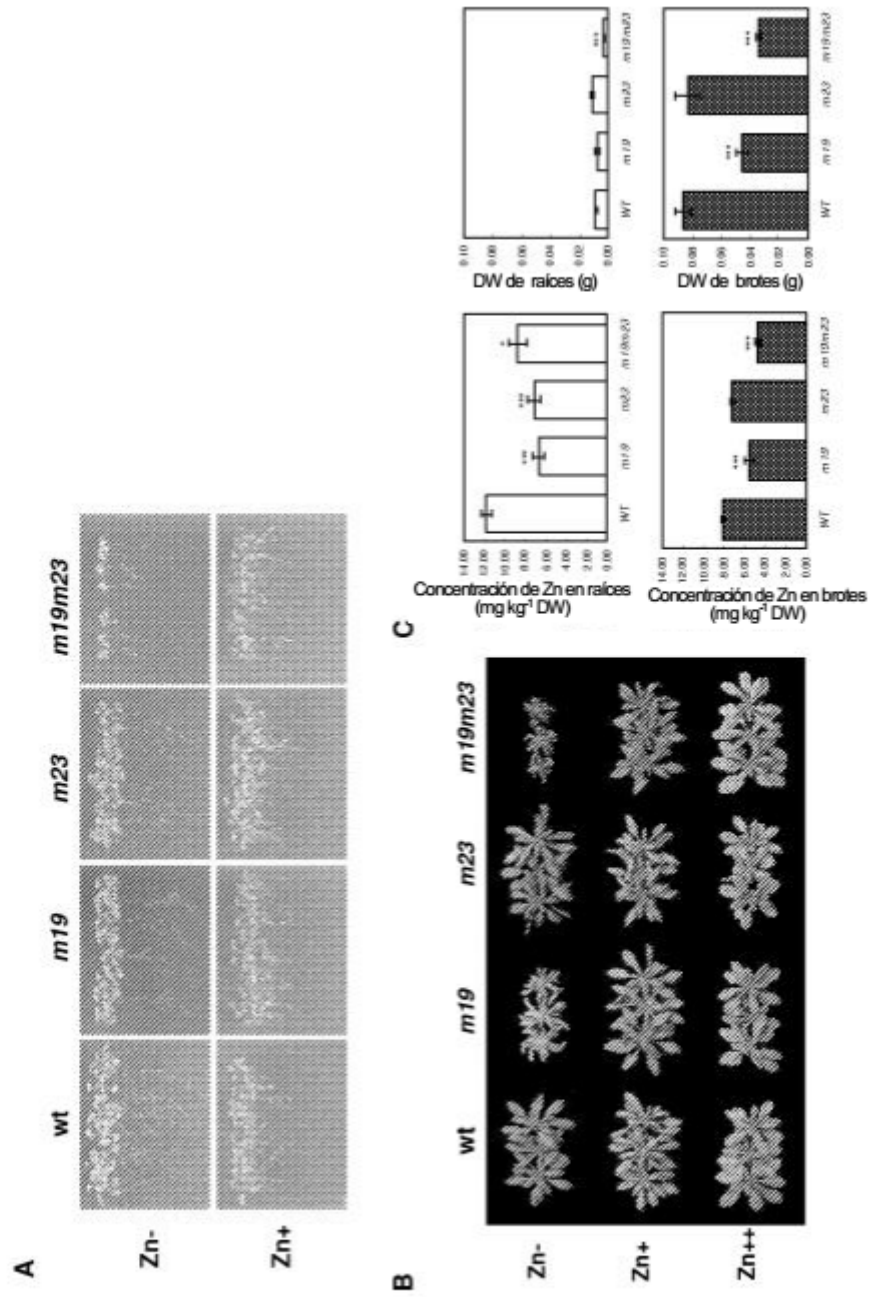


Figura 5A

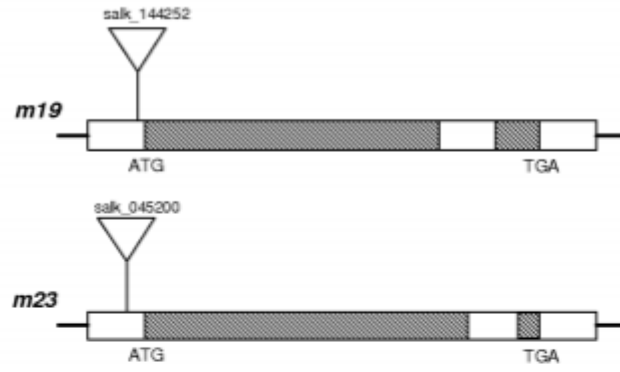


Figura 5B

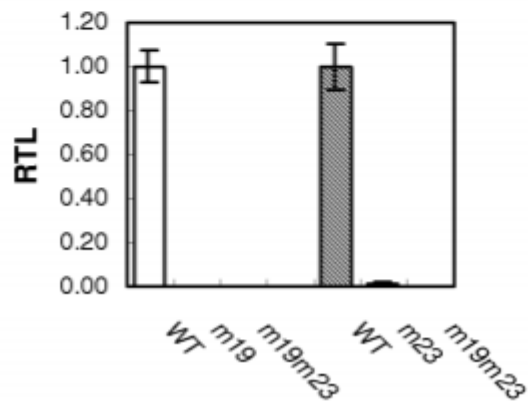


Figura 6

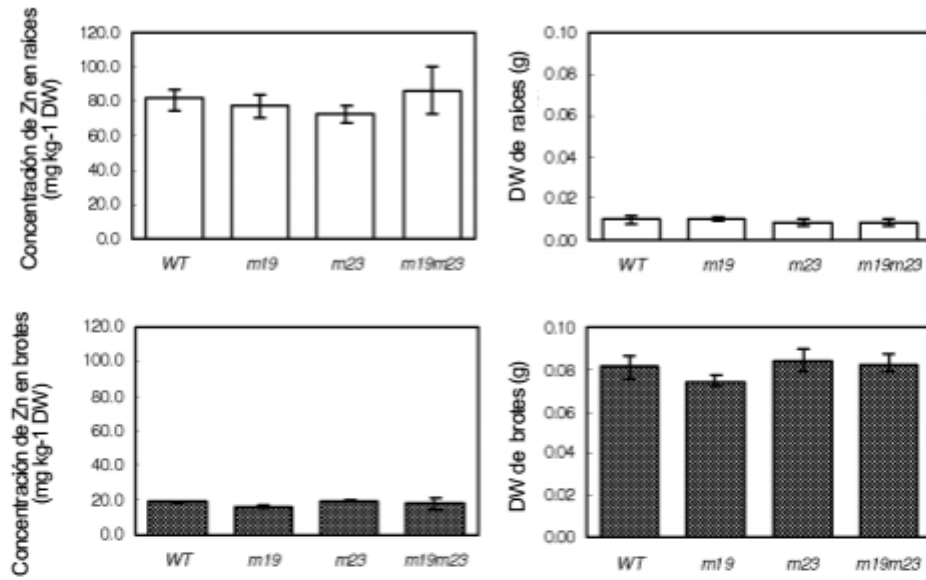


Figura 7

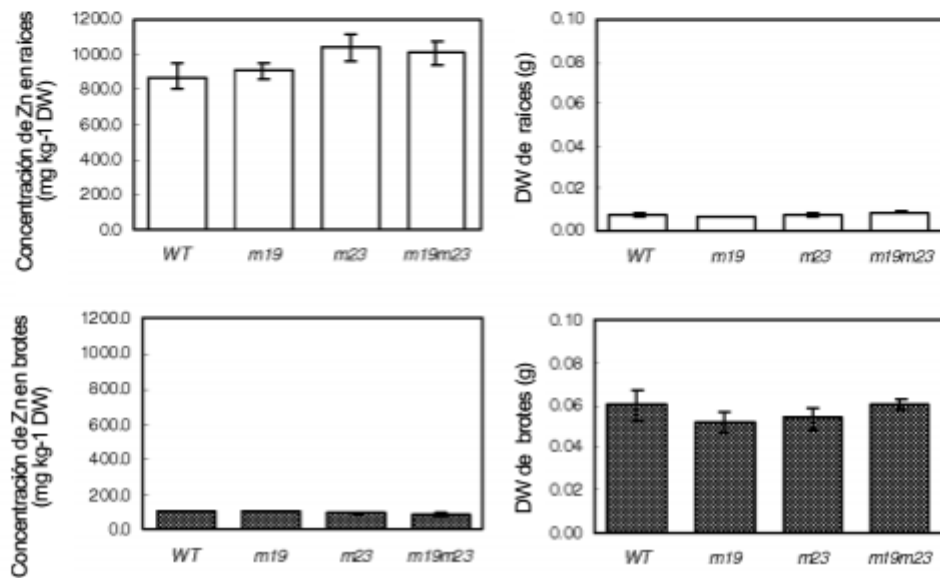


Figura 8

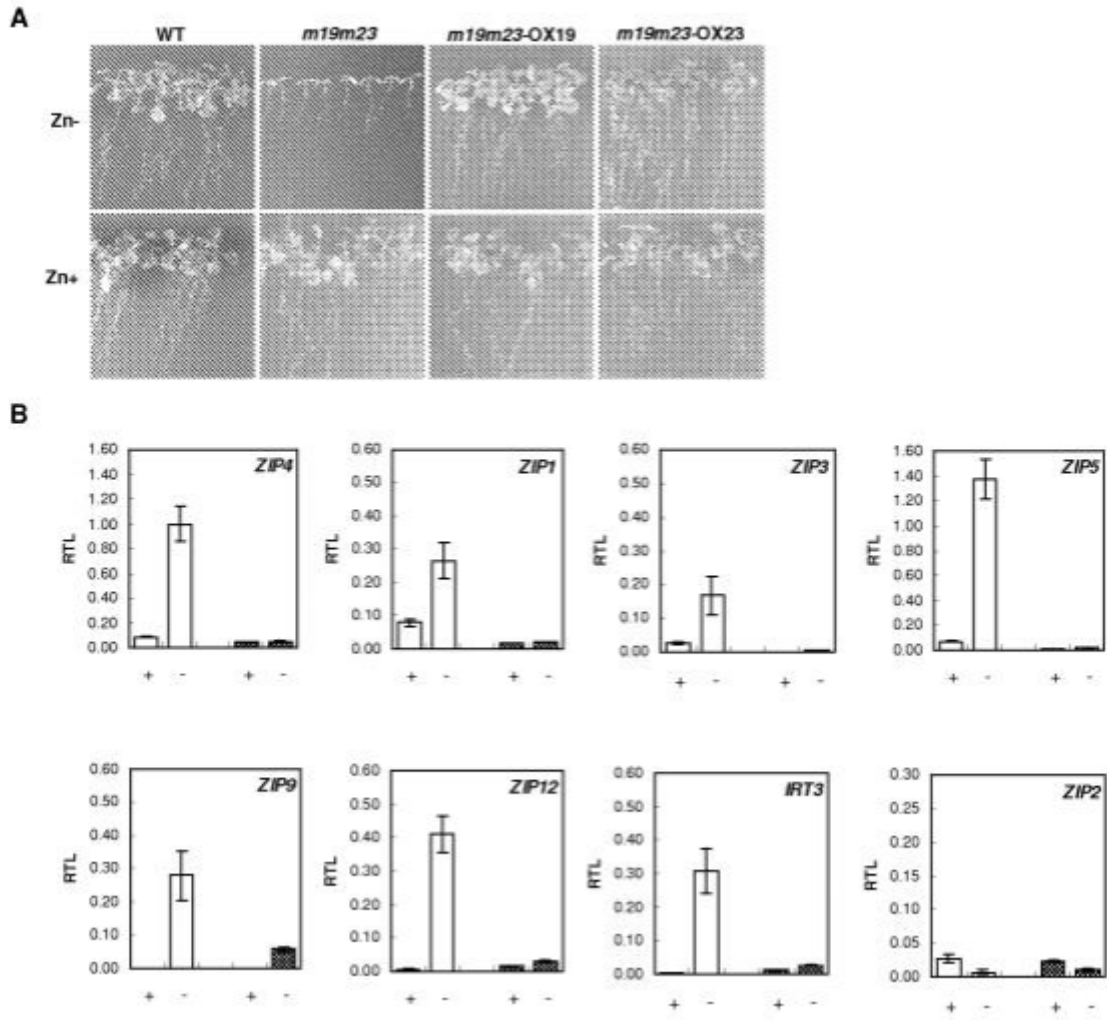


Figura 9

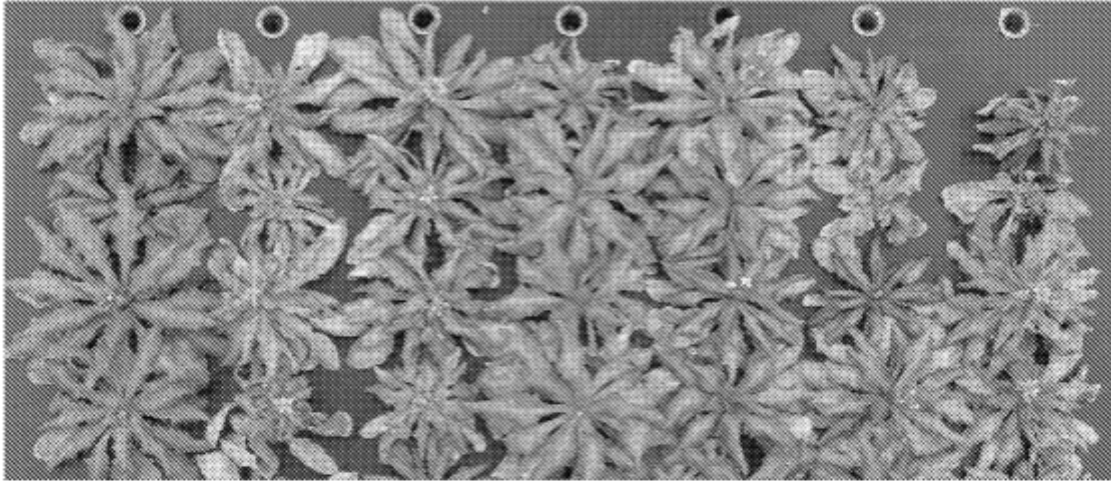


Figura 10

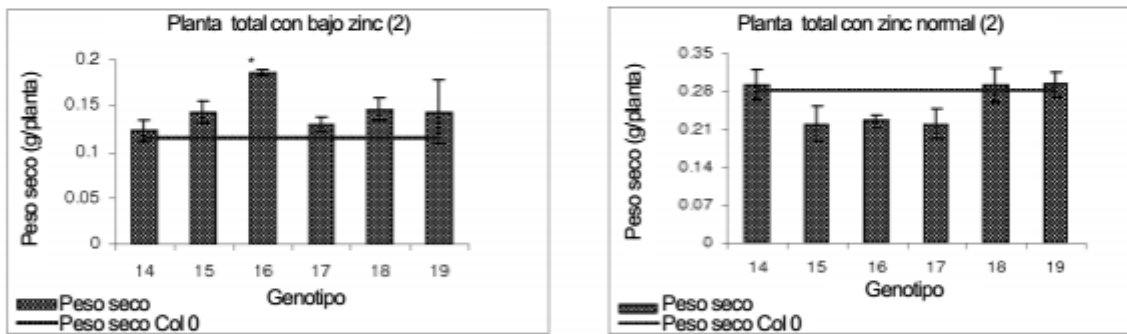


Figura 11

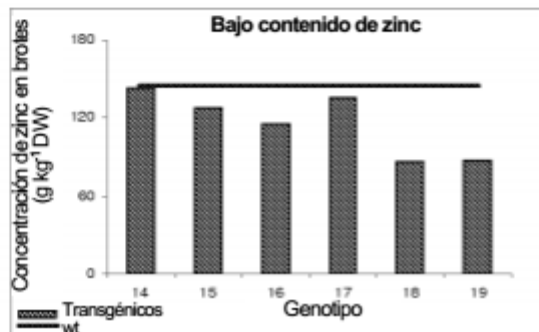


Figura 12

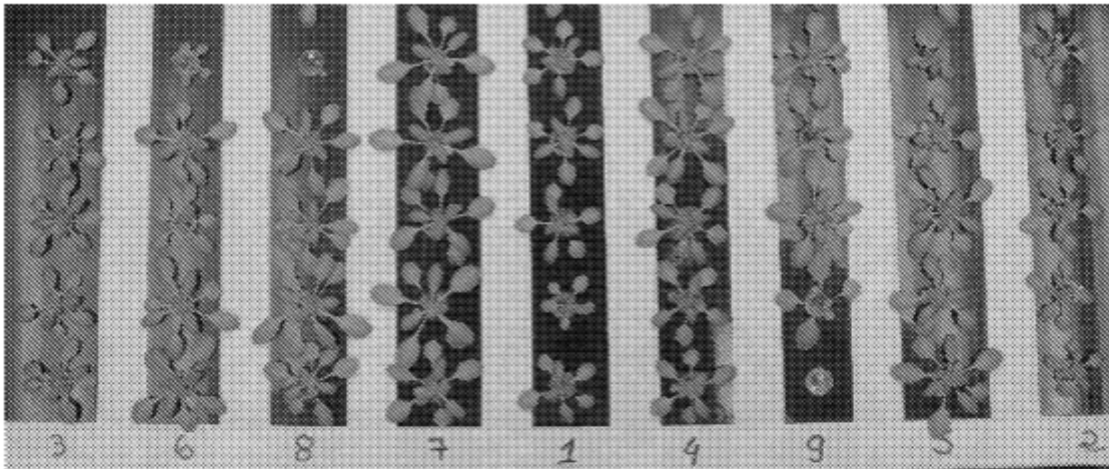


Figura 13

```

1  ctagagtcct  gctttaatga  gatatgcgag  acgcctatga  tcgcatgata  tttgctttca
61  attctgttgt  gcacgttgta  aaaaacctga  gcatgtgtag  ctcagatcct  taccgccggt
121  ttcggttcat  tctaataaat  atatcaccog  ttactatcgt  atttttatga  ataatattct
181  ccgttcaatt  tactgattgt  accctactac  ttatatgtac  aatattaaaa  tgaaaacaat
241  atattgtgct  gaataggttt  atagcgacat  ctatgataga  gcgccacaat  aacaaacaat
301  tgcgttttat  tattacaaat  ccaattttta  aaaaagcggc  agaaccggct  aaacctaaaa
361  gactgattac  ataaatctta  ttcaaatttc  aaaagtgcc  caggggctag  tatctacgac
421  acaccgagcg  gcgaactaat  aacgctcact  gaagggaact  ccggttcccc  ccggcgcgca
481  tgggtgagat  tccttgaagt  tgagtattgg  ccgtccgctc  tacgaaagt  acgggcacca
541  ttcagcgaca  acatgctgag  gctcagcagg  acctgcaggc  atgcaaaaaa  aaaaactagt
601  gatgcatatt  ctatagtgtc  acctaaatct  gcggccgctg  accaagttag  ctactgtggc
661  actggccgct  gttttacaac  gtcgtgactg  ggaaaaccct  ggcgttacc  aacttaatcg
721  ccttgagca  catccccctt  tcgccagctg  gcgtaatagc  gaagaggccc  gcaccgatcg
781  cccttcccaa  cagttgcgca  gcctgaatgg  cgaatgctag  agcagcttga  gcttggatca
841  gattgtcggt  tcccgccttc  agtttaaact  atcagtgttt  gacaggatat  attggcgggt
901  aaacctaaaga  gaaaagagcg  tttattagaa  taacggatat  taaaagggc  gtgaaaaggt
961  ttatccgctt  gtccatttgt  atgtgcatgc  caaccacagg  gtccccctcg  ggtcaaagt
1021  actttgatcc  aaccctccg  ctgctatagt  gcagtccgct  tctgacgttc  agtgcagccg
1081  tcttctgaaa  acgacatgct  gcacaagtcc  taagttacgc  gacaggctgc  cgccctgcc
1141  ttttctggt  gttttcttgt  cgcgtgtttt  agtcgcataa  agtagaatac  ttgcgactag
1201  aaccggagac  attacgccat  gaacaagagc  gccgccgctg  gcctgctggg  ctatgcccg
1261  gtcagcaccg  acgaccagga  cttgaccaac  caaccggccg  aactgcacgc  ggccggctgc
1321  accaagctgt  ttccgagaa  gatcaccggc  accaggcgcg  accgcccgga  gctggccagg
1381  atgcttgacc  acctacgccc  tggcgacgtt  gtgacagtga  ccaggctaga  ccgctggcc
1441  cgcagcacc  gcgacctact  ggacattgcc  gagcgcatcc  aggaggccgg  cgcgggctg
1501  cgtagcctgg  cagagccgtg  ggccgacacc  accacgcccg  ccggccgcat  ggtgttgacc
1561  gtgttcgccg  gcattgccga  gttcgagcgt  tcctaataca  tcgaccgcac  ccggagcggg
1621  cgcgagggcg  ccaaggcccg  aggcgtgaag  tttggcccc  gccctacct  caccgccgca
1681  cagatcgctc  acgcccgcga  gctgatcgac  caggaaggcc  gcaccgtgaa  agaggcggct
1741  gcactgcttg  cgtgcatcg  ctcgaccctg  taccgcgcac  ttgagcggag  cgaggaagtg
1801  acgcccaccg  aggccaggcg  gcgcggtgcc  ttccgtgagg  acgattgac  cgaggccgac
1861  gccctggcgg  ccgcccagaa  tgaacgcaa  gaggaaacaag  catgaaaccg  caccaggacg
    
```

1921 gccaggacga accgtttttc attaccgaag agatcgaggc ggagatgatc gcgggccgggt
 1981 acgtgttcga gccgcccgcg cacgtctcaa ccgtgcccgt ccgatgaaatc ctggccgggt
 2041 tgtctgatgc caagctggcg gcctggccgg ccagcttggc cgctgaagaa accgagcgcc
 2101 gccgtctaaa aaggatgatg gtatttgagt aaaacagctt gcgcatgcg gtgctgctg
 2161 atatgatgcg atgagtaaat aaacaaatac gcaaggggaa cgcatgaagg ttatcgctgt
 2221 acttaaccag aaaggcgggt caggcaagac gaccatcgca acccatctag cccgcgccct
 2281 gcaactcgcc ggggcccgatg ttctgttagt cgattccgat ccccagggca gtgcccgcga
 2341 ttgggcccgc gtgcccgaag atcaaccgct aaccgttgtc ggcatcgacc gcccgcagat
 2401 tgaccgcgac gtgaaggcca tcggcccggc cgacttcgta gtgatcgacg gacgcacca
 2461 ggcggcggac ttggctgtgt ccgcatcaa ggcagccgac ttcgtgctga ttccgggtca
 2521 gccaaagccct tacgacatat gggccaccgc cgacctggtg gagctgggta agcagcgcat
 2581 tgaggtcacg gatggaaggc tacaagcggc ctttgtcgtg tcgcccggca tcaaaggcac
 2641 gcgcatcggc ggtgaggttg ccgaggcgct ggcccgggtac gagctgcca ttcttgagt
 2701 ccgtatcacg cagcgcgtga gctaccagg cactgcccgc gccggcaca ccgttcttga
 2761 atcagaacc gaggggcagc ctgcccgcga ggtccaggcg ctggccgctg aaattaatc
 2821 aaaactcatt tgagttaatg aggtaaaggc aaaatgagca aaagcacaaa cacgctaagt
 2881 gccggcccgc cgagcgcacg cagcagcaag gctgcaacgt tggccagcct ggcagacacg
 2941 ccagccatga agcgggtcaa ctttcagttg ccggcggagg atcacaccaa gctgaagatg
 3001 tacgcggtac gccaaaggca gaccattacc gagctgctat ctgaatacat cgcgcagcta
 3061 ccagagtaaa tgagcaaatg aataaatgag tagatgaatt ttagcggcta aaggaggcgg
 3121 catggaaaac caagaacaac caggcaccga cgccgtggaa tgccccatgt gtggaggaa
 3181 gggcgggttg ccaggcgtaa gcggctgggt tgtctgccgc ccctgcaatg gcctggaac
 3241 cccaagccc gaggaatcgg cgtgacggtc gcaaaccatc cggcccggta caaatcggcg
 3301 cggcgtggg tgatgacctg gtggagaagt tgaaggccgc gcaggccgcc cagcggcaac
 3361 gcatcgaggc agaagcacgc cccggtgaat cgtggcaagc ggccgctgat cgaatccgca
 3421 aagaatccc gcaaccgcg gcagccggtg cgccgtcgat taggaagccg cccaagggcg
 3481 acgagcaacc agatTTTTTc gttccgatgc tctatgacgt gggcaccgcc gatagtcgca
 3541 gcatcatgga cgtggccggt tccgctgtg cgaagcgtga ccgacgagct ggcgaggtga
 3601 tccgctacga gttccagac gggcacgtag aggtttccgc agggccggcc ggcattggca
 3661 gtgtgtggga ttacgacctg gtactgatgg cggtttccca tctaaccgaa tccatgaacc
 3721 gataccggga agggaaaggga gacaagcccg gccgctggtt ccgtccacac gttgcccagc
 3781 tactcaagtt ctgcccgcga gccgatggcg gaaagcagaa agacgacctg gtagaaacct
 3841 gcattcgggt aaacaccacg cacgttgcca tgcagcgtac gaagaaggcc aagaacggcc
 3901 gcctgggtgac ggtatccgag ggtgaagcct tgattagccg ctacaagatc gtaaagagcg
 3961 aaaccgggca gccggagtac atcgagatcg agctagctga ttggatgtac cgcgacatca
 4021 cagaagcga gaaccggac gtgctgacgg ttcaccccga ttactttttg atcgatcccg
 4081 gcatcggccg ttttctctac cgcctggcac gccgcgccgc aggcaaggca gaagccagat
 4141 ggttgttcaa gacgatctac gaacgcagtg gcagcgcgg agagttcaag aagtctctgt
 4201 tcaccgtcgc caagctgatc gggtcaaaatg acctgccgga gtacgatttg aaggaggagg
 4261 cggggcaggc tggcccgatc ctagtcatgc gctaccgcaa cctgatcgag ggcgaagcat
 4321 ccgcccgttc ctaatgtacg gagcagatgc tagggcaaat tgccctagca ggggaaaaag
 4381 gtcgaaaaag tctctttcct gtggatagca cgtacattgg cgtacattgg gaacccaaag
 4441 ggaaccggaa cccgtacatt gggaaaccaa agccgtacat tgggaaccgg tcacacatgt
 4501 aagtgactga tataaaagag aaaaaaggcg atttttccgc ctaaaactct ttaaaactta
 4561 ttaaaactct taaaaccgcg ctggcctgtg cataactgtc tggccagcgc acagccgaag
 4621 agctgcaaaa agcgcctacc cttcgggtcgc tgcgctccct acgccccgcc gcttcgctc
 4681 ggccatcgc gcccgctggc cgctcaaaaa tggctggcct acggccaggc aatctaccag
 4741 ggcgcggaca agccgcgcg tcgccactcg accgcggcg cccacatcaa ggcaccctgc
 4801 ctgcgcggt tcggtgatga ccggtgaaaac ctctgacaca tgcagctccc ggagaccgtc
 4861 acagcttgtc tgtaagcggg tggcgggagc agacaagccc gtcagggcgc gtcagcgggt
 4921 gttggcgggt gtcggggcgc agccatgacc cagtcacgta gcgatagcgg agtgtatact
 4981 ggcttaacta tgcggcatca gagcagattg tactgagagt gcaccatag cgggtgtaaa
 5041 taccgcacag atgctgaagg agaaaatacc gcatcaggcg ctcttccgct tctcgcctca
 5101 ctgactcgct gcgctcggtc gttcggctgc ggcgagcgg atcagctcac tcaaaggcgg
 5161 taatacgggt atccacgaa tcaggggata acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc
 5221 agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg cgttgctggc gtttttccat aggctccgcc
 5281 ccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac
 5341 tataaagata ccaggcgtt ccccctggaa gctccctcgt gcgctctcct gttccgacct
 5401 tgccgcttac cggatacctg tccgccttcc tcccttccgg aagcgtggcg ctttctcata
 5461 gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc
 5521 accgaacccc cgttcagccc gaccgctgcg ccttatccgg taactatcgt cttagctcca
 5581 acccgtaag acacgactta tcgccactgg cagcagccac tggtaacag attagtcag
 5641 cgaggatgt aggcgggtct acagagttct tgaagtgggt gcctaactac ggctacacta

5701 gaaggacagt atttggtatc tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg
 5761 gtagctcttg atccggcaaaa caaaccaccg ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc
 5821 agcagattac ggcgagaaaa aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt tctacggggg
 5881 ctgacgctca gtggaacgaa aactcacggt aagggatttt ggtcatgcat tctaggtact
 5941 aaaacaattc atccagtaaa atataatatt ttattttctc ccaatcaggc ttgatcccca
 6001 gtaagtcaaa aaatagctcg acatactggt cttccccgat atcctccctg atcgaccgga
 6061 cgcagaaggc aatgtcatal cacttgtccg ccctgccgct tctcccaaga tcaataaagc
 6121 cacttacttt gccatctttc acaaagatgt tgctgtctcc caggtcgcgg tgggaaaaga
 6181 caagttcctc ttcgggcttt tccgtcttta aaaaatcata cagctcgcgc ggatctttaa
 6241 atggagtgtc ttcttcccag ttttcgcaat ccacatcggc cagatcgtta ttcagtaagt
 6301 aatccaattc ggctaagcgg ctgtctaagc tctctcagta tttctcagta gatatgtcga
 6361 tggagtgaaa gagcctgatg cactccgatc acagctcgat aatcttttca gggctttggt
 6421 catcttcata ctcttccgag caaaggacgc catcggcctc actcatgagc agattgtctc
 6481 agccatcatg ccgttcaaaag tgcaggacct ttggaacagg cagctttcct tccagccata
 6541 gcatcatgtc cttttcccggt tccacatcat aggtggtccc tttataccgg ctgtccgta
 6601 tttttaaata taggttttca ttttctccca ccagcttata taccttagca ggagacattc
 6661 tctccgcatc ttttacgcag cggatttttt cगतcagttt tttcaattcc ggtgataattc
 6721 ctattttagc catttaatat ttccttctc ttttctacag tatttaaaaga taccceaaaga
 6781 agctaattat aacaagacga actccaattc actgttctct gcattctaaa accttaaaata
 6841 ccagaaaaca gctttttcaa agttgttttc aaagttggcg tataacatag tatcgacgga
 6901 gccgattttg aaaccgcggt gatcacaggc agcaacgctc tgtcatcgtt acaatcaaca
 6961 tgctaccctc cgcgagatca tccgtgtttc aaaccgcgca gcttagttgc cgttcttccg
 7021 aatagcatcg gtaacatgag caaagtctgc cgccttaca cggctctccc gctgacgccg
 7081 tcccgcactg atgggctgcc tgtatcgagt ggtgattttg tgccgagctg ccggctgggg
 7141 agctgttggc tggctggtgg caggatata tgtggtgtaa acaaattgac gcttagacaa
 7201 ctttaataaca cattgcggac gtttttaatg tactgaatta acgccgaatt aattcggggg
 7261 atctggattt tagtactgga ttttggtttt aggaattaga aattttattg atagaagat
 7321 tttacaaaata caaatacata ctaagggttt cttatctgct caacacatga gcgaaacct
 7381 ataggaaccc taattccctt atctgggaac tactcacaca ttattatgga gaaactcgag
 7441 cttgtccttc gacagatccg gtcggcatct actctatttc tttgccctgc gacgagtgct
 7501 gggcgctcgg tttccactat cggcgagtac ttctacacag ccatcggctc agacggcgc
 7561 gcttctcggc gcgattttgt tacgccggac agtcccggct ccggatcggga cgattgcgtc
 7621 gcatcgaccc tgcgccaaag ctgcatcacc gaaattgccc tcaaccaagc tctgatagag
 7681 ttggtcaaga ccaatgcgga gcatatacgc ccggagctgt ggcgatcctg caagctccgg
 7741 atgectccgc tcgaagtgc gcgtctgctg ctccatacaa gccaaaccag gcctccagaa
 7801 gaagatgttg ggcacctcgt attgggaaac cccgaacatc gcctcgtccc agtcaatgac
 7861 cgctgttatg cggccattgt ccgtcaggac attgttggag ccgaaatccg cgtgcacgag
 7921 gtgccggact tcggggcagt cctcggcca aagcatcagc tcatcgagag cctgcgcgac
 7981 ggacgcactg acgggtgctg ccatcacagt ttgccagtga tacacatggg gatcagcaat
 8041 cgcgcatatg aaatcacgcc atgtagtga ttgaccgatt ccttgcggtc cgaatgggcc
 8101 gaacccgctc gtctggttaa gatcggccgc agcgatcgca tccatagcct ccgcgaccgg
 8161 ttgtagaaca gggggcagtt cggtttcagg caggtcttgc aacgtgacac cctgtgacg
 8221 gggggagatg caataggtca ggctctcgtc aaactcccca atgtcaagca cttccggaat
 8281 cgggagcggc gccgatgcaa agtgcgata aacataacga tctttgtaga aacctcggc
 8341 gcagctattt acccgcagga catatccacg cctcctaca tcgaagctga aagcacgaga
 8401 ttcttcgccc tccgagagct gcatcaggtc ggagacgctg tcgaactttt cgatcagaaa
 8461 cttctcgaca gacgtcgcgg tgagttcagg ctttttcata tctcattgcc cccccgatc
 8521 tgcgaaagct cgagagagat agatttttag agagagactg gtgatttcag cgtgtcctct
 8581 ccaaataaaa tgaacttctc tatatagagg aaggtcttgc gaaggatagt gggattgtgc
 8641 gtcacccctt acgtcagtgg agatatacaca tcaatccact tgctttgaag acgtggttgg
 8701 aacgtcttct ttttccacga tgctcctcgt ggggtgggggt ccatctttgg gaccactgtc
 8761 ggcagaggca tcttgaacga tagcctttcc tttatcgcaa tgatggcatt tgtaggtgcc
 8821 accttctttt tctactgtcc tttttagtaa gtgacagata gctgggcaat ggaatccgag
 8881 gaggtttccc gatattacc tttgttgaaa agtctcaata gccctttggt cttctgagac
 8941 tgtatctttg atattcttgg agtagacgag agtgtcgtgc tccaccatgt tatcacatca
 9001 atccacttgc tttgaagacg tggttggaac gtcttctttt tccacgatgc tctctgtggg
 9061 tgggggtcca tctttgggac cactgtcggc agaggcatct tgaacgatag ccttctgttt
 9121 atcgcaatga tggcatttgt aggtgccacc ttccttttct actgtccttt tgatgaagtg
 9181 acagatagct gggcaatgga atccgaggag gtttcccgat attacccttt gttgaaaagt
 9241 ctcaatagcc ctttggctct ctgagactgt atctttgata ttcttggagt agacgagagt
 9301 gtcgtgctcc accatgttgg caagctgctc tagccaatac gcaaaccgcc tctccccgcg
 9361 cgttggccga ttcattaatg cagctggcac gacaggtttc ccgactggaa agcggggcagt
 9421 gagcgcaacg caattaatgt gagttagctc actcattagg caccaccaggc tttacacttt

```

9481 atgcttccgg ctcgtatggt gtgtggaatt gtgagcggat aacaatttca cacaggaaac
9541 agctatgacc atgattacga atttggccaa cctgcgctct aatcagctc actatagggg
9601 gctcgggtacc cggggatcct cttagagtca cctgcaggca tgcaagcttt ggaaagtgaa
9661 gtggattggt ccaacacttt ggtacatcct ttcttatgca atgttggtag tgatttgctt
9721 cttttggcct ccatcggaaa aaccaatgag gtatggtatc aatctttctg tacttgccct
9781 ttatcaatcg ggtgcttatg tggcctgttt taagtccac actaagatct tgtctgtttt
9841 gtactaacat gtttgaactt tgtatatctg atcttctctg ctgctagtta cacatttttc
9901 tgatgtatat atactggttt gaaattgcag gtacctatac gttagctgaca tggaggaaga
9961 gactgaagaa gaagatgac tctccactgc agaaaccggt atgaacgcaa caaaggctga
10021 atacgagagg agtgaagga agaccctgct ggaagcattc atcctattgc ttgggaatat
10081 accaggggag aagtgaact ccccatctta caaagttacc gtccttttag cttaagctgc
10141 ctacttctca tcctttttca gcttaagcta ctctaatca tccttttaaa cctacggctt
10201 taagtttttt ttaactcat ataactttct gcagtagact tgacttaatc ggattttctg
10261 tttcatgaac ttgttggtag tgtggaacaa atgggaaaaat gaatattttt ggaacaaatt
10321 gattttctgt ttcataattaa gttaaatcat tctgtttcca ctgaaataaa ttgttttcca
10381 aaaatcactc cgtttattat gctttgtttt ttaagaaata aaagtgagaa acagaataaa
10441 cgcgaaaatg tcgacatatt tggctaagta tagacaagat tgggaagctc tgtttagtta
10501 tgcgtcagtc tctcatcagt gttcaactgc cacggagcga accgattcct aattgcaacg
10561 tcccgagtcc atagaatgtc gacactcttt cactctttct ccaagttgcc tcctttgagt
10621 cttttctcat attttataga ctacttttct gtttcttgat cccgaggaag aagaagaata
10681 aactcttggt cccatggaag acggtgagct tgattttctc aatcaggaag tgttttcgag
10741 ttcggagatg ggtgaattac cactagcaa tctgtcgatg gatagtttct ttgatgggct
10801 ttaaatggat actaatgctg cttgtaccca cactcacacc tgaacccca ctggaccaga
10861 gaacactcat actcacacgt gcttccatgt ccacaccaag attctccgg atgagagcga
10921 tgaaaaagtt tctactgatg atacagctga gtcttgtggg aagaaggggtg aaaagagacc
10981 ttggggaaac cgggaagcgg ttgaaagta tagagagaag aagaaggcta aagctgcttc
11041 tttggaggat gaggttgcaa ggcttagggc ggtgaatcag cagctggtga agaggttgca
11101 aaatcaggct accttggaa gctgaggttc gaggttaag tgtttgcttg tggatttgag
11161 aggaagaata gatggagaga ttgatcttt tccttatcag aaacctatgg ctgcaaatat
11221 tccttctttc tcgcacatga tgaatccttg taatgtacaa tgtgatgatg aagtttattg
11281 cctcagaat gtgtttggag tgaatagcca agaaggtgcc tcgatcaatg accaaggggt
11341 aagtggttgt gattttgatc agctacaatg catggcta atcagaacttaa atggaaatgg
11401 aaacggatca tcagcaacg tcaatacatc tgtctcgaat aagagaaaag gtgggcatcg
11461 tgcatacaaga gcagtttgaa gcatcatcaa gcttgacta tctatttcca ccagcataga
11521 tttgtattc caaataagtt gtagagttca gctgcaggat cagcttcgct caggttcctt
11581 tgtatcctca tttttgtttt ttgtttctg actctcttcc ccttccattg tatttcttg
11641 ttgagcttga caaactagaa ggatgatata ttgttaatac aacaaactca aatgttctgt
11701 gtgttcttgc catttgtttt catacttgag ctgcttcttc ttaa
    
```

