Organización y
Digitalización CSA Ltda.

CSA836271

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

INVENTARIO

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCIÓN

21. **EXPEDIENTE No.** 10-85354

54. **TÍTULO** PLANTAS TRANSGENICAS MODIFICADAS PARA REDUCIR EL TRANSPORTE DE CADMIO, PRODUCTOS DERIVADO Y METODOS RELACIONADOS

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL**

71. **SOLICITANTE** PHILIP MORRIS PRODUCTS S.A.

DOMICILIO LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
C.C. 35.456.344 de Usaquén

74. **APODERADO**

22. **BOGOTÁ, D.C.,**

(FORMA P-10)

13-02-2010

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-085354- -00000-0000
Fecha: 2010-07-13 16:38:45 Dep: 2020 DIR NULVASCR
Tra: 11 PATENTES II Lve: 378 FASE NACIONAL I
Act: 411 PRESENTACION Folios: 310

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

1 SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención. ☐ Patente de Modelo de Utilidad.
☒ Capítulo I. ☐ Capítulo II.

2 SOLICITANTE (71)

Nombre: **PHILIP MORRIS PRODUCTS S.A.**
Sociedad constituida y existente bajo las leyes de Suiza.

Dirección: Quai Jeanrenaud 3,
CH-2000 Neuchâtel,
Suiza

Domicilio: Neuchâtel,
Suiza

IDENTIFICACIÓN
C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____
Número _____

3 REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
Teléfono: 347 36 11
Fax: 211 86 50
E-mail: clientes@cavelier.com
Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN
C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____
Número 35.456.344 T.P 23.555

4 INVENTOR (ES) (72)

1. **Alec HAYES**
11006 Brandy Oaks Boulevard,
Chesterfield,
Virginia 23832,
Estados Unidos de América

2. **Chengalrayan KUDITHIPUDI**
15201 Tomahawk Meadows Lane,
Midlothian,
Virginia 23112,
Estados Unidos de América.

3. **Rutger VAN DER HOEVEN**
1413 Camberly Court,
Midlothian,
Virginia 23113,
Estados Unidos de América

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2008/010546 Fecha: 11 de diciembre de 2008
Publicación Internacional No. WO 2009/074325 A1 Fecha: 18 de junio de 2009

6 Título (54)

PLANTAS TRANSGÉNICAS MODIFICADAS PARA REDUCIR EL TRANSPORTE DE CADMIO, PRODUCTOS DERIVADOS, Y MÉTODOS RELACIONADOS

7 Clasificación Internacional (51) C12N 015/082 C07K 16/16
A01H 5/00

8 Prioridad SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
US	13 de diciembre de 2007	60/996,982

9

Comprobante de pago No.: 10-42,145 **Fecha:** 24 de mayo de 2010
Comprobante de pago No.: 10-48,328 **Fecha:** 15 de junio de 2010
Comprobante de pago No.: 10-55,138 **Fecha:** 06 de julio de 2010

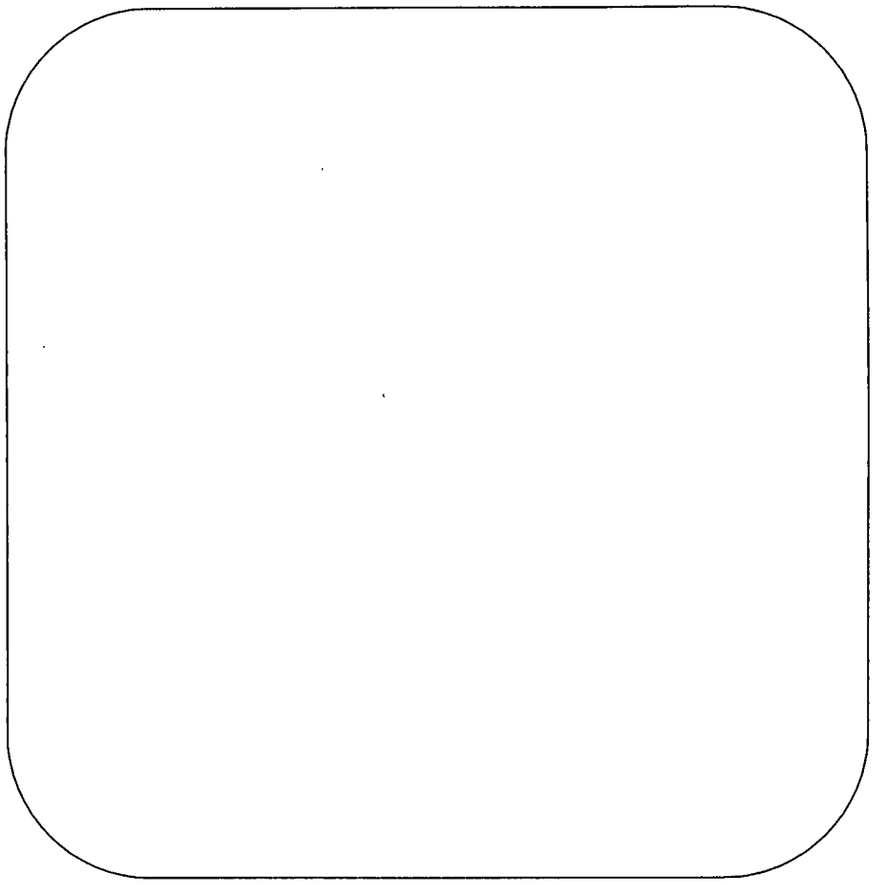
10

Anexos:

- [x] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por $ 554.000.oo.
- [x] Comprobante de pago por 8 reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por $208.000.oo.
- [x] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- [x] Poderes, si fuere el caso.
- [ ] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- [ ] Declaraciones.
- [x] Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [x] Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [ ] Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- [ ] Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- [ ] De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- [ ] De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- [ ] De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- [ ] Arte final 12x12
- [ ] De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- [x] Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA



12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

FIRMA : Luz Clemencia De Paez

C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P. 23.555

SCT

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2009/074325 A1

   Descripción:

   Páginas 56 en el idioma original

   Páginas 83 en español

   Reivindicaciones: Número (s) 16

   Figuras: Número (s) 8

2. ☒ **Forma PCT/ISA/210.** Informe de Búsqueda Internacional.

3. ☒ Listado de Secuencias.

4. ☒ Extracto de publicación.

NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA FASE INTERNACIONAL

Notaría Sexta 6

DEL CIRCULO DE BOGOTA, D.C.

COPIA NUMERO 3

DE LA ESCRITURA NUMERO: 1.444
FECHA: 19/Marzo/2010

ACTO O CONTRATO:
PODER GENERAL
OTORGANTES:
PHILIP MORRIS PRODUCTS S.A.
LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

ICONTEC
CERTIFICADO DE GESTION DE LA CALIDAD
CERTIFICADO SC 3980-1
PRESTACION DEL SERVICIO PUBLICO NOTARIAL
ISO 9001:2000
NTC-ISO 9001:2000

CERTIFIED IQNet MANAGEMENT SYSTEM

AMPARO QUINTERO ARTURO

NOTARIA SEXTA

CARRERA 9 No. 69-31 - PBX: 317 01 00 - FAX: 314 56 41
Correo Electrónico: notaria6debgta@etb.net.co

ESCRITURA PUBLICA NUMERO - - - 1444- - - - - - -

-- MIL CUATROCIENTOS CUARENTA Y CUATRO - - - - - -

DE FECHA: MARZO DIECINUEVE (19) - - - - - - -

DEL AÑO DOS MIL DIEZ (2.010) - - - - - - - - -

OTORGADA EN LA NOTARIA SEXTA (6a) DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. ----------

CLASE DE ACTO O CONTRATO: **PODER ESPECIAL** ----------

DE: **CAVELIER ABOGADOS** ----------

A : **LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ, NIDIA OSORIO LÓPEZ, OSCAR FERNANDO CORREA BARBOSA, EDNA DARMELY SARMIENTO CHARRY y JORGE CHAVARRO ARIZTIZABAL** ----------

En la ciudad de Bogotá D.C. República de Colombia, ante mí, AMPARO QUINTERO ARTURO - - - Notaria sexta (6a.) de éste círculo notarial, se otorgó la presente escritura pública que se consigna en los siguientes términos: ----------

COMPARECENCIA: Con minuta escrita, compareció el señor **CARLOS ALBERTO GALLÓN GIRALDO**, mayor de edad, vecino de esta ciudad, casado, identificado con la cédula de ciudadanía No. 19.066.425 de Bogotá, y dijo:---------

ESTIPULACIONES: ----------

PRIMERA.- Que obra en su calidad de representante legal de la sociedad denominada **CAVELIER ABOGADOS** domiciliada en la **Carrera 4 No. 72-35, Bogotá, Colombia.** ----------

SEGUNDA: Que **PHILIP MORRIS PRODUCTS S.A.**, sociedad constituida y existente bajo las leyes de Suiza, domiciliada en Neuchâtel, Suiza, designó a **CAVELIER ABOGADOS** como su representante para la Propiedad Industrial en Colombia con facultades de nombrar apoderados tal como consta en la copia auténtica del documento de representación que se protocoliza.----------

TERCERA.- Que en su carácter de representante legal de **CAVELIER ABOGADOS**, y en desarrollo de la facultad otorgada por **PHILIP MORRIS PRODUCTS S.A.**, confiere poder a los abogados **LUZ CLEMENCIA DE PAEZ,** T.P.A. No. 23.555, identificada con cédula de ciudadanía número 35.456.344 de Usaquen, **NIDIA OSORIO LOPEZ**, T.P.A. No.73.366, identificada con cédula de ciudadanía número 39.787.682 de Bogotá, **OSCAR FERNANDO CORREA BARBOSA**, T.P.A. No. 71.027 identificado con cédula de ciudadanía número

IMPRESO EN ENERO 1º DE 2010 POR POLYPRINT EDITORIAL LTDA. - NIT 830.029.955-5

PAPEL DE USO EXCLUSIVO DEL PROTOCOLO NOTARIAL . NO TIENE COSTO PARA EL USUARIO

79.524.634 de Bogotá, **EDNA DARMELY SARMIENTO CHARRY**, T.P.A. 65.794 identificada con cédula de ciudadanía número 52.006.265 de Bogotá y **JORGE CHAVARRO ARIZTIZABAL**, T.P.A. No. 40.119, identificado con cédula de ciudadanía número 16.209.380 de Cartago (Valle), mayores de edad, vecinos de Bogotá, para que representen a la sociedad a cuyo nombre actúa, ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, incluyendo las del orden administrativo, contencioso administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: ----------

a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, diseños industriales, trazado de circuitos integrados, secretos industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, variedades vegetales, denominaciones de origen e indicaciones de procedencia, su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos ----------

b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones, cancelación administrativa o judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales y de nombres de dominio junto con su administración y pago; y en general los procesos civiles, penales, administrativos o contencioso- administrativos, de conciliación, arbitramento, tutela relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. ----------

CUARTO.- Que los apoderados designados están facultados en todos los asuntos arriba determinados para sustituir este mandato, transigir, conciliar, arbitrar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar y ratificar los actos de agentes oficiosos. ----------

QUINTO- Que protocoliza con la presente escritura, un certificado expedido por la Cámara de Comercio de Bogotá, que acredita la constitución y personería de la sociedad **CAVELIER ABOGADOS,** igualmente protocoliza copia autenticada del documento de representación otorgado el día 02 de Diciembre de 2009 - - - por **PHILIP MORRIS PRODUCTS S.A.,** documento que está debidamente legalizado ----------

6

18.0

...(nosotros), abajo firmado (s)/a (s), the undersigned

PHILIP MORRIS PRODUCTS S.A.

domiciliado (s)
en/of Neuchâtel, Switzerland

Por el presente nombramos a CAVELIER ABOGADOS, sociedad colectiva constituida de conformidad con las leyes de la República de Colombia, mediante Escritura Pública No. 6233 del 10 de septiembre de 1974, otorgada en la Notaría Sexta del Círculo de Bogotá, domiciliada en Bogotá D.C., con matrícula mercantil No. 00820237 y NIT 860041367-3, domiciliada en la Carrera 4a Nº 72-35, Bogotá, Colombia, como nuestra representante en todos los asuntos de Propiedad Industrial, con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales.

CAVELIER ABOGADOS también podrá representarnos, con las mismas facultades arriba indicadas, ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, autoridades administrativas o jurisdiccionales, tribunales de arbitramento, en asuntos de naturaleza civil, comercial, penal, constitucional, competencia, competencia desleal, administrativa, contencioso administrativa, protección del consumidor, variedades vegetales, nombres de dominio, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, acciones de tutela, la protección de secretos industriales, derecho regulatorio y en general para que nos represente en cualesquiera acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan.

La representante podrá, en nuestro nombre, designar apoderados para actuar ante autoridades administrativas y judiciales, por vía extrajudicial y también procesalmente en nuestro nombre, como demandantes, como demandados, como litisconsortes, como agentes oficiosos, como terceros, por llamamiento en garantía o como intervinientes ad excludendum. Dentro de esta autorización, la representante podrá facultar a los apoderados que ella designe para transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir,

Do hereby appoint CAVELIER ABOGADOS, a general partnership organized under the laws of the Republic of Colombia by means of Public Deed No. 6233 of September 10, 1974, granted at Notary Sixth of the Bogota Circuit, domiciled in Bogota D.C., with Mercantile Registration No. 00820237 and Taxpayer Identification Number 860041367-3, domiciled at Carrera 4a Nº 72-35, Bogota, Colombia, as our representative for all Industrial Property matters with faculty to receive notifications and appoint attorneys in and out of Court.

CAVELIER ABOGADOS may also represent us, with the same faculties stated above, before any entities or persons, with or without jurisdiction, administrative or jurisdictional authorities, courts of arbitration, in civil, commercial, criminal, constitutional, competition, unfair competition, administrative, administrative contentious, consumer protection, plant varieties, domain names, opposition or observation matters, administrative and Court cancellation, nullity, precautionary measures, licensing, action for writ mandamus, protection of trade secrets, regulatory law and in general represent us in any actions and suits instituted by us or against us.

The representative may, in our name, designate attorneys to act before administrative and judicial authorities, through out-of-court channels, and also procedurally in our name as plaintiff, defendant, joint litigant, representative without power of attorney, third party, when summoned to appear in court or as intervener ad excludendum. Under this authorization, the representative may empower the attorneys appointed thereby to compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign and substitute the

© CAVELIER ABOGADOS

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE ME FUE PRESENTADO A LA VISTA
BOGOTA D.C., REPUBLICA DE COLOMBIA
19 MAR. 2010
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

Por/by _____

_____

Firma/Signature _____

Nota:

PARA SOCIEDADES

El documento de Representación deberá ser firmado por el representante legal de la compañía, autenticado ante Notario Público y legalizado*.

El Notario deberá certificar: i) que la compañía existe; ii) que ejerce su objeto social; y iii) que la persona que firma está autorizada para otorgar este documento.

*La legalización podrá ser por Apostilla si el país del otorgante hace parte de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961 o ante el Cónsul de Colombia en caso contrario.

PARA PERSONAS NATURALES

El documento de Representación deberá ser firmado por el otorgante: El Notario Público deberá certificar que la persona que firma es quien dice ser.

Posteriormente el documento de Representación deberá ser legalizado por Apostilla si el país del otorgante hace parte de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961 o ante el Cónsul de Colombia en caso contrario.

Note:

FOR CORPORATIONS

The Representation document ought to be signed by the legal representative of the company, notarized and legalized*.

The Notary Public must certify: i) that the company legally exists; ii) that it is in exercise of its corporate purposes; and iii) that the person who signs the Representation document is authorized to do so.

* Legalization may be made by Apostille if the issuing country is a member of the The Hague Convention of October 5, 1961, or before the Colombian Consulate if otherwise.

FOR INDIVIDUALS

The Representation should be signed by the grantor. The Notary Public should certify that the person signing is who he/she purports to be.

Subsequently, the Representation document should be legalized by Apostille if the issuing country is a member of the The Hague Convention of October 5, 1961 or before the Colombian Consulate if otherwise.

© CAVELIER ABOGADOS

Aurélie Nusbaum, Counsel

PHILIP MORRIS PRODUCTS S.A.
2000 NEUCHATEL

Stefan Kaiser
Patent Counsel
Philip Morris Products S.A.

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
19 MAR. 2010
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

7

LEGALISATION : ----------

Vu pour légalisation de la signature sociale de Philip Morris Products S.A., à Neuchâtel, apposée ci-devant par:----------

- M. Stefan Kaiser, né le 19 mars 1971, originaire d'Allemagne, à Neuchâtel, Patent Counsel ----------
- Mme Aurélie Nusbaum, née à Oullins (France), le 31 janvier 1973, française, fille de Gérard, divorcée, domiciliée à Saint-Légier-La Chiésaz (VD), Counsel ----------

qu'elles engagent par leur signature collective à deux.----------

Neuchâtel, le deux décembre deux mille neuf (2 décembre 2009) ----------

Rép. Gén. Vol. 84 No 97----------

Blaise Stucker Notaire Neuchâtel

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Pays: Suisse

   Le présent acte public

2. a été signé par Me Blaise Stucker,
3. agissant en qualité de notaire,
4. est revêtu du sceau/timbre de Me Blaise Stucker, notaire à Neuchâtel/Suisse

Attesté

5. à Neuchâtel — 6. le 02/12/2009
7. par la chancellerie d'Etat
8. sous No 2616
9. Sceau/timbre — 10. Signature

Chancellerie d'Etat

Séverine Despland

RÉPUBLIQUE ET CANTON DE NEUCHÂTEL Chancellerie

Fr. 25.--

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA

19 MAR. 2010

AMPARO OLIVEROS ARTURO NOTARIA

TRADUCCION OFICIAL NO.155/2010.-

EL TEXTO QUE SIGUE ES TRADUCCION FIEL Y COMPLETA DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLES Y FRANCES. LLEVA LA FIRMA Y EL SELLO DE HELENA URIBE DE LEMOINE, TRADUCTORA E INTÉRPRETE OFICIAL POR RESOLUCION NO. 3618 DEL MINISTERIO DE JUSTICIA DE COLOMBIA, DE FECHA 6 DE SEPTIEMBRE, 1972.

TRADUCCIÓN DE LOS SELLOS QUE SE ENCUENTRAN EN EL PODER OTORGADO POR **PHILIP MORRIS PRODUCTS S.A.**, DOMICILIADA NEUCHATEL, SUIZA, A **CAVELIER ABOGADOS**

PHILIP MORRIS PRODUCTS S.A. 2000 NEUCH ÂTEL

FIRMADO: AURELIE NUSBAUM, ASESOR

FIRMADO: STEFAN KAISER, ASESOR DE PATENTE

LEGALIZACION

VISTO PARA LEGALIZACION DE LA FIRMA SOCIAL DE PHILIP MORRIS PRODUCTS S.A. DE NEUCHATEL, COLOCADAS POR:

- SEÑOR STEFAN KAISER, NACIDO EL 19 DE MARZO DE 1971, ORIGINARIO DE ALEMANIA, EN NEUCHATEL, ASESOR DE PATENTE.

- SEÑORA AURELIE NUSBAUM , NACIDA EN OUILLINS, FRANCIA, EL 31 DE ENERO DE 1973, FRANCESA, HIJA DE GERARD, DIVORCIADA, DOMICILIADA EN SAINT-LEGIER-LA CHIÉSAZ (VD), ASESOR QUIENES COMPROMETEN A LA SOCIEDAD CON SUS FIRMAS CONJUNTAS.

NEUCHÂTEL, 2 DE DICIEMBRE DE 2009.
REP.GEN. VOL.84 NO. 97
FIRMADO: BLAISE STUCKER, NOTARIO EN NEUCHÂTEL.

HELENA URIBE DE LEMOINE
RES No 3618 SEPT 5 1972 MINISTERIO JUSTICIA
TRADUCTORA OFICIAL

1

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
19 MAR. 2010
AMPARO OYANTEPO ARTURO
NOTARIA

8

TRADUCCION OFICIAL NO.155/2010.-

APOSTILLA

(CONVENCIÓN DE LA HAYA DEL 5 DE OCTUBRE 1961)

1. PAÍS: SUIZA

EL PRESENTE DOCUMENTO PÚBLICO

2. HA SIDO FIRMADO POR: ABOGADO **BLAISE STUCKER**
3. ACTUANDO EN SU CALIDAD DE: NOTARIO
4. LLEVA EL SELLO DE: ABOGADO BLAISE STUCKER, NOTARIO EN NEUCHÂTEL.

CERTIFICADO

5. EN: NEUCHATEL
6. EL: 2 DE DICIEMBRE DE 2009
7. POR: LA CANCILLERIA DE ESTADO
8. BAJO EL NO. **2616**
9. SELLO: REPÚBLICA Y CANTÓN DE NEUCHÂTEL
10. FIRMADO: SÉVERINE DESPLAND

LA TRADUCTORA OFICIAL

HELENA URIBE DE LEMOINE

HELENA URIBE DE LEMOINE
RES No 3618 SEPT 5 1972 MINISTERIO JUSTICIA
TRADUCTORA OFICIAL

1
2

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
19 MAR. 2010
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

01

90848228

CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE CHAPINERO

16 DE MARZO DE 2010 HORA 11:18:42

R027783853 PAGINA: 1 de 3

* *

****
* EN JUNIO DE ESTE AÑO SE ELEGIRAN JUNTA DIRECTIVA Y REVISOR FISCAL *
* DE LA CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA. LAS INSCRIPCIONES DE *
* CANDIDATOS DEBEN HACERSE EN LA PRIMERA QUINCENA DE MAYO. *
* PARA INFORMACION DETALLADA DIRIGIRSE A LA SEDE PRINCIPAL, QUINTO *
* PISO, O COMUNICARSE AL SIGUIENTE TELEFONO: 5941000 EXTENSION 2899.*
****

CERTIFICADO DE EXISTENCIA Y REPRESENTACION LEGAL O INSCRIPCION DE DOCUMENTOS

CERTIFICA:

NOMBRE : CAVELIER ABOGADOS
N.I.T. : 860041367-3
DOMICILIO : BOGOTA D.C.

CERTIFICA:

NO: 00820237

CERTIFICA:

CONSTITUCION : QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 0006233 DE NOTARIA SEXTA DE BOGOTA D.C. DEL 10 DE SEPTIEMBRE DE 1974 , INSCRITA EL 26 DE SEPTIEMBRE DE 1974 BAJO EL NUMERO 00021334 DEL LIBRO IX, SE CONSTITUYO LA SOCIEDAD CIVIL DENOMINADA: CAVELIER PERDOMO Y CAVELIER.

CERTIFICA :

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 0001000 DE NOTARIA SEXTA DE BOGOTA D.C. DEL 10 DE MARZO DE 1983 , INSCRITA EL 5 DE ABRIL DE 1983 BAJO EL NUMERO 00130769 DEL LIBRO IX, LA SOCIEDAD CAMBIO SU NOMBRE DE : CAVELIER PERDOMO Y CAVELIER. POR EL DE : CAVELIER ABOGADOS

CERTIFICA:

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NUMERO 1.000 OTORGADA EN LA NOTARIA 6A. DE BOGOTA EL 10 DE MARZO DE 1.983, INSCRITA EN ESTA CAMARA DE COMERCIO EL 5 DE APRIL DE 1.983 BAJO EL NUMERO 130769 DEL LIBRO IX, LA SOCIEDAD CAMBIO SU NOMBRE DE: CAVELIER PERDOMO Y CAVELIER, POR EL DE: CAVELIER ABOGADOS, E INTRODUJO OTRAS REFORMAS.

CERTIFICA:

CERTIFICA

QUE POR E.P.NO. 2.024 DE LA NOTARIA 6 DE SANTAFE DE BOGOTA DEL 18 DE ABRIL DE 1.995, INSCRITA EL 27 DE APRIL DE 1.995 BAJO EL NO. 5.937 DEL LIBRO XIII,LA SOCIEDAD TRASLADO SU DOMICILIO DE LA CIUDAD DE SANTAFE DE BOGOTA D.C. AL MUNICIPIO DE TABIO (CUNDINAMARCA).-.

CERTIFICA:

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 7710 DE LA NOTARIA SEXTA DE BOGOTA DEL 10 DE OCTUBRE DE 1984, INSCRITA EL 15 DE NOVIEMBRE DE 1984 BAJO EL NO. 1559 DEL LIBRO XIII, LA SOCIEDAD CAMBIO SU

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
19 MAR. 2010
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

NATURALEZA JURIDICA DE SOCIEDAD: COMERCIAL A SOCIEDAD CIVIL.

CERTIFICA:

REFORMAS:

ESCRITURAS NO.	FECHA	NOTARIA	INSCRIPCION
842	10-V-1.977	18. BTA.	27-V-1.977-NO. 46.204
3.430	1-VII-1.980	6A. BTA.	3-IX-1.980-NO. 89.582
4.844	10-IX-1.980	6A. BTA.	8-X-1.980-NO. 91.261
432	10-II-1.983	6A. BTA.	1-III-1.983-NO.129.337
7.710	10-X-1.984	6A. BTA.	15-XI-1.984-NO. 1.559
7.305	21-X-1.985	6A. BTA.	18-XI-1.985-NO. 1.906
2.567	29-IV-1.987	6A. BTA.	7-V- 1.987-NO. 2.386
4.278	3-VII-1.987	6A. BTA.	23-VII-1987 NO.215.652
2.657	25- IV-1.988	6A. BTA.	19- V -1988-NO. 2,740
9.033	21-XII-1.990	6A. BTA.	10- I - 1991-NO. 3.786
25	3- I -1.991	6A. BTA.	10- I - 1991-NO. 3.787
1.608	8-III-1.991	6A. BTA.	14-III- 1991-NO. 3.841
2.155	2-IV- 1.991	6A. BTA.	8-IV - 1991-NO. 3.862
797	7-II -1.991	6A. BTA.	7- V -1991-NO. 3.882
1.739	14-III-1.991	6A. BTA.	7- V -1991-NO. 3.881
5.886	21-VIII-1.991	6A. BTA	27-VIII-1991 NO. 4.019
8.596	4-XII -1.991	6A. BTA	16-III -1992 NO. 4.430
1.494	10-III -1.992	6A. BTA.	19-III -1992 NO. 4.436
4.205	8 -VII -1.992	6A. BTA.	15-VII -1992 NO. 4.554
8.829	16-XII -1.992	6A. BTA.	24-XII -1992 NO. 4.819
12	5-I -1.993	6 STAFE BTA	13-I -1993 NO. 4.850
4.877	29-VI -1.993	6 STAFE BTA	7-VII -1993 NO. 5.065
5.216	12-VII -1.993	6 STAFE BTA	16-VII -1993 NO. 5.077
ACTA NO.71	2-IX- 1.993	JUNTA DE SOCIOS	29-IX- 1993 NO. 5.174
2.034	18-IV- 1.995	6 STAFE BTA	27- IV -1995 NO. 5.937
2.227	25-IV-1.995	6 STAFE BTA	18-VIII-1.995 NO. 6.092
7.594	12-XII-1.995	6 STAFE BTA	19- XII-1.995 NO. 6.294
676	11- II-1.997	6 STAFE BTA	14- II -1.997 NO. 6.873

CERTIFICA:

REFORMAS:

E.P. NO.	FECHA	NOTARIA	CIUDAD	FECHA	NO.INSC.
0004506	1997/07/28	0006	BOGOTA D.C.	1997/09/02	00007115
0002103	1998/04/08	0006	BOGOTA D.C.	1998/04/21	00007426
0005326	1998/08/06	0006	BOGOTA D.C.	1998/08/13	00007544
0005538	1998/08/14	0006	BOGOTA D.C.	1998/08/27	00007564
0007760	1998/11/10	0006	BOGOTA D.C.	1998/11/12	00007644
0006709	1997/11/04	0006	BOGOTA D.C.	2000/12/04	00008481
0003034	2003/05/30	0006	BOGOTA D.C.	2003/06/04	00882729
0003786	2004/07/16	0006	BOGOTA D.C.	2004/07/28	00009703
0001432	2005/03/18	0006	BOGOTA D.C.	2005/04/07	00009917
0004818	2005/08/22	0006	BOGOTA D.C.	2005/08/26	00010008
0005506	2007/07/17	0006	BOGOTA D.C.	2007/07/24	00010841
5453	2009/10/19	0006	BOGOTA D.C.	2009/10/21	00012243

CERTIFICA:

VIGENCIA: QUE LA SOCIEDAD NO SE HALLA DISUELTA. DURACION HASTA EL 10 DE SEPTIEMBRE DE 2024 .

CERTIFICA:

OBJETO SOCIAL: LA SOCIEDAD TENDRA POR OBJETO : EL EJERCICIO DE LA ACTIVIDAD PROFESIONAL DE ABOGADOS. EN DESARROLLO DE ESTE OBJETO LA SOCIEDAD PODRA ADQUIRIR, CONTRAER OBLIGACIONES Y CELEBRAR TODA CLASE DE CONTRATOS DIRECTAMENTE RELACIONADOS Y SUBORDINADOS AL MISMO, INCLUSIVE LOS DE ARRENDAMIENTO, HIPOTECA, MUTUO CON O SIN

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
19 MAR. 2010
AMPARO CUBILLOS ARTURO
NOTARIA

INTERES, MANDATO CIVIL Y COMERCIAL, Y SOCIEDAD, ASI COMO PARTICIPAR EN ASOCIACIONES CIENTIFICAS, GREMIALES O PROFESIONALES SIN ANIMO DE LUCRO.

CERTIFICA:

CAPITAL Y SOCIOS: $10,000.00 DIVIDIDO EN 10,000.00 CUOTAS CON VALOR NOMINAL DE $1 00 CADA UNA, DISTRIBUIDO ASI :

- SOCIO CAPITALISTA (S)

ASOCIACION CAVELIER DEL DERECHO N.I.T. 0000800017332568
NO. CUOTAS: 8,800.00 VALOR: $8,800.00

GAUDEBERT DE CAVELIER AGNES JEANNE C.E. 000000000131100
NO. CUOTAS: 1,200.00 VALOR: $1,200.00

- SOCIO INDUSTRIAL (S)

CHAVARRO JORGE C.C. 000000016209380
NO. CUOTAS: 0.00 VALOR: $0.00

SUAREZ DE PAEZ LUZ CLEMENCIA C.C. 000000035456344
NO. CUOTAS: 0.00 VALOR: $0.00

PEÑA VALENZUELA DANIEL C.C. 000000079518915
NO. CUOTAS: 0.00 VALOR: $0.00

MARIN RUALES GERMAN HUMBERTO C.C. 000000079155665
NO. CUOTAS: 0.00 VALOR: $0.00

TOTALES
NO. CUOTAS: 10,000.00 VALOR: $10,000.00

CERTIFICA:

QUE POR ESCRITURAS PUBLICAS NO. 001431 Y 001432 DEL 13 DE MARZO DE 2005 DE LA NOTARIA 06 DE BOGOTA D.C., INSCRITA EL 07 DE ABRIL DE 2005 BAJO EL NO. 0009918 Y 0009917, RESPECTIVAMENTE DEL LIBRO XIII, DE LAS MIL DOSCIENTAS (1200) PARTES DE INTERES SOCIAL RADICADAS EN CABEZA DE AGNES GAUDEBERT DE CAVELIER, SEISCIENTAS (600) PARTES ESTAN GRAVADAS O AFECTADAS EN PROPIEDAD FIDUCIARIA A FAVOR DE LAS SIGUIENTES PERSONAS : GERMAN CAVELIER FRANCO, ERNESTO CAVELIER FRANCO, JORGE CAVELIER FRANCO, INES CAVELIER FRANCO, GUILLERMO CAVELIER FRANCO, ELENA CAVELIER FRANCO, ALEJANDRO CAVELIER FRANCO, BEATRIZ CAVELIER FRANCO, Y LUCIA CAVELIER FRANCO.

CERTIFICA:

REPRESENTACION LEGAL: EL REPRESENTANTE LEGAL ES EL DIRECTOR. EL SOCIO FUNDADOR GERMAN CAVELIER GAVIRIA TENDRA EL CARACTER DE PRESIDENTE DIRECTOR VITALICIO, PARTICIPARA POR DERECHO PROPIO EN EL CONSEJO SUPERIOR Y EN EL CONSEJO DIRECTIVO Y LLEVARA LA REPRESENTACION LEGAL DE LA SOCIEDAD CUANDO LO ESTIME PERTINENTE SIN LIMITACION ALGUNA. IGUAL PARTICIPACION Y ATRIBUCIONES TENDRA SU SUPLENTE AGNES GAUDEBERT DE CAVELIER CUANDO OCUPE EL CARGO, EN CASO DE FALTA ABSOLUTA DE GERMAN CAVELIER GAVIRIA. LOS SOCIOS COLECTIVOS ESTÁN AUTORIZADOS PARA EJERCER LA REPRESENTACIÓN DE LA SOCIEDAD EN CUALQUIER TIEMPO, SIN PERJUICIO DE LAS DELEGACIONS CONFERIDAS A LOS ORGANOS CREADOS POR LOS PRESENTES

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
19 MAR. 2010
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

ESTATUTOS

CERTIFICA:

** NOMBRAMIENTOS **

QUE POR NO. 12 DE JUNTA DE SOCIOS DEL 14 DE AGOSTO DE 2009, INSCRITA EL 24 DE SEPTIEMBRE DE 2009 BAJO EL NUMERO 00012200 DEL LIBRO XIII, FUE (RON) NOMBRADO (S):

NOMBRE	IDENTIFICACION
DIRECTOR (REPRESENTANTE LEGAL DE LA ASOCIACIÓN CAVELIER DEL DERECHO)	
GALLON GIRALDO CARLOS	C.C. 000000019066425

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 0004818 DE NOTARIA 6 DE BOGOTA D.C. DEL 22 DE AGOSTO DE 2005, INSCRITA EL 26 DE AGOSTO DE 2005 BAJO EL NUMERO 00010008 DEL LIBRO XIII, FUE (RON) NOMBRADO (S):

NOMBRE	IDENTIFICACION
PRESIDENTE DIRECTOR VITALICIO	
CAVELIER GAVIRIA GERMAN	C.C. 000000002877924
SUPLENTE DEL PRESIDENTE DIRECTOR VITALICIO	
GAUDEBERT DE CAVELIER AGNES JEANNE	C.E. 000000000131100

CERTIFICA:

FACULTADES DEL REPRESENTANTE LEGAL: APARTE DE LAS FACULTADES Y DEBERES QUE DE TIEMPO EN TIEMPO SE LE ASIGNEN POR EL CONSEJO SUPERIOR, EL DIRECTOR TENDRA LAS SIGUIENTES FUNCIONES : A) LA DE REPRESENTAR LEGALMENTE A LA SOCIEDAD ANTE LAS AUTORIDADES DE CUALQUIER ORDEN O NATURALEZA Y ANTE OTRAS PERSONAS NATURALES O JURIDICAS, CON FACULTADES PARA NOVAR, TRANSIGIR, COMPROMETER Y DESISTIR Y PARA COMPARECER EN JUICIOS INCLUSIVE EN AQUELLOS EN DONDE SE DISPUTE LA PROPIEDAD DE BIENES INMUEBLES; B) CUMPLIR Y HACER CUMPLIR LOS ESTATUTOS Y REGLAMENTOS DE LA SOCIEDAD; Y C) CREAR O SUPRIMIR TODOS LOS EMPLEOS QUE SEAN NECESARIOS DE ACUERDO CON EL CONSEJO SUPERIOR PARA EL BUEN FUNCIONAMIENTO DE LA SOCIEDAD, ASIGNARLES FUNCIONES, FIJAR SUS SALARIOS Y NOMBRAR LAS PERSONAS QUE DEBAN DESEMPEÑARLOS, ASI COMO RETIRARLOS Y REEMPLAZARLOS CUANDO HAYA LUGAR. CUANDO CUALQUIERA DE LOS ACTOS INDICADOS EN LA CLAUSULA ANTERIOR SE REFIERA A OPERACIONES CUYO MONTO EXCEDA DE LA SUMA EQUIVALENTE A CIENTO OCHENTA (180) SALARIOS MINIMOS MENSUALES, SU CELEBRACION REQUERIRA LA APROBACION PREVIA DEL CONSEJO SUPERIOR.

CERTIFICA:

** REVISOR FISCAL **

QUE POR ACTA NO. 0000071 DEL 2 DE SEPTIEMBRE DE 1993, INSCRITA EL 29 DE SEPTIEMBRE DE 1993 BAJO EL NUMERO 00005175 DEL LIBRO XIII, FUE (RON) NOMBRADO (S):

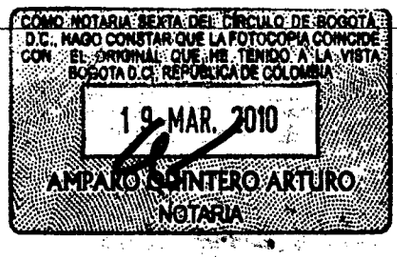
NOMBRE	IDENTIFICACION
REVISOR FISCAL	
RINCON FANDIÑO MIGUEL ALFONSO	C.C. 000000002877024

CERTIFICA:

DE CONFORMIDAD CON LO ESTABLECIDO POR LA LEY 962 DE 2005, LOS ACTOS DE REGISTRO AQUI CERTIFICADOS QUEDAN EN FIRME CINCO (5) DIAS HABILES DESPUES DE LA FECHA DE INSCRIPCION, SIEMPRE QUE NO SEAN OBJETO DE RECURSOS EN LA VIA GUBERNATIVA.

* * * EL PRESENTE CERTIFICADO NO CONSTITUYE PERMISO DE * * *
* * * FUNCIONAMIENTO EN NINGUN CASO * * *

SEÑOR EMPRESARIO, SI SU EMPRESA TIENE ACTIVOS INFERIORES A 30.000 SMLMV Y UNA PLANTA DE PERSONAL DE MENOS DE 200 TRABAJADORES, USTED TIENE DERECHO A RECIBIR UN DESCUENTO EN EL PAGO DE LOS PARAFISCALES DE



75% EN EL PRIMER AÑO DE CONSTITUCION DE SU EMPRESA, DE 50% EN EL SEGUNDO AÑO Y DE 25% EN EL TERCER AÑO. LEY 590 DE 2000 Y DECRETO 525 DE 2009.

EL SECRETARIO DE LA CAMARA DE COMERCIO,
VALOR : $ 3,600
DE CONFORMIDAD CON EL DECRETO 2150 DE 1995 Y LA AUTORIZACION IMPARTIDA POR LA SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO, MEDIANTE EL OFICIO DEL 1º DE NOVIEMBRE DE 1996, LA FIRMA MECANICA QUE APARECE A CONTINUACION TIENE PLENA VALIDEZ PARA TODOS LOS EFECTOS LEGALES

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
19 MAR. 2010
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

12

7 700021 267729

Presente el señor **CARLOS ALBERTO GALLÓN GIRALDO**, domiciliado en Bogotá, identificado como aparece al pie de su firma y manifestó que está conforme con el contenido de esta escritura pública ----------

---------- **HASTA AQUÍ LA MINUTA PRESENTADA** ----------

OTORGAMIENTO Y AUTORIZACION: LEIDA la presente escritura por los comparecientes y habiéndoseles hecho las advertencias sobre los trámites y formalidades de rigor le impartieron su aprobación y para constancia la firman ante mí el NOTARIO QUE AUTORIZA ----------

DERECHOS NOTARIALES: $ 42.860.oo - - - - - - - - - - - - - - -

IVA 16% $ 15.403.oo -

PAPEL NOTARIAL: esta escritura ha quedado extendida en las hojas de papel sellado notarial números: ----------

7-700021-267736 - 7-700021-267729 - - - - - - - - - - - - - - - - - -

EN BLANCO... EN BLANCO

OTORGANTE

CARLOS ALBERTO GALLÓN GIRALDO

C.C. 19.264.627 Bta

TEL 347-3611

REPRESENTANTE LEGAL DE **CAVELIER ABOGADOS**

AMPARO QUINTERO ARTURO

NOTARIA SEXTA (6a) DE BOGOTA D.C.

T1668/10.PG.ANGELIK

PAPEL DE USO EXCLUSIVO DEL PROTOCOLO NOTARIAL - NO TIENE COSTO PARA EL USUARIO

IMPRESO EN ENERO 1° DE 2010 POR POLYPRINT EDITORIAL LTDA. - NIT 830010225

ES FIEL Y TERCERA COPIA (FOTOCOPIA) TOMADA DE LA ESCRITURA PUBLICA NUMERO 1444 DE FECHA 19 DE MARZO DE 2010.

COPIA QUE EXPIDO EN 08 HOJAS RUBRICADAS EN SUS MARGENES, LA CUAL CARECE DE NOTAS DE REVOCATORIA, MODIFICACION O SUSTITUCION, POR TANTO SE PRESUME VIGENTE EL PODER EN ELLA CONTENIDO.

BOGOTA, D.C. JULIO 08 DE 2010

RESOLUCION 01 DE 2008

LA NOTARIA SEXTA DE BOGOTA D.C.

AMP RTURO
NOT OGOTA

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
18 June 2009 (18.06.2009)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2009/074325 A1

(51) International Patent Classification:
C12N 15/82 (2006.01) *C07K 16/16* (2006.01)
C07K 14/415 (2006.01) *A01H 5/00* (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/EP2008/010546

(22) International Filing Date:
11 December 2008 (11.12.2008)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/996,982 13 December 2007 (13.12.2007) US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **PHILIP MORRIS PRODUCTS S.A.** [CH/CH]; Quai Jeanrenaud 3, CH-2000 Neuchatel (CH).

(72) Inventors: **HAYES, Alec**; 11006 Brandy Oaks Boulevard, Chesterfield, VA 23832 (US). **KUDITHIPUDI, Chengalrayan**; 15201 Tomahawk Meadows Lane, Midlothian, VA 23112 (US). **VAN DER HOEVEN, Rutger**; 1413 Camberly Court, Midlothian, VA 23113 (US).

(74) Agent: **ROBERTS, Michael, Austin**; Reddie & Grose, 16 Theobalds Road, London, WC1X 8PL (GB).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— *with international search report*
— *before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments*
— *with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau*

WO 2009/074325 A1

(54) Title: TRANSGENIC PLANTS MODIFIED FOR REDUCED CADMIUM TRANSPORT, DERIVATIVE PRODUCTS, AND RELATED METHODS

(57) Abstract: The invention is directed in part to transgenic plants, including transgenic tobacco plants and derivative seeds, genetically modified to impede the transport of Cadmium (Cd) from the root system to aerial portions of transgenic plants by reducing the expression levels of HMA-related transporters. The invention includes transgenic tobacco plants genetically modified to stably express a RNAi construct encoding RNAi polynucleotides that enable the degradation of endogenous NtHMA RNA variants. Reduced expression of NtHMA transporters in transgenic plants results in substantially reduced content of Cadmium (Cd) in the leaf lamina. Various consumable products that are substantially free or substantially reduced in Cd content can be produced by incorporating leaves derived from transgenic tobacco plants modified to reduce the expression of NtHMA transporters.

TRANSGENIC PLANTS MODIFIED FOR REDUCED CADMIUM TRANSPORT, DERIVATIVE PRODUCTS, AND RELATED METHODS

TECHNICAL FIELD

[0001] Compositions, expression vectors, polynucleotides, polypeptides, transgenic plants, transgenic cell lines, and transgenic seeds, and methods for making and using these embodiments to produce various plants that can reduce the transport of heavy metals into aerial portions.

CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATION

[0002] This application claims priority to U.S. Provisional Application No. 60/996,982, filed December 13, 2007, the entire content of which is hereby incorporated by reference.

BACKGROUND

[0003] Plants obtain essential heavy metals, such as Zn, Ni, and Cu, by absorbing metal ion substrates from their environment by various transport mechanisms mediated by transmembrane transporters expressed on the surface of root cells and other vascular tissues. Transporters classified as P-type ATPases, such as P1B-type ATPases, are transporters that translocate positively charged substrates across plasma membranes by utilizing energy liberated from exergonic ATP hydrolysis reactions. P1B-type ATPases are also referred to as heavy metal ATP-ases ("HMAs") or CPx-type ATPases. HMAs have been grouped by substrate specificity into two subclasses, the Cu/Ag and Zn/Co/Cd/Pb groups. The first P1B-type ATPase to be characterized in plants is AtHMA4, cloned from *Arabidopsis*. Substrate selectivity by HMAs is not strictly limited to the transport of essential metals in that several non-essential metals can be recognized indiscriminately as substrates, resulting in the accumulation of many non-essential metals, such as Cd, Pb, As, and Hg.

SUMMARY OF THE INVENTION

[0004] Various aspects of the invention are directed to compositions and methods for producing transgenic plants, including transgenic tobacco plants,

genetically modified to impede Cadmium (Cd) transport from the root system to the leaf lamina by reducing the expression levels of transporters of the HMA family. A HMA homologue ("NtHMA") has been identified in tobacco, which can be utilized for constructing various RNAi constructs, encoding NtHMA RNAi polynucleotides of interest that can facilitate the degradation of endogenous NtHMA RNA transcripts. Transgenic plants that can express NtHMA RNAi polynucleotides according to the invention can be utilized for reducing steady-state levels of NtHMA RNA transcripts, and consequently, for reducing the number of functionally active NtHMA transporters available for transporting metals across cellular membranes.

[0005] Other aspects of the invention are directed to recombinant expression vectors comprising various NtHMA RNAi constructs, transgenic plants and seeds genetically modified to exogenously express NtHMA RNAi polynucleotides, cell lines derived from transgenic plants and seeds, and consumable products incorporating leaves derived from transgenic plants produced according to the disclosed methods.

[0006] According to the present invention there is provided in one aspect an isolated polynucleotide selected from the group consisting of:

a polynucleotide comprising or consisting of a sequence having at least 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% sequence identity, for example at least 70% sequence identity, to SEQ ID NO:1, and encoding a NtHMA transporter having P1B-type ATPase activity;

a polynucleotide comprising or consisting of a sequence having at least 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% sequence identity, for example at least 70% sequence identity, to SEQ ID NO: 3;

a polynucleotide comprising or consisting of a sequence having at least 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% sequence identity, for example at least 70% sequence identity, to SEQ ID NO: 47;

a polynucleotide comprising or consisting of a sequence encoding a polypeptide having at least 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% sequence identity, for example at least 70% sequence identity, to SEQ ID NO:2, wherein the polypeptide is a NtHMA transporter having P1B-type ATPase activity; and

a polynucleotide comprising or consisting of a sequence encoding a polypeptide having at least 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% sequence identity, for example at least 70% sequence identity, to SEQ ID NO: 49, wherein the polypeptide is a NtHMA transporter having P1B-type ATPase activity.

[0007] The isolated polynucleotide of the invention may hybridise to a nucleic acid molecule comprising or consisting of SEQ ID NOs: 1, 3, or 47, or complementary sequence of SEQ ID NOs: 1, 3 or 47, under high-stringency conditions.

[0008] Another aspect of the invention is an expression vector comprising the isolated polynucleotide as defined herein.

[0009] Also provided is a transgenic plant made by a process comprising introducing the isolated polynucleotide as defined herein or the expression vector as defined herein. The transgenic plant may, for example, be a tobacco plant.

[0010] Further provided is a cell line made by a process comprising introducing the isolated polynucleotide as defined herein or the expression vector as defined herein.

[0011] In a further aspect there is provided a consumable tobacco product (for example, but not limited to, a smoking article or smokeless tobacco product) incorporating leaves harvested from the transgenic plant as defined herein.

[0012] In another aspect, there is provided a NtHMA RNAi construct capable of inhibiting the expression of a NtHMA messenger RNA to which it corresponds, the construct comprising:

a first sequence having at least 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% sequence identity, for example at least 70% sequence identity, to a portion of SEQ ID NO:3 or 47;

a second sequence; and

a third sequence having a reverse complementary sequence of the first sequence, positioned in the same orientation as the first sequence,

wherein the second sequence is positioned between the first sequence and the third sequence, and the second sequence is operably-linked to the first sequence and to the third sequence.

[0013] In the NtHMA RNAi construct:

(a) the first sequence may have at least 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% sequence identity, for example at least 95% sequence identity, to a sequence selected from one or more of the group consisting of: exon 1 (SEQ ID NO:5), a fragment of exon 1 (SEQ ID NO:5), exon 2 (SEQ ID NO:7), a fragment of exon 2 (SEQ ID NO:7), exon 3 (SEQ ID NO:9), a fragment of exon 3 (SEQ ID NO:9), exon 4 (SEQ ID NO:11), a fragment of exon 4 (SEQ ID NO:11), exon 5 (SEQ ID NO:13), a fragment of exon 5 (SEQ ID NO:13), exon 6 (SEQ ID NO:15), a fragment of exon 6 (SEQ ID NO:15), exon 7 (SEQ ID NO:17), a fragment of exon 7 (SEQ ID NO:17), exon 8 (SEQ ID NO:19), a fragment of exon 8 (SEQ ID NO:19), exon 9 (SEQ ID NO:21), a fragment of exon 9 (SEQ ID NO:21), exon 10 (SEQ ID NO:23), a fragment of exon 10 (SEQ ID NO:23), exon 11 (SEQ ID NO:25), and a fragment of exon 11 (SEQ ID NO:25);

(b) the second sequence may have at least 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% sequence identity, for example at least 95% sequence identity, to a sequence selected from one or more of the group consisting of: intron 1 (SEQ ID NO:4), a fragment of intron 1 (SEQ ID NO:4), intron 2 (SEQ ID NO:6), a fragment of intron 2 (SEQ ID NO:6), intron 3 (SEQ ID NO:8), a fragment of intron 3 (SEQ ID NO:8), intron 4 (SEQ ID NO:10), a fragment of intron 4 (SEQ ID NO:10), intron 5 (SEQ ID NO:12), a fragment of intron 5 (SEQ ID NO:12), intron 6 (SEQ ID NO:14), a fragment of intron 6 (SEQ ID NO:14), intron 7 (SEQ ID NO:16), a fragment of intron 7 (SEQ ID NO:16), intron 8 (SEQ ID NO:18), a fragment of intron 8 (SEQ ID NO:18), intron 9 (SEQ ID NO:20), a fragment of intron 9 (SEQ ID NO:20), intron 10 (SEQ ID NO:22), a fragment of intron 10 (SEQ ID NO:22), intron 11 (SEQ ID NO:24), a fragment of intron 11 (SEQ ID NO:24), intron 12 (SEQ ID NO:26), and a fragment of intron 12 (SEQ ID NO:26);

(c) the third sequence may have at least 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% sequence identity, for example at least 95% sequence identity, to a sequence selected from one or more of the group consisting of: SEQ ID NO:27, a fragment of SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, a fragment of SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, a fragment of SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, a fragment of SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, a fragment of SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, a fragment of SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, a fragment of SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, a fragment of SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, a

fragment of SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, a fragment of SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, and a fragment of SEQ ID NO:37;

(d) the first sequence may comprise SEQ ID NO:38, the second sequence may comprise SEQ ID NO:39, and the third sequence may comprise SEQ ID NO:40;

(e) the first sequence may comprise SEQ ID NO:42, the second sequence may comprise SEQ ID NO:43, and the third sequence may comprise SEQ ID NO:44; or

(f) one or two or three of (a), (b), (c), (d) and (e) may apply.

[0014] The invention also encompasses an expression vector comprising a promoter positioned upstream and operably-linked to the NtHMA RNAi construct as defined herein. The promoter may be selected from the group consisting of: a tissue-specific promoter, an inducible promoter, and a constitutive promoter.

[0015] In the NtHMA RNAi construct, the first and the second sequence may each have a length selected from the group consisting of 20-30 nucleotides, 30-50 nucleotides, 50-100 nucleotides, 100-150 nucleotides, 150-200 nucleotides, 200-300 nucleotides, 300-400 nucleotides, 400-500 nucleotides, 500-600 nucleotides, and 600-700 nucleotides.

[0016] A further aspect of the invention is a transgenic plant comprising the RNAi (or the NtHMA RNAi construct, or the expression vector) as defined herein, wherein the transgenic plant has a reduced Cd levels in at least a part of the plant compared to the part in a non-transgenic counterpart. The transgenic plant may, for example, be a tobacco plant.

[0017] Also provided is consumable tobacco product (for example, but not limited to, a smoking article or smokeless tobacco product) incorporating leaves harvested from the transgenic plant comprising the RNAi as defined herein.

[0018] The product may have a % Cd reduction value of at least about 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, or 99%.

[0019] The product may have a Cd content is a value ranging from about 0.01 to about 0.05 ppm, from about 0.01 to about 0.1 ppm, from about 0.01 to about 0.5 ppm, from about 0.01 to about 1.0 ppm, or from about 0.01 to about 5 ppm.

[0020] In another aspect of the invention, there is provided a method for reducing Cd levels in at least a part of a plant, comprising:

reducing levels of an NtHMA mRNA in the plant by causing expression of an RNAi construct.

[0021] For this method, the RNAi construct may be as defined herein, and in particular may comprise:

a first sequence having at least 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% sequence identity, for example at least 90% sequence identity, to a portion of SEQ ID NO:3 or 47;

a second sequence; and

a third sequence having a reverse complementary sequence of the first sequence, positioned in the same orientation as the first sequence,

wherein the second sequence is positioned between the first sequence and the third sequence, and the second sequence is operably-linked to the first sequence and to the third sequence.

[0022] According to the method, following expression of the RNAi construct, the part of the plant may have a Cd content reduced by at least about 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, or 99%.

[0023] Additionally or alternatively, following expression of the RNAi construct, the part of the plant may have a Cd content ranging from about 0.01 to about 0.05 ppm, from about 0.01 to about 0.1 ppm, from about 0.01 to about 0.5 ppm, from about 0.01 to about 1.0 ppm, or from about 0.01 to about 5 ppm.

[0024] According to a further aspect of the invention, there is provided a substantially purified polypeptide having at least at least 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% sequence identity, for example at least 70% sequence identity or at least 95% sequence identity, to SEQ ID NO:2 or 49, wherein the polypeptide is a NtHMA transporter having P1B-type ATPase activity.

[0025] An antibody that specifically binds to a polypeptide as defined herein, for example comprising or consisting of SEQ ID NO:2 or 49, is also encompassed by the invention.

[0026] Further and various aspects (also referred to herein as "embodiments") of the present invention are described below.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0027] FIG. 1 is a schematic of a NtHMA genomic clone comprising 11 exons.

[0028] FIG. 2A illustrates an exemplary subcloning strategy for constructing a NtHMA RNAi expression vector that enables the constitutive expression of NtHMA RNAi polynucleotides of interest, as described in Example 2.

[0029] FIG. 2B illustrates a hypothetical double-stranded RNA duplex formed (as "stem-loop-stem" structure) from intra-molecular, base-pair interactions within NtHMA RNAi polynucleotide produced as a product transcribed from an exemplary NtHMA RNAi construct.

[0030] FIG. 3A shows an exemplary RNAi sequence, NtHMA (660-915), for producing NtHMA RNAi polynucleotides of interest, as described in Example 2.

[0031] FIGS. 3B-3D show Cd reduction in leaf lamina of multiple first generation (T0) transgenic lines, representing three varieties, that have been genetically modified to express NtHMA RNAi polynucleotides (660-915), as described in Example 5.

[0032] FIG. 4A shows an exemplary RNAi sequence, NtHMA (1382-1584), for producing NtHMA RNAi polynucleotides of interest, as described in Example 3.

[0033] FIGS. 4B-4D show Cd reduction in leaf lamina of multiple first generation (T0) transgenic lines, representing three varieties, that have been genetically modified to express NtHMA RNAi polynucleotides (1382-1584), as described in Example 5.

[0034] FIGS. 5A-C show normalized NtHMA RNA transcript levels in various first generation (T0) transgenic lines that have been genetically modified to express NtHMA RNAi polynucleotides of interest, as determined by quantitative realtime PCR analysis of leaf lamina extracts, as described in Example 6.

[0035] FIG. 6 shows the distribution of Cd and Zn between the leaf lamina and the root of various first generation (T0) transgenic lines that have been genetically modified to express NtHMA RNAi polynucleotides of interest, as presented in Table 2 and described in Example 7.

[0036] FIG. 7 shows Cd distribution among the bark ("B"), leaf lamina ("L"), pith ("P"), and root ("R") tissues of various first generation (T0) transgenic lines that have been genetically modified to express NtHMA RNAi polynucleotides of interest, as presented in Table 3 and described in Example 8.

[0037] FIG. 8 shows Cd distribution between the leaf lamina ("L") and the root ("R") of various second generation (T1) transgenic lines that have been genetically modified to express NtHMA RNAi polynucleotides of interest, as described in Example 9.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[0038] I. Isolation of Tobacco NtHMA Genes and Gene Products

[0039] FIG. 1 is a schematic of a NtHMA genomic clone comprising 11 exons encoding a heavy metal transporter related to the HMA family of transporters. Example 1 further describes the identification of the NtHMA genomic clone (_HO-18-2) and 4 NtHMA cDNA clones. Table 1 below provides nucleotide positions corresponding to exon and intron subregions mapped within the NtHMA genomic clone (_HO-18-2).

[0040] A. NtHMA Polynucleotides

[0041] The term "polynucleotide" refers to a polymer of nucleotides comprising at least 10 bases in length. The polynucleotides may be DNA, RNA or a DNA/RNA hybrid, comprising ribonucleotides, deoxyribonucleotides,

combinations of deoxyribo- and ribo-nucleotides, and combinations of bases and/or modifications, including uracil, adenine, thymine, cytosine, guanine, inosine, xanthine, hypoxanthine, isocytosine, and isoguanine. The term includes single- and double-stranded forms of DNA or RNA. The term "DNA" includes genomic DNAs, cDNAs, chemically-synthesized DNAs, PCR-amplified DNAs, and combinations/equivalents thereof. The term "isolated polynucleotide" refers to a polynucleotide not contiguous with any genome of origin, or separated from a native context. The term includes any recombinant polynucleotide molecule such as NtHMA RNAi constructs, NtHMA RNAi expression vectors, NtHMA genomic clones, and fragments and variants thereof.

[0042] As shown in FIG. 1, the NtHMA genomic clone, designated as SEQ ID NO:1, comprises: intron 1 (SEQ ID NO:4), exon 1 (SEQ ID NO:5), intron 2 (SEQ ID NO:6), exon 2 (SEQ ID NO:7), intron 3 (SEQ ID NO:8), exon 3 (SEQ ID NO:9), intron 4 (SEQ ID NO:10), exon 4 (SEQ ID NO:11), intron 5 (SEQ ID NO:12), exon 5 (SEQ ID NO:13), intron 6 (SEQ ID NO:14), exon 6 (SEQ ID NO:15), intron 7 (SEQ ID NO:16), exon 7 (SEQ ID NO:17), intron 8 (SEQ ID NO:18), exon 8 (SEQ ID NO:19), intron 9 (SEQ ID NO:20), exon 9 (SEQ ID NO:21), intron 10 (SEQ ID NO:22), exon 10 (SEQ ID NO:23), intron 11 (SEQ ID NO:24, exon 11 (SEQ ID NO:25), and intron 12 (SEQ ID NO:26). For sequences, see Sequence Listing below. Various embodiments of the invention are directed to isolated polynucleotides representing genomic fragments isolated at the *NtHMA* locus, comprising SEQ ID NO:1, fragments of SEQ ID NO:1, or variants thereof. Various embodiments are directed to isolated NtHMA polynucleotide variants comprising at least 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, and 99% sequence identity to SEQ ID NO:1, or fragments of SEQ ID NO:1.

[0043] Various embodiments are directed to isolated polynucleotides having sequences that complements that of NtHMA polynucleotide variants comprising at least 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, and 99% sequence identity to SEQ ID NO:1, or fragments of SEQ ID NO:1. Various embodiments are directed to isolated polynucleotides that can specifically hybridize, under moderate to highly stringent conditions, to polynucleotides comprising SEQ ID NO:1, or fragments of SEQ ID NO:1.

[0044] Various embodiments are directed to isolated polynucleotides of NtHMA cDNA (Clone P6663), comprising SEQ ID NO:3, fragments of SEQ ID NO:3, or variants thereof. Various embodiments are directed to isolated NtHMA polynucleotide variants comprising at least 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, and 99% sequence identity to SEQ ID NO:3, or fragments of SEQ ID NO:3. Various embodiments are directed to isolated NtHMA polyribonucleotide variants comprising at least 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, and 99% sequence identity to SEQ ID NO:3, or fragments of SEQ ID NO:3, and in which Ts have been substituted with Us (*e.g.*, RNAs). Various embodiments are directed to isolated polynucleotides that can specifically hybridize, under moderate to highly stringent conditions, to polynucleotides comprising SEQ ID NO:3, or fragments of SEQ ID NO:3. Various embodiments are directed to isolated polynucleotides having a sequence that complements that of NtHMA polynucleotide variants comprising at least 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, and 99% sequence identity to SEQ ID NO:3, or fragments of SEQ ID NO:3.

[0045] Various embodiments are directed to isolated polynucleotides of NtHMA cDNA (Clone P6643), comprising SEQ ID NO:47, fragments of SEQ ID NO:47, or variants thereof. Various embodiments are directed to isolated NtHMA polynucleotide variants comprising at least 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, and 99% sequence identity to SEQ ID NO:47, fragments of SEQ ID NO:47. Various embodiments are directed to isolated NtHMA polyribonucleotide variants comprising at least 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, and 99% sequence identity to SEQ ID NO:47, fragments of SEQ ID NO:47, and in which Ts have been substituted with Us (*e.g.*, RNAs). Various embodiments are directed to isolated polynucleotides that can specifically hybridize, under moderate to highly stringent conditions, to polynucleotides comprising SEQ ID NO:47, fragments of SEQ ID NO:47. Various embodiments are directed to isolated polynucleotides having a sequence that complements that of NtHMA polynucleotide variants comprising at least 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, and 99% sequence identity to SEQ ID NO:47, fragments of SEQ ID NO:47.

[0046] Various embodiments are directed to biopolymers that are homologous to NtHMA polynucleotides and NtHMA polypeptides ("NtHMA homologues"), which can be identified from different plant species. For example,

NtHMA homologues can be experimentally isolated by screening suitable nucleic acid libraries derived from different plant species of interest. Alternatively, NtHMA homologues may be identified by screening genome databases containing sequences from one or more species utilizing a sequence derived from NtHMA polynucleotides and/or NtHMA polypeptides. Such genomic databases are readily available for a number of species (*e.g.*, on the world wide web (www) at tigr.org/tdb; genetics.wisc.edu; stanford.edu/.about.ball; hiv-web.lan1.gov; ncbi.nlm.nig.gov; ebi.ac.uk; and pasteur.fr/other/biology). For example, degenerate oligonucleotide sequences can be obtained by "back-translation" from NtHMA polypeptide fragments. NtHMA polynucleotides can be utilized as probes or primers to identify/amplify related sequences, or to obtain full-length sequences for related NtHMAs by PCR, for example, or by other well-known techniques (*e.g.*, see PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis *et. al.*, eds., Academic Press, Inc. (1990)).

[0047] B. NtHMA Polypeptides

[0048] The term "NtHMA polypeptide" refers to a polypeptide comprising an amino acid sequence designated as SEQ ID NO:2; polypeptides having substantial homology (i.e., sequence similarity) or substantial identity to SEQ ID NO:2; fragments of SEQ ID NO:2; and variants thereof. The NtHMA polypeptides include sequences having sufficient or substantial degree of identity or similarity to SEQ ID NO:2, and that can function by transporting heavy metals across cell membranes.

[0049] NtHMA polypeptides include variants produced by introducing any type of alterations (*e.g.*, insertions, deletions, or substitutions of amino acids; changes in glycosylation states; changes that affect refolding or isomerizations, three-dimensional structures, or self-association states), which can be deliberately engineered or isolated naturally. NtHMA polypeptides may be in linear form or cyclized using known methods (*e.g.*, H. U. Saragovi, *et al.*, Bio/Technology 10, 773 (1992); and R. S. McDowell, *et al.*, J. Amer. Chem. Soc. 114:9245 (1992), both incorporated herein by reference). NtHMA polypeptides comprise at least 8 to 10, at least 20, at least 30, or at least 40 contiguous amino acids.

[0050] Various embodiments are directed to isolated NtHMA polypeptides encoded by polynucleotide sequence, SEQ ID NO:1, comprising SEQ ID NO:2,

fragments of SEQ ID NO:2, or variants thereof. Various embodiments are directed to isolated NtHMA polypeptide variants comprising at least 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, and 99% sequence identity to SEQ ID NO:2, or fragments of SEQ ID NO:2.

[0051] Various embodiments are directed to isolated NtHMA polypeptides (Clone P6663), comprising SEQ ID NO:2, fragments of SEQ ID NO:2, or variants thereof. Various embodiments are directed to isolated NtHMA polypeptide variants comprising at least 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, and 99% sequence identity to SEQ ID NO:2, or fragments of SEQ ID NO:2.

[0052] Various embodiments are directed to isolated NtHMA polypeptides (Clone P6643), comprising SEQ ID NO:49, fragments of SEQ ID NO:49, or variants thereof. Various embodiments are directed to isolated NtHMA polypeptide variants comprising at least 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, and 99% sequence identity to SEQ ID NO:49, or fragments of SEQ ID NO:49.

[0053] II. Compositions and Related Methods for Reducing NtHMA Gene Expression and/or NtHMA-mediated Transporter Activity

[0054] Suitable antagonistic compositions that can down-regulate the expression and/or the activity of NtHMA and NtHMA variants include sequence-specific polynucleotides that can interfere with the transcription of one or more endogenous NtHMA gene(s); sequence-specific polynucleotides that can interfere with the translation of NtHMA RNA transcripts (*e.g.*, dsRNAs, siRNAs, ribozymes); sequence-specific polypeptides that can interfere with the protein stability of NtHMA, the enzymatic activity of NtHMA, and/or the binding activity of NtHMA with respect to substrates and/or regulatory proteins; antibodies that exhibit specificity for NtHMA; and small molecule compounds that can interfere with the protein stability of NtHMA, the enzymatic activity of NtHMA, and/or the binding activity of NtHMA. An effective antagonist can reduce heavy metal (*e.g.*, Cd) transport into leaf lamina structures by at least 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, or 95%.

[0055] A. Definitions

[0056] Throughout this disclosure and the appended claims, the terms "a" and "the" function as singular and plural referents unless the context clearly dictates otherwise. Thus, for example, a reference to "an RNAi polynucleotide" includes a plurality of such RNAi polynucleotides, and a reference to "the plant" includes reference to one or more of such plants.

[0057] The term "orientation" refers to a particular order in the placement of a polynucleotide relative to the position of a reference polynucleotide. A linear DNA has two possible orientations: the 5'-to-3' direction and the 3'-to-5' direction. For example, if a reference sequence is positioned in the 5'-to-3' direction, and if a second sequence is positioned in the 5'-to-3' direction within the same polynucleotide molecule/strand, then the reference sequence and the second sequence are orientated in the same direction, or have the same orientation. Typically, a promoter sequence and a gene of interest under the regulation of the given promoter are positioned in the same orientation. However, with respect to the reference sequence positioned in the 5'-to-3' direction, if a second sequence is positioned in the 3'-to-5' direction within the same polynucleotide molecule/strand, then the reference sequence and the second sequence are orientated in anti-sense direction, or have anti-sense orientation. Two sequences having anti-sense orientations with respect to each other can be alternatively described as having the same orientation, if the reference sequence (5'-to-3' direction) and the reverse complementary sequence of the reference sequence (reference sequence positioned in the 5'-to-3') are positioned within the same polynucleotide molecule/strand.

[0058] The term "NtHMA RNAi expression vector" refers to a nucleic acid vehicle that comprises a combination of DNA components for enabling the transport and the expression of NtHMA RNAi constructs. Suitable expression vectors include episomes capable of extra-chromosomal replication such as circular, double-stranded DNA plasmids; linearized double-stranded DNA plasmids; and other functionally equivalent expression vectors of any origin. A suitable NtHMA RNAi expression vector comprises at least a promoter positioned upstream and operably-linked to a NtHMA RNAi construct, as defined below.

[0059] The term "NtHMA RNAi construct" refers to a double-stranded, recombinant DNA fragment that encodes "NtHMA RNAi polynucleotides" having

RNA interference activity. A NtHMA RNAi construct comprises a "template strand" base-paired with a complementary "sense or coding strand." A given NtHMA RNAi construct can be inserted into a NtHMA RNAi expression vector in two possible orientations, either in the same (or sense) orientation or in the reverse (or anti-sense) orientation with respect to the orientation of a promoter positioned within a NtHMA RNAi expression vector.

[0060] The term "NtHMA RNAi polynucleotides" can target NtHMA RNA for enzymatic degradation, involving the formation of smaller fragments of NtHMA RNAi polynucleotides ("siRNAs") that can bind to multiple complementary sequences within the target NtHMA RNA. Expression levels of one or more NtHMA gene(s) can be reduced by the RNA interference activity of NtHMA RNAi polynucleotides.

[0061] The term "template strand" refers to the strand comprising a sequence that complements that of the "sense or coding strand" of a DNA duplex, such as NtHMA genomic fragment, NtHMA cDNA, or NtHMA RNAi construct, or any DNA fragment comprising a nucleic acid sequence that can be transcribed by RNA polymerase. During transcription, RNA polymerase can translocate along the template strand in the 3'-to-5' direction during nacent RNA synthesis.

[0062] The terms "sense strand" or "coding strand" refer to the strand comprising a sequence that complements that of the template strand in a DNA duplex. For example, the sequence of the sense strand ("sense sequence") for the identified NtHMA genomic clone is designated as SEQ ID NO:1. For example, the sense sequence for NtHMA cDNA, identified as clone P6663, is designated as SEQ ID NO:3. For example, the sense sequence for NtHMA cDNA, identified as clone P6643, is designated as SEQ ID NO:46. For example, if the sense strand comprises a hypothetical sequence 5'-TAATCCGGT-3', then the substantially identical corresponding sequence within a hypothetical target mRNA is 5'-UAAUCCGGU-3'.

[0063] The term "reverse complementary sequence" refers to the sequence that complements the "sense sequence" of interest (*e.g.*, exon sequence) positioned within the same strand, in the same orientation with respect to the sense sequence. For example, if a strand comprises a hypothetical sequence 5'-

TAATCCGGT-3', then the reverse complementary sequence 5'-ACCGGATTA-3' may be operably-linked to the sense sequence, separated by a spacer sequence.

[0064] The terms "NtHMA RNA transcript" or "NtHMA RNA," in the context of RNA interference, refer to polyribonucleic acid molecules produced within a host plant cell of interest, resulting from the transcription of endogenous genes of the HMA family, including the isolated NtHMA gene (SEQ ID NO:1). Thus, these terms include any RNA species or RNA variants produced as transcriptional products from HMA-related genes that may be distinct from the isolated NtHMA gene (SEQ ID NO:1) but having sufficient similarity at structural and/or functional levels to be classified within the same family. For example, if a host plant cell selected for genetic modification according to the disclosed methods is tobacco, then target NtHMA RNA transcripts include: (1) pre-mRNAs and mRNAs produced from the transcription of the isolated NtHMA gene (SEQ ID NO:1); (2) pre-mRNAs and mRNAs produced from the transcription of any genes having at least 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, and 99% sequence identity to the sequence of the isolated NtHMA gene (SEQ ID NO:1) (*i.e.* other distinct genes substantially identical to the identified NtHMA gene and encoding related isoforms of HMA transporters); and (3) pre-mRNAs and mRNAs produced from the transcription of alleles of the NtHMA gene (SEQ ID NO:1). The NtHMA RNA transcripts include RNA variants produced as a result of alternative RNA splicing reactions of heteronuclear RNAs ("hnRNAs") of a particular NtHMA gene, mRNA variants resulting from such alternative RNA splicing reactions, and any intermediate RNA variants.

[0065] The terms "homology" or "identity" or "similarity" refer to the degree of sequence similarity between two polypeptides or between two nucleic acid molecules compared by sequence alignment. The degree of homology between two discrete nucleic acid sequences being compared is a function of the number of identical, or matching, nucleotides at comparable positions. The percent identity may be determined by visual inspection and mathematical calculation. Alternatively, the percent identity of two nucleic acid sequences can be determined by comparing sequence information using the GAP computer program, version 6.0 described by Devereux *et al.* (Nucl. Acids Res. 12:387, 1984) and available from the University of Wisconsin Genetics Computer Group (UWGCG). Typical default

parameters for the GAP program include: (1) a unary comparison matrix (containing a value of 1 for identities and 0 for non-identities) for nucleotides, and the weighted comparison matrix of Gribskov and Burgess, Nucl. Acids Res. 14:6745, 1986, as described by Schwartz and Dayhoff, eds., Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358, 1979; (2) a penalty of 3.0 for each gap and an additional 0.10 penalty for each symbol in each gap; and (3) no penalty for end gaps. Various programs known to persons skilled in the art of sequence comparison can be alternatively utilized.

[0066] The term "upstream" refers to a relative direction/position with respect to a reference element along a linear polynucleotide sequence, which indicates a direction/ position towards the 5' end of the polynucleotide sequence. "Upstream" may be used interchangeably with the "5' end of a reference element."

[0067] The term "operably-linked" refers to the joining of distinct DNA elements, fragments, or sequences to produce a functional transcriptional unit or a functional expression vector.

[0068] The term "promoter" refers to a nucleic acid element/ sequence, typically positioned upstream and operably-linked to a double-stranded DNA fragment, such as a NtHMA RNAi construct. For example, a suitable promoter enables the transcriptional activation of a NtHMA RNAi construct by recruiting the transcriptional complex, including the RNA polymerase and various factors, to initiate RNA synthesis. "Promoters" can be derived entirely from regions proximate to a native gene of interest, or can be composed of different elements derived from different native promoters and/or synthetic DNA segments. Suitable promoters include tissue-specific promoters recognized by tissue-specific factors present in different tissues or cell types (*e.g.*, root-specific promoters, shoot-specific promoters, xylem-specific promoters), or present during different developmental stages, or present in response to different environmental conditions. Suitable promoters include constitutive promoters that can be activated in most cell types without requiring specific inducers. Examples of suitable promoters for controlling NtHMA RNAi polypeptide production include the cauliflower mosaic virus 35S (CaMV/35S), SSU, OCS, lib4, usp, STLS1, B33, nos or ubiquitin- or phaseolin-promoters. Persons skilled in the art are capable of generating multiple variations

of recombinant promoters, as described in a number of references, such as Okamuro and Goldberg, Biochemistry of Plants, Vol. 15:pp1-82 (1989).

[0069] Tissue-specific promoters are transcriptional control elements that are only active in particular cells or tissues at specific times during plant development, such as in vegetative tissues or reproductive tissues. Tissue-specific expression can be advantageous, for example, when the expression of polynucleotides in certain tissues is preferred. Examples of tissue-specific promoters under developmental control include promoters that can initiate transcription only (or primarily only) in certain tissues, such as vegetative tissues, *e.g.*, roots or leaves, or reproductive tissues, such as fruit, ovules, seeds, pollen, pistols, flowers, or any embryonic tissue. Reproductive tissue-specific promoters may be, *e.g.*, anther-specific, ovule-specific, embryo-specific, endosperm-specific, integument-specific, seed and seed coat-specific, pollen-specific, petal-specific, sepal-specific, or combinations thereof.

[0070] Suitable leaf-specific promoters include pyruvate, orthophosphate dikinase (PPDK) promoter from C4 plant (maize), cab-m1Ca+2 promoter from maize, the Arabidopsis thaliana myb-related gene promoter (Atmyb5), the ribulose biphosphate carboxylase (RBCS) promoters (e.g., the tomato RBCS 1, RBCS2 and RBCS3A genes expressed in leaves and light-grown seedlings, RBCS1 and RBCS2 expressed in developing tomato fruits, and/or ribulose bisphosphate carboxylase promoter expressed almost exclusively in mesophyll cells in leaf blades and leaf sheaths at high levels).

[0071] Suitable senescence-specific promoters include a tomato promoter active during fruit ripening, senescence and abscission of leaves, a maize promoter of gene encoding a cysteine protease. Suitable anther-specific promoters can be used. Such promoters are known in the art or can be discovered by known techniques; see, e.g., Bhalla and Singh (1999) Molecular control of male fertility in Brassica, Proc. 10th Annual Rapeseed Congress, Canberra, Australia; van Tunen et al. (1990) Pollen- and anther-specific chi promoters from petunia: tandem promoter regulation of the chiA gene. Plant Cell 2:393-40; Jeon et al. (1999) Isolation and characterization of an anther-specific gene, RA8, from rice (Oryza sativa L). Plant Molecular Biology 39:35-44; and Twell et al. (1993) Activation and developmental regulation of an Arabidopsis anther-specific promoter in microspores

and pollen of Nicotiana tabacum. Sex. Plant Reprod. 6:217-224.

[0072] Suitable root-preferred promoters known to persons skilled in the art may be selected. See, for example, Hire et al. (1992) Plant Mol. Biol. 20(2):207-218 (soybean root-specific glutamine synthetase gene); Keller and Baumgartner (1991) Plant Cell 3(10):1051-1061 (root-specific control element in the GRP 1.8 gene of French bean); Sanger et al. (1990) Plant Mol. Biol. 14(3):433-443 (root-specific promoter of the mannopine synthase (MAS) gene of Agrobacterium tumefaciens); and Miao et al. (1991) Plant Cell 3(1):11-22 (full-length cDNA clone encoding cytosolic glutamine synthetase (GS), which is expressed in roots and root nodules of soybean). See also Bogusz et al. (1990) Plant Cell 2(7):633-641, where two root-specific promoters isolated from hemoglobin genes from the nitrogen-fixing nonlegume Parasponia andersonii and the related non-nitrogen-fixing nonlegume Trema tomentosa are described.

[0073] Suitable seed-preferred promoters include both seed-specific promoters (those promoters active during seed development such as promoters of seed storage proteins) and seed-germinating promoters (those promoters active during seed germination). See, e.g., Thompson et al. (1989) BioEssays 10: 108, herein incorporated by reference. Such seed-preferred promoters include, but are not limited to, Cim1 (cytokinin-induced message); cZ19B1 (maize 19 kDa zein); milps (myo-inositol-1-phosphate synthase); mZE40-2, also known as Zm-40 (U.S. Pat. No. 6,403,862); nuclc (U.S. Pat. No. 6,407,315); and celA (cellulose synthase) (see WO 00/11177). Gama-zein is an endosperm-specific promoter. Glob-1 is an embryo-specific promoter. For dicots, seed-specific promoters include, but are not limited to, bean .beta.-phaseolin, napin, .beta.-conglycinin, soybean lectin, cruciferin, and the like. For monocots, seed-specific promoters include, but are not limited to, a maize 15 kDa zein promoter, a 22 kDa zein promoter, a 27 kDa zein promoter, a g-zein promoter, a 27 kD .gamma.-zein promoter (such as gzw64A promoter, see Genbank Accession #S78780), a waxy promoter, a shrunken 1 promoter, a shrunken 2 promoter, a globulin 1 promoter (see Genbank Accession # L22344), an Itp2 promoter (Kalla, et al., Plant Journal 6:849-860 (1994); U.S. Pat. No. 5,525,716), cim1 promoter (see U.S. Pat. No. 6,225,529) maize end1 and end2 promoters (See U.S. Pat. No. 6,528,704 and application 10/310,191, filed Dec. 4, 2002); nuc1 promoter (U.S. Pat. No. 6,407,315); Zm40 promoter (U.S. Pat. No.

6,403,862); eep1 and eep2; lec1 (U.S. patent application Ser. No. 09/718,754); thioredoxinH promoter (U.S. provisional patent application 60/514,123); mlip15 promoter (U.S. Pat. No. 6,479,734); PCNA2 promoter; and the shrunken-2 promoter. (Shaw et al., Plant Phys 98:1214-1216, 1992; Zhong Chen et al., PNAS USA 100:3525-3530, 2003).

[0074] Examples of inducible promoters include promoters responsive to pathogen attack, anaerobic conditions, elevated temperature, light, drought, cold temperature, or high salt concentration. Pathogen-inducible promoters include those from pathogenesis-related proteins (PR proteins), which are induced following infection by a pathogen (*e.g.*, PR proteins, SAR proteins, beta-1,3-glucanase, chitinase). See, for example, Redolfi et al. (1983) Neth. J. Plant Pathol. 89:245-254; Uknes et al. (1992) Plant Cell 4:645-656; and Van Loon (1985) Plant Mol. Virol. 4:111-116. See also the application entitled "Inducible Maize Promoters", U.S. patent application Ser. No. 09/257,583, filed Feb. 25, 1999.

[0075] In addition to plant promoters, other suitable promoters may be derived from bacterial origin (*e.g.*, the octopine synthase promoter, the nopaline synthase promoter and other promoters derived from Ti plasmids), or may be derived from viral promoters (*e.g.*, 35S and 19S RNA promoters of cauliflower mosaic virus (CaMV), constitutive promoters of tobacco mosaic virus, cauliflower mosaic virus (CaMV) 19S and 35S promoters, or figwort mosaic virus 35S promoter).

[0076] The term "enhancer" refers to a nucleic acid molecule, or a nucleic acid sequence, that can recruit transcriptional regulatory proteins such as transcriptional activators, to enhance transcriptional activation by increasing promoter activity. Suitable enhancers can be derived from regions proximate to a native promoter of interest (homologous sources) or can be derived from non-native contexts (heterologous sources) and operably-linked to any promoter of interest within NtHMA RNAi expression vectors to enhance the activity and/or the tissue-specificity of a promoter. Some enhancers can operate in any orientation with respect to the orientation of a transcription unit. For example, enhancers may be positioned upstream or downstream of a transcriptional unit comprising a promoter and a NtHMA RNAi construct. Persons skilled in the art are capable of operably-

linking enhancers and promoters to optimize the transcription levels of NtHMA RNAi constructs.

[0077] B. RNAi Expression Vectors Comprising NtHMA RNAi Constructs encoding NtHMA RNAi Polynucleotides

[0078] RNA Interference ("RNAi") or RNA silencing is an evolutionarily conserved process by which specific mRNAs can be targeted for enzymatic degradation. A double-stranded RNA (dsRNA) must be introduced or produced by a cell (*e.g.*, dsRNA virus, or NtHMA RNAi polynucleotides) to initiate the RNAi pathway. The dsRNA can be converted into multiple siRNA duplexes of 21-23 bp length ("siRNAs") by RNases III, which are dsRNA-specific endonucleases ("Dicer"). The siRNAs can be subsequently recognized by RNA-induced silencing complexes ("RISC") that promote the unwinding of siRNA through an ATP-dependent process. The unwound antisense strand of the siRNA guides the activated RISC to the targeted mRNA (*e.g.*, NtHMA RNA variants) comprising a sequence complementary to the siRNA anti-sense strand. The targeted mRNA and the anti-sense strand can form an A-form helix, and the major groove of the A-form helix can be recognized by the activated RISC. The target mRNA can be cleaved by activated RISC at a single site defined by the binding site of the 5'-end of the siRNA strand. The activated RISC can be recycled to catalyze another cleavage event.

[0079] FIG. 2A illustrates the construction of an exemplary NtHMA RNAi expression vector. In FIG. 2A, "S "I denotes Step I and "S II" denotes Step II of the construction process. Various embodiments are directed to NtHMA RNAi expression vectors comprising NtHMA RNAi constructs encoding NtHMA RNAi polynucleotides exhibiting RNA interference activity by reducing the expression level of NtHMA mRNAs, NtHMA pre-mRNAs, and related NtHMA RNA variants. The expression vectors comprise a promoter positioned upstream and operably-linked to a NtHMA RNAi construct, as further defined below. NtHMA RNAi expression vectors comprise a suitable minimal core promoter, a NtHMA RNAi construct of interest, an upstream (5') regulatory region, a downstream (3') regulatory region, including transcription termination and polyadenylation signals,

and other sequences known to persons skilled in the art, such as various selection markers.

[0080] The NtHMA polynucleotides can be produced in various forms, including as double-stranded hairpin-like structures ("dsRNAi"). The NtHMA dsRNAi can be enzymatically converted to double-stranded NtHMA siRNAs. One of the strands of the NtHMA siRNA duplex can anneal to a complementary sequence within the target NtHMA mRNA and related NtHMA RNA variants. The siRNA/mRNA duplexes are recognized by RISC that can cleave NtHMA RNAs at multiple sites in a sequence-dependent manner, resulting in the degradation of the target NtHMA mRNA and related NtHMA RNA variants.

[0081] FIG. 2B illustrates the formation of a hypothetical double-stranded RNA duplex formed (as "stem-loop-stem" structure) as a product transcribed from an exemplary NtHMA RNAi construct. In FIG. 2B, a hypothetical NtHMA RNAi construct 10 is shown, comprising 3 double-stranded DNA fragments, such as fragments 1-3. Arrow I denotes formation of RNAi construct, arrow II transcription, and arrow III formation of dsRNA. Fragment 1 is positioned upstream and operably-linked to fragment 2, which is positioned upstream and operably-linked to fragment 3, for which DNA strands/sequences 4, 6, and 8 are liked together in tandem to form strand 11, as shown. Alternatively, a NtHMA RNAi construct comprises "a sense sequence" 5, which is positioned upstream and operably-linked to "a spacer sequence" 7, which is positioned upstream and operably-linked to "a reverse complementary sequence" 9. The strands/sequences 5, 7, and 9 can be liked together in tandem to form strand/sequence 12. Alternatively, a NtHMA RNAi construct comprises "a sense sequence" 8, which is positioned upstream and operably-linked to "a spacer sequence" 6, which is positioned upstream and operably-linked to "a reverse complementary sequence" 4. The strands/sequences 8, 6, and 4 can be liked together in tandem to form strand/sequence 11. Strand 12 is complementary to strand 11. Strand 11 is a template strand that can be transcribed into a NtHMA RNAi polynucleotide 13. The NtHMA RNAi polynucleotide 13 forms a hair-pin ("stem-loop-stem") structure, in which the stem 16 is a complementary region resulting from intra-molecular base-pair interactions of the NtHMA RNAi polynucleotide 15 and the loop 17

represents a non-complementary region encoded by a spacer sequence, such as strands/sequences 6 or 7.

[0082] Any NtHMA RNA polynucleotide of interest can be produced by selecting a suitable sequence composition, loop size, and stem length for producing the NtHMA hairpin duplex. A suitable range for designing stem lengths of a hairpin duplex, includes stem lengths of 20-30 nucleotides, 30-50 nucleotides, 50-100 nucleotides, 100-150 nucleotides, 150-200 nucleotides, 200-300 nucleotides, 300-400 nucleotides, 400-500 nucleotides, 500-600 nucleotides, and 600-700 nucleotides. A suitable range for designing loop lengths of a hairpin duplex, includes loop lengths of 4-25 nucleotides, 25-50 nucleotides, or longer if the stem length of the hair duplex is substantial. In certain context, hairpin structures with duplexed regions longer than 21 nucleotides may promote effective siRNA-directed silencing, regardless of loop sequence and length.

[0083] Exemplary NtHMA RNAi constructs for down-regulating the expression level of the NtHMA gene (SEQ ID NO:1) and other NtHMA-related genes include the following:

[0084] Various embodiments are directed to NtHMA RNAi expression vectors comprising a NtHMA RNAi construct that comprises one or more of: intron 1 (SEQ ID NO:4), exon 1 (SEQ ID NO:5), intron 2 (SEQ ID NO:6), exon 2 (SEQ ID NO:7), intron 3 (SEQ ID NO:8), exon 3 (SEQ ID NO:9), intron 4 (SEQ ID NO:10), exon 4 (SEQ ID NO:11), intron 5 (SEQ ID NO:12), exon 5 (SEQ ID NO:13), intron 6 (SEQ ID NO.14), exon 6 (SEQ ID NO:15), intron 7 (SEQ ID NO:16), exon 7 (SEQ ID NO:17), intron 8 (SEQ ID NO:18), exon 8 (SEQ ID NO:19), intron 9 (SEQ ID NO:20), exon 9 (SEQ ID NO:21), intron 10 (SEQ ID NO:22), exon 10 (SEQ ID NO:23), intron 11 (SEQ ID NO:24, exon 11 (SEQ ID NO:25), and intron 12 (SEQ ID NO:26), fragments thereof, and variants thereof.

[0085] Various embodiments are directed to NtHMA RNAi expression vectors comprising: a NtHMA RNAi construct having at least 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, and 99% sequence identity to a sequence selected from the group consisting of: exon 1 (SEQ ID NO:5), a fragment of exon 1 (SEQ ID NO:5), exon 2 (SEQ ID NO:7), a fragment of exon 2 (SEQ ID NO:7), exon 3 (SEQ ID NO:9), a fragment of exon 3 (SEQ ID NO:9), exon 4 (SEQ ID NO:11), a fragment

of exon 4 (SEQ ID NO:11), exon 5 (SEQ ID NO:13), a fragment of exon 5 (SEQ ID NO:13), exon 6 (SEQ ID NO:15), a fragment of exon 6 (SEQ ID NO:15), exon 7 (SEQ ID NO:17), a fragment of exon 7 (SEQ ID NO:17), exon 8 (SEQ ID NO:19), a fragment of exon 8 (SEQ ID NO:19), exon 9 (SEQ ID NO:21), a fragment of exon 9 (SEQ ID NO:21), exon 10 (SEQ ID NO:23), a fragment of exon 10 (SEQ ID NO:23), exon 11 (SEQ ID NO:25), and a fragment of exon 11 (SEQ ID NO:25).

[0086] Various embodiments are directed to NtHMA RNAi expression vectors comprising: a NtHMA RNAi construct encoding NtHMA RNAi polynucleotides capable of self-annealing to form a hairpin structure, in which the RNAi construct comprises (a) a first sequence having at least 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, and 99% sequence identity to SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:47; (b) a second sequence encoding a spacer element of the NtHMA RNAi polynucleotide that forms a loop of the hairpin structure; and (c) a third sequence comprising a reverse complementary sequence of the first sequence, positioned in the same orientation as the first sequence, wherein the second sequence is positioned between the first sequence and the third sequence, and the second sequence is operably-linked to the first sequence and to the third sequence.

[0087] Various embodiments are directed to NtHMA RNAi expression vectors comprising: a NtHMA RNAi construct encoding NtHMA RNAi polynucleotides capable of self-annealing to form a hairpin structure, in which the RNAi construct comprises (a) a first sequence having at least 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, and 99% sequence identity to SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:47; (b) a second sequence encoding a spacer element of the NtHMA RNAi polynucleotide that forms a loop of the hairpin structure; and (c) a third sequence comprising a reverse complementary sequence of the first sequence (SEQ ID NO:46 or SEQ ID NO:48), positioned in the same orientation as the first sequence, wherein the second sequence is positioned between the first sequence and the third sequence, and the second sequence is operably-linked to the first sequence and to the third sequence.

[0088] Various embodiments are directed to NtHMA RNAi expression vectors comprising: a NtHMA RNAi construct that comprises a first sequence having "substantial similarity," or having at least 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%,

96%, 97%, 98%, and 99% sequence identity to SEQ ID NO:3, or portions of SEQ ID NO:3. Various embodiments are directed to NtHMA RNAi expression vectors comprising a NtHMA RNAi construct that comprises a first sequence having "substantial similarity," or having at least 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, and 99% sequence identity to SEQ ID NO:47, or portions of SEQ ID NO:47.

[0089] Various embodiments are directed to a NtHMA RNAi expression vectors comprising: a NtHMA RNAi construct that comprises a second sequence having "substantial similarity," or having at least 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, and 99% sequence identity to a sequence selected from the group consisting of: intron 1 (SEQ ID NO:4), a fragment of intron 1 (SEQ ID NO:4), intron 2 (SEQ ID NO:6), a fragment of intron 2 (SEQ ID NO:6), intron 3 (SEQ ID NO:8), a fragment of intron 3 (SEQ ID NO:8), intron 4 (SEQ ID NO:10), a fragment of intron 4 (SEQ ID NO:10), intron 5 (SEQ ID NO:12), a fragment of intron 5 (SEQ ID NO:12), intron 6 (SEQ ID NO:14), a fragment of intron 6 (SEQ ID NO:14), intron 7 (SEQ ID NO:16), a fragment of intron 7 (SEQ ID NO:16), intron 8 (SEQ ID NO:18), a fragment of intron 8 (SEQ ID NO:18), intron 9 (SEQ ID NO:20), a fragment of intron 9 (SEQ ID NO:20), intron 10 (SEQ ID NO:22), a fragment of intron 10 (SEQ ID NO:22), intron 11 (SEQ ID NO:24), a fragment of intron 11 (SEQ ID NO:24), intron 12 (SEQ ID NO:26), and a fragment of intron 12 (SEQ ID NO:26). Alternatively, the second sequence of the NtHMA RNAi construct can be randomly generated without utilizing an intron sequence derived from the NtHMA gene (SEQ ID NO:1).

[0090] Various embodiments are directed to NtHMA RNAi expression vectors comprising: a NtHMA RNAi construct that comprises a third sequence having "substantial similarity," or having at least 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, and 99% sequence identity to SEQ ID NO:46, or portions of SEQ ID NO:46. Various embodiments are directed to NtHMA RNAi expression vectors comprising a NtHMA RNAi construct that comprises a third sequence having "substantial similarity," or having at least 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, and 99% sequence identity to SEQ ID NO:48, or portions of SEQ ID NO:48.

[0091] Various embodiments are directed to NtHMA RNAi expression vectors comprising: a NtHMA RNAi construct that comprises a third sequence having "substantial similarity," or having at least 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, and 99% sequence identity to a reverse complementary sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NO:27 (exon 1), a fragment of SEQ ID NO:27 (exon 1), SEQ ID NO:28 (exon 2), a fragment of SEQ ID NO:28 (exon 2), SEQ ID NO:29 (exon 3), a fragment of SEQ ID NO:29 (exon 3), SEQ ID NO:30 (exon 4), a fragment of SEQ ID NO:30 (exon 4), SEQ ID NO:31 (exon 5), a fragment of SEQ ID NO:31 (exon 5), SEQ ID NO:32 (exon 6), a fragment of SEQ ID NO:32 (exon 6), SEQ ID NO:33 (exon 7), a fragment of SEQ ID NO:33 (exon 7), SEQ ID NO:34 (exon 8), a fragment of SEQ ID NO:34 (exon 8), SEQ ID NO:35 (exon 9), a fragment of SEQ ID NO:35 (exon 9), SEQ ID NO:36 (exon 10), a fragment of SEQ ID NO:36 (exon 10), SEQ ID NO:37 (exon 11), and a fragment of SEQ ID NO:37 (exon 11).

[0092] Various embodiments are directed to NtHMA RNAi expression vectors comprising a NtHMA RNAi construct that comprises: SEQ ID NO:38 ("sense sequence/fragment"), the second sequence comprises SEQ ID NO:39 ("spacer sequence/fragment") and the third sequence comprises SEQ ID NO:40 ("anti-sense sequence/fragment").

[0093] Various embodiments are directed to NtHMA RNAi expression vectors comprising a NtHMA RNAi construct that comprises: SEQ ID NO:42 ("sense sequence/fragment"), the second sequence comprises SEQ ID NO:43 ("spacer sequence/fragment"), and the third sequence comprises SEQ ID NO:44 ("anti-sense sequence/fragment").

[0094] Alternatively, the disclosed sequences can be utilized for constructing various NtHMA polynucleotides that do not form hairpin structures. For example, a NtHMA long double-stranded RNA can be formed by (1) transcribing a first strand of the NtHMA cDNA by operably-linking to a first promoter, and (2) transcribing the reverse complementary sequence of the first strand of the NtHMA cDNA fragment by operably-linking to a second promoter. Each strand of the NtHMA polynucleotide can be transcribed from the same expression vector, or from different expression vectors. The NtHMA RNA duplex having RNA interference activity can be enzymatically converted to siRNAs to reduce NtHMA RNA levels.

[0095] C. Expression Vectors for Reducing NtHMA Gene Expression by Co-suppression

[0096] Various compositions and methods are provided for reducing the endogenous expression levels for members of the NtHMA gene family by promoting co-suppression of NtHMA gene expression. The phenomenon of co-suppression occurs as a result of introducing multiple copies of a transgene into a plant cell host. Integration of multiple copies of a transgene can result in reduced expression of the transgene and the targeted endogenous gene. The degree of co-suppression is dependent on the degree of sequence identity between the transgene and the targeted endogenous gene. The silencing of both the endogenous gene and the transgene can occur by extensive methylation of the silenced loci (i.e., the endogenous promoter and endogenous gene of interest) that can preclude transcription. Alternatively, in some cases, co-suppression of the endogenous gene and the transgene can occur by post transcriptional gene silencing ("PTGS"), in which transcripts can be produced but enhanced rates of degradation preclude accumulation of transcripts. The mechanism for co-suppression by PTGS is thought to resemble RNA interference, in that RNA seems to be both an important initiator and a target in these processes, and may be mediated at least in part by the same molecular machinery, possibly through RNA-guided degradation of mRNAs.

[0097] Co-suppression of members of the NtHMA gene family can be achieved by integrating multiple copies of the NtHMA cDNA or fragments thereof, as transgenes, into the genome of a plant of interest. The host plant can be transformed with an expression vector comprising a promoter operably-linked to NtHMA cDNA or fragments thereof. Various embodiments are directed to expression vectors for promoting co-suppression of endogenous genes of the NtHMA family comprising: a promoter operably-linked to NtHMA cDNA identified as Clone P6663 (SEQ ID NO:3) or a fragment thereof, or NtHMA cDNA identified as Clone P6643 (SEQ ID NO:47) or a fragment thereof. Various embodiments are directed to expression vectors for promoting co-suppression of endogenous genes of the NtHMA family comprising: a promoter operably-linked to NtHMA cDNA, or a

fragment thereof, having at least about 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% sequence identity to SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:47.

[0098] Various embodiments are directed to methods for reducing the expression level of endogenous genes of the NtHMA family by integrating multiple copies of NtHMA cDNA or a fragment thereof into a plant genome, comprising: transforming a plant cell host with an expression vector that comprises a promoter operably-linked to SEQ ID NO:3, or a fragment thereof; or SEQ ID NO:47, or a fragment thereof. Various embodiments are directed to methods for reducing the expression level of endogenous genes of the NtHMA family by integrating multiple copies of NtHMA cDNA, or a fragment thereof, into a plant genome, comprising: transforming a plant cell host with an expression vector that comprises a promoter operably-linked to NtHMA cDNA, or a fragment thereof, having at least about 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% sequence identity to SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:47.

[0099] D. Expression Vectors for Reducing NtHMA Gene Expression by Inhibition of Translation by Anti-sense Agents

[0100] Various compositions and methods are provided for reducing the endogenous expression level of the NtHMA gene family by inhibiting the translation of NtHMA mRNA. A host plant cell can be transformed with an expression vector comprising: a promoter operably-linked to NtHMA cDNA or a fragment thereof, positioned in anti-sense orientation with respect to the promoter to enable the expression of RNA polynucleotides having a sequence complementary to a portion of NtHMA mRNA. Various expression vectors for inhibiting the translation of HMA mRNA comprise: a promoter operably-linked to NtHMA cDNA identified as Clone P6663 (SEQ ID NO:3) or a fragment thereof; or NtHMA cDNA identified as Clone P6643 (SEQ ID NO:47) or a fragment thereof, in which the NtHMA cDNA, or the fragment thereof, is positioned in anti-sense orientation with respect to the promoter. Various expression vectors for inhibiting the translation of HMA mRNA comprise: a promoter operably-linked to a NtHMA cDNA, or a fragment thereof, having at least about 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% sequence identity to SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:47, in which the NtHMA cDNA, or the fragment thereof, is positioned in anti-sense orientation with respect to the promoter. The lengths of anti-sense NtHMA RNA polynucleotides can vary,

including 15-20 nucleotides, 20-30 nucleotides, 30-50 nucleotides, 50-75 nucleotides, 75-100 nucleotides, 100-150 nucleotides, 150-200 nucleotides, and 200-300 nucleotides.

[0101] Various embodiments are directed to methods for reducing the expression level of endogenous genes of the NtHMA family by inhibiting NtHMA mRNA translation, comprising: transforming a plant cell host with an expression vector that comprises a promoter operably-linked to NtHMA cDNA identified as Clone P6663 (SEQ ID NO:3) or a fragment thereof; or NtHMA cDNA identified as Clone P6643 (SEQ ID NO:47) or a fragment thereof, in which the NtHMA cDNA, or the fragment thereof, is positioned in anti-sense orientation with respect to the promoter. Various embodiments are directed to methods for reducing the expression level of endogenous genes of the NtHMA family by inhibiting NtHMA mRNA translation, comprising: transforming a plant cell host with an expression vector that comprises a promoter operably-linked to a NtHMA cDNA, or a fragment thereof, having at least about 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% sequence identity to SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:47, in which the NtHMA cDNA, or the fragment thereof, is positioned in anti-sense orientation with respect to the promoter.

[0102] E. Other Compositions and Methods for Reducing NtHMA Gene Expression

[0103] Methods for obtaining conservative variants and more divergent variants of NtHMA polynucleotides and polypeptides are known to persons skilled in the art. Any plant of interest can be genetically modified by various methods known to induce mutagenesis, including site-directed mutagenesis, oligonucleotide-directed mutagenesis, chemically-induced mutagenesis, irradiation-induced mutagenesis, and other equivalent methods. For example, site-directed mutagenesis is described in, *e.g.*, Smith (1985) "In vitro mutagenesis," Ann. Rev. Genet. 19:423-462, and references therein, such as Botstein & Shortle (1985) "Strategies and Applications of *in vitro* Mutagenesis," Science 229:1193-1201; and in Carter (1986) "Site-directed mutagenesis," Biochem. J. 237:1-7. Oligonucleotide-directed mutagenesis is described in, *e.g.*, Zoller & Smith (1982) "Oligonucleotide-directed Mutagenesis using M13-derived Vectors: an Efficient and

General Procedure for the Production of Point mutations in any DNA Fragment," Nucleic Acids Res. 10:6487-6500. Mutagenesis utilizing modified bases is described in, *e.g.*, Kunkel (1985) "Rapid and Efficient Site-specific Mutagenesis without Phenotypic Selection," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488-492, and in Taylor et al. (1985) "The Rapid Generation of Oligonucleotide-directed Mutations at High Frequency using Phosphorothioate-modified DNA," Nucl. Acids Res. 13: 8765-8787. Mutagenesis utilizing gapped duplex DNA is described in, *e.g.*, Kramer et al. (1984) "The Gapped Duplex DNA Approach to Oligonucleotide-directed Mutation Construction," Nucl. Acids Res. 12: 9441-9460). Point-mismatch mutagenesis is described in, *e.g.*, Kramer et al. (1984) "Point Mismatch Repair," Cell 38:879-887). Double-strand break mutagenesis is described in, *e.g.*, Mandecki (1986) "Oligonucleotide-directed Double-strand Break Repair in Plasmids of Escherichia coli: A Method for Site-specific Mutagenesis," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:7177-7181, and in Arnold (1993) "Protein Engineering for Unusual Environments," Current Opinion in Biotechnology 4:450-455). Mutagenesis utilizing repair-deficient host strains is described in, *e.g.*, Carter et al. (1985) "Improved Oligonucleotide Site-directed Mutagenesis using M13 Vectors," Nucl. Acids Res. 13: 4431-4443. Mutagenesis by total gene synthesis is described in, *e.g.*, Nambiar et al. (1984) "Total Synthesis and Cloning of a Gene Coding for the Ribonuclease S Protein," Science 223: 1299-1301. DNA shuffling is described in, *e.g.*, Stemmer (1994) "Rapid Evolution of a Protein *in vitro* by DNA Shuffling," Nature 370:389-391, and in Stemmer (1994) "DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: *In Vitro* Recombination for Molecular Evolution," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10747-10751.

[0104] Alternatively, NtHMA genes can be targeted for inactivation by introducing transposons (and IS elements) into the genomes of plants of interest. These mobile genetic elements can be introduced by sexual cross-fertilization and insertion mutants can be screened for loss in NtHMA activity, such as reduced Cd transport. The disrupted NtHMA gene in a parent plant can be introduced into other plants by crossing the parent plant with plant not subjected to transposon-induced mutagenesis by, *e.g.*, sexual cross-fertilization. Any standard breeding techniques known to persons skilled in the art can be utilized. In one embodiment, one or more NtHMA-related genes can be inactivated by the insertion of one or

more transposons. Mutations can result in homozygous disruption of one or more NtHMA genes, in heterozygous disruption of one or more NtHMA genes, or a combination of both homozygous and heterozygous disruptions if more than one NtHMA gene is disrupted. Suitable transposable elements can be selected from two broad classes, designated as Class I and Class II. Suitable Class I transposable elements include retrotransposons, retroposons, and SINE-like elements. Such methods are known to persons skilled in the art as described in Kumar and Bennetzen (1999), Plant Retrotransposons in Annual Review of Genetics 33:479.

[0105] Alternatively, NtHMA genes can be targeted for inactivation by a method referred to as Targeting Induced Local Lesions IN Genomics ("TILLING"), which combines high-density point mutations with rapid sensitive detection of mutations. Typically, plant seeds are exposed to mutagens, such as ethylmethanesulfonate (EMS) or EMS alkylates guanine, which typically leads to mispairing. Suitable agents and methods are known to persons skilled in the art as described in McCallum et al., (2000), "Targeting Induced Local Lesions IN Genomics (TILLING) for Plant Functional Genomics," Plant Physiology 123:439-442; McCallum et al., (2000) "Targeted screening for induced mutations," Nature Biotechnology 18:455-457; and Colbert et al., (2001) "High-Throughput Screening for Induced Point Mutations," Plant Physiology 126:480-484.

[0106] Alternatively, NtHMA genes can be targeted for inactivation by introducing ribozymes derived from a number of small circular RNAs that are capable of self-cleavage and replication in *plants*. These RNAs can replicate either alone (viroid RNAs) or with a helper virus (satellite RNAs). Examples of suitable RNAs include those derived from avocado sunblotch viroid and satellite RNAs derived from tobacco ringspot virus, lucerne transient streak virus, velvet tobacco mottle virus, solanum nodiflorum mottle virus, and subterranean clover mottle virus. Various target RNA-specific ribozymes are known to persons skilled in the art as described in Haseloff et al. (1988) Nature, 334:585-591.

[0107] III. Transgenic Plants, Cell Lines, and Seeds Comprising NtHMA RNAi Polynucleotides and Related Methods

[0108] Various embodiments are directed to transgenic plants genetically modified to reduce the NtHMA gene expression level by various methods that can utilized for silencing NtHMA gene expression, and thereby, producing transgenic plants in which the expression level of NtHMA transporters can be reduced within plant tissues of interest. Rates of heavy metal transport and distribution patterns of heavy metal transport, in particular, cadmium transport, can be altered in transgenic plants produced according to the disclosed methods and compositions. Plants suitable for genetic modification include monocots and dicots.

[0109] Various embodiments are directed to transgenic tobacco plants genetically modified to reduce the NtHMA gene expression level by various methods, known to persons skilled in the art, that can be utilized for down-regulating NtHMA gene expression, and thereby, producing transgenic tobacco plants in which the expression level of NtHMA transporters can be reduced within plant tissues of interest. Various expression vectors have been provided to produce transgenic lines of tobacco of any variety exhibiting reduced levels of NtHMA gene expression. The disclosed compositions and methods can be applied to any plant species of interest, including plants of the genus *Nicotiana*, various species of *Nicotiana*, including *N. rustica* and *N. tabacum* (e.g., LA B21, LN KY171, TI 1406, Basma, Galpao, Perique, Beinhart 1000-1, and Petico). Other species include *N. acaulis, N. acuminata, N. acuminata var. multiflora, N. africana, N. alata, N. amplexicaulis, N. arentsii, N. attenuata, N. benavidesii, N. benthamiana, N. bigelovii, N. bonariensis, N. cavicola, N. clevelandii, N. cordifolia, N. corymbosa, N. debneyi, N. excelsior, N. forgetiana, N. fragrans, N. glauca, N. glutinosa, N. goodspeedii, N. gossei, N. hybrid, N. ingulba, N. kawakamii, N. knightiana, N. langsdorffii, N. linearis, N. longiflora, N. maritima, N. megalosiphon, N. miersii, N. noctiflora, N. nudicaulis, N. obtusifolia, N. occidentalis, N. occidentalis subsp. hesperis, N. otophora, N. paniculata, N. pauciflora, N. petunioides, N. plumbaginifolia, N. quadrivalvis, N. raimondii, N. repanda, N. rosulata, N. rosulata subsp. ingulba, N. rotundifolia, N. setchellii, N. simulans, N. solanifolia, N. spegazzinii, N. stocktonii, N. suaveolens, N. sylvestris, N. thyrsiflora, N. tomentosa, N. tomentosiformis, N. trigonophylla, N. umbratica, N. undulata, N. velutina, N. wigandioides, and N. x sanderae.* Suitable plants for transformation include any plant tissue capable of transformation by various methods of transforming plants

known by persons skilled in the art, including electroporation, micro-projectile bombardment, and *Agrobacterium*-mediated transfer as described, for example, in U.S. Pat. No. 4,459,355 that discloses a method for transforming susceptible plants, including dicots, with an *Agrobacterium* strain containing a Ti plasmid; U.S. Pat. No. 4,795,855 that discloses transformation of woody plants with an *Agrobacterium* vector; U.S. Pat. No. 4,940,838 that discloses a binary *Agrobacterium* vector; U.S. Pat. No. 4,945,050; and U.S. Pat. No. 5,015,580.

[0110] Various embodiments are directed to transgenic tobacco plants genetically modified to exogenously express a RNAi construct encoding NtHMA RNAi polynucleotides that facilitate the degradation of NtHMA RNA transcripts, and consequently, that reduce the number of RNA transcripts available for translation into NtHMA transporters. Various embodiments are directed to transgenic plants comprising an expression vector that enable the expression of NtHMA polynucleotides produced according to the disclosed methods. Various embodiments are directed to cell lines derived from transgenic plants produced according to the disclosed methods. Various embodiments are directed to transgenic seeds derived from transgenic plants produced according to the disclosed methods.

[0111] Various embodiments are directed to methods for reducing the NtHMA gene expression levels in plants, the method comprising reducing the expression level of a NtHMA gene, which can be accomplished by various methods known to persons skilled in the art. As examples, this disclosure described: (1) RNA interference method for reducing steady-state level of endogenous NtHMA RNA variants available for translation by expression of NtHMA RNAi polynucleotides; (2) co-suppression method for reducing transcription of NtHMA gene(s) by integrating multiple copies of the NtHMA cDNA or fragments thereof, as transgenes, into a plant genome; (3) anti-sense method for reducing the NtHMA translation by the expression of anti-sense polynucleotides that can target NtHMA RNA; and (4) various methods for inducing mutagenesis.

[0112] Various embodiments are directed to transgenic tobacco plants genetically modified to reduce the NtHMA gene expression level by various methods, known to persons skilled in the art, and further modified either to reduce the expression of a second endogenous gene of interest (i.e., not NtHMA-related)

or to enhance the expression of an exogenous gene of interest (i.e., not NtHMA-related). For example, the down-regulation of a second endogenous gene of interest encoding an enzyme involved in the biosynthesis of alkyloids may be desirable. In other situations, the enhancement in the expression level of a transgene encoding a recombinant protein of interest, such as a human hormone for therapeutic use, may be desirable. Persons skilled in the art are capable of producing various transgenic plants that can be modified, for example, to exogenously express NtHMA RNAi polynucleotides and at least one recombinant gene product of interest, such as a recombinant human growth factor or RNAi polynucleotides that can target a second gene of interest not related to the NtHMA family.

[0113] Producing transgenic plants according to the disclosed methods provides a number of advantages. Transgenic plants, including transgenic tobacco plants, can be grown in soils containing variable Cd concentrations, or in soils containing less than desirable Cd concentrations. These transgenic plants and derivative seeds can provide more options for cultivating them in a broader range of soil environments, which may increase the amount of cultivatable soils available to practitioners (*e.g.*, farmers). Furthermore, these transgenic plants, exhibiting reduced Cd content, compared to non-transgenic counterparts can be consumed directly as edible products. The consumption of edible portions of these transgenic plants can be a healthier option compared to the consumption of non-transgenic counterparts. Suitable plants that can be genetically modified according to the disclosed methods, include plants cultivatable for agricultural use, including rice, corn, squash, soybeans, lettuce, potatoes, beats, herbs, wheat, barley, carrots, etc. The % Cd reduction in these transgenic plants, including the leaf lamina portion, can be approximately at least 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, and 99%, when compared to non-transgenic counterparts. The Cd content of these transgenic plants, including the leaf lamina portion, is a value from a range from about 0.01 to about 0.05 ppm, from about 0.01 to about 0.1 ppm, from about 0.01 to about 0.5 ppm, from about 0.01 to about 1.0 ppm, and from about 0.01 to about 5 ppm.

[0114] IV. Consumable Products Incorporating Tobacco Leaves Genetically Modified to Contain Reduced Cd Content

[0115] Various embodiments provide transgenic plants, in which the expression level of members of the NtHMA gene family is substantially reduced to curtail or impede Cd transport into the leaf lamina. The leaf lamina derived from transgenic tobacco plants, produced according to the disclosed methods, can be incorporated into various consumable products containing Cd at a level substantially below that of consumable products made by incorporating tobacco leaves derived from plants of the same genotype that were grown under identical conditions, but not genetically modified with respect to the reduced expression level of members of the NtHMA gene family ("non-transgenic counterparts").

[0116] In some embodiments, these transgenic plants exhibiting reduced Cd content compared to non-transgenic counterparts can be incorporated into consumable products, including various smokable articles, such as cigars, cigarettes, and smokeless tobacco products (*i.e.*, non-combustible). Smokable articles and smokeless tobacco products, produced by incorporating tobacco leaves derived from tobacco plants genetically modified to contain reduced Cd levels according to the disclosed methods, can provide healthier options compared to non-transgenic counterparts.

[0117] Smokeless tobacco products incorporating tobacco plants genetically modified according to the disclosed methods can be manufactured in any format suitable for comfort in a consumer's oral cavity. Smokeless tobacco products contain tobacco in any form, including as dried particles, shreds, granules, powders, or a slurry (i.e., tobacco extract), deposited on, mixed in, surrounded by, or otherwise combined with other ingredients in any format, such as flakes, films, tabs, foams, or beads. Smokeless tobacco products may be wrapped with a material, which may be edible (i.e., orally disintegrable) or nonedible. Liquid contents of smokeless tobacco products can be enclosed in a form, such as beads, to preclude interaction with a water-soluble wrapper. The wrapper may be shaped as a pouch to partially or completely enclose tobacco-incorporating compositions, or to function as an adhesive to hold together a plurality of tabs, beads, or flakes of tobacco. A wrapper may also enclose a moldable tobacco composition that conforms to the shape of a consumer's mouth. An orally disintegrable wrapper may

enclose smokeless tobacco, e.g., as dry snuff or soluble tobacco, and may be formed on continuous thermoforming or horizontal form/fill/seal equipment or other suitable packaging equipment using edible films (which may or may not contain tobacco). Exemplary materials for constructing a wrapper include film compositions comprising HPMC, CMC, pectin, alginates, pullulan, and other commercially viable, edible film-forming polymers. Other wrapping materials may include pre-formed capsules produced from gelatin, HPMC, starch/carrageenan, or other commercially available materials. Such wrapping materials may include tobacco as an ingredient. Wrappers that are not orally disintegrable may be composed of woven or nonwoven fabrics, of coated or uncoated paper, or of perforated or otherwise porous plastic films. Wrappers may incorporate flavoring and/or coloring agents. Smokeless products can be assembled together with a wrapper utilizing any method known to persons skilled in the art of commercial packaging, including methods such as blister packing and stik-paking, in which a small package can be formed by a vertical form/fill/seal packaging machine.

[0118] The % Cd reduction in these smokable articles and smokeless products, produced by incorporating tobacco leaves derived from tobacco plants genetically modified to contain reduced Cd levels, is a value of at least about 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, and 100%, when compared to consumable products derived from non-transgenic counterparts. In some embodiments, the Cd content of these smokable articles and smokeless products, produced by incorporating tobacco leaves derived from tobacco plants genetically modified to contain reduced Cd levels, is a value from a range from about 0.01 to about 0.05 ppm, from about 0.01 to about 0.1 ppm, from about 0.01 to about 0.5 ppm, from about 0.01 to about 1.0 ppm, and from about 0.01 to about 5 ppm.

[0119] The degree of Cd accumulation in plants can be substantially variable depending on several parameters attributed to the complexity of the genotype and the growth environment. For example, Cd concentrations in field-grown tobacco leaves can be extremely variable depending on factors such as the agro-climate, soil parameters, and cultivars. Furthermore, the relative Cd distribution patterns within different portions of a tobacco plant can vary according to the species, the organ/tissue, and growth conditions (*i.e.*, field-grown vs. hydroponically-grown). On

average, the Cd concentrations measured in field-grown tobacco leaves (including midribs and veins) can be in the range from approximately 0.5 to 5 ppm (parts per million, or ug/g of dry weight of tobacco leaves). However, many published Cd levels typically do not define the tobacco maturity stage, the tobacco variety, or the particular leaf portions (*i.e.*, removal from leaf stalk position) harvested for analysis. In some varieties, the lower leaves may accumulate higher Cd levels than the medium and upper leaves. At the intracellular level, Cd can be found in various cell components of a plant cell, including the cell wall, cytoplasm, chloroplast, nucleus, and vacuoles.

[0120] Furthermore, Cd content measured in tobacco leaves can vary substantially depending on the Cd levels in the soil environment where the tobacco plants were grown. The leaves of tobacco grown in Cd-contaminated areas can accumulate Cd from about 35 ppm or higher, compared to the leaves of genetically identical counterparts grown in non-contaminated areas, which can accumulate Cd at a range from approximately 0.4 to approximately 8 ppm. The vacuoles within the leaves of plants grown in Cd-contaminated areas can accumulate very high Cd concentrations. Methods for modifying the disclosed compositions to be suitable for a given plant species of interest are known to persons skilled in the art.

EXAMPLES

EXAMPLE 1

Cloning and Exon Mapping of a Full-length *Nicotiana* NtHMA Genomic Clone

[0121] Two partial genomic clones representing different portions of an endogenous NtHMA gene were independently identified, referred to as "CHO_OF96xf01.ab1" and "CHO_OF261xo09c1.ab1." Based on sequence information obtained from the partial genomic clones, a full-length genomic clone (_HO-18-2) and 4 full-length NtHMA cDNAs were subsequently identified, including clone P6663 (SEQ ID NO:3) and clone P6643 (SEQ ID NO:47). The exon and intron subregions of full-length genomic clone (_HO-18-2) (17,921 bp) were

mapped. As shown in FIG. 1, the full-length, endogenous NtHMA gene cloned from *Nicotiana* comprises 11 exons consisting of 3392 nucleotides in total.

EXAMPLE 2

Construction of NtHMA RNAi Expression Vector PBI121-NtHMA (660-915) encoding RNAi Polynucleotides

[0122] Table 1 provides a list of nucleotide positions mapped to each exon within the isolated NtHMA genomic clone (SEQ ID NO: 1).

Table 1

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

The partial genomic clone CHO_OF96xf01.ab1 includes a part of intron 4, exon 4, intron 5, exon 5, intron 6, and a part of exon 6, as shown in FIG. 1, and listed under Table 1. The partial genomic clone CHO_OF261xo09c1 includes a part of intron 7, exon 7, intron 8, exon 8, and a part of exon 9, as shown in FIG. 1. To produce transgenic plants that can stably produce recombinant NtHMA RNAi polynucleotides of interest that can facilitate the degradation of endogenous RNA transcripts encoding NtHMA polypeptides, two sets of NtHMA RNAi expression

vectors, the PBI121-NtHMA (660-915) RNAi expression vector as further described below, and the PBI121-NtHMA (1382-1584) RNAi expression vector as further described in Example 3.

[0123] FIG. 2 illustrates an exemplary subcloning strategy for constructing a NtHMA RNAi expression vector that enables the constitutive expression of NtHMA RNAi polynucleotides of interest. Based on exon mapping and sequence analysis of genomic clone CHO_OF96xf01.ab1, RNAi constructs were designed.

[0124] FIG. 3A shows an exemplary RNAi sequence, NtHMA (660-915), for producing NtHMA RNAi polynucleotides of interest. In FIG. 3A, the NtHMA RNAi RNAi construct (SEQ ID NO: 41) comprises a sense fragment (272 bp) (SEQ ID NO:38) composed of exon 4 (272 bp), which is positioned upstream and operably-linked to a spacer fragment (80 bp) (SEQ ID NO:39) composed of intron 5, which is positioned upstream and operably-linked to a reverse complementary fragment (272 bp) (SEQ ID NO:40) composed of exon 4 positioned in anti-sense orientation. RNAi constructs encoding NtHMA RNAi polynucleotides of interest were inserted into the PBKCMV cloning vector, and were placed downstream and operably-linked to a cytomegalovirus (CMV) promoter. *XbaI* and *HindIII* sites were incorporated into the 5' and 3' ends of the 352bp NtHMA sense fragment, which included the 80bp intron fragment by utilizing PCR primers modified to incorporate these restriction enzyme sites (PMG783F: ATTCTAGACTGCTGCTATGTCATCACTGG [SEQ ID NO: 50] and PMG783R: ATAAGCTTAGCCTGAAGAATTGAGCAAA [SEQ ID NO: 51]). Similarly, *SpeI* and *SacI* sites were incorporated into the 5' and 3' ends of the corresponding NtHMA reverse complementary fragment by utilizing PCR primers (PMG 785F: ATGAGCTCTGGTTATGTAGGCTACTGCTGCT [SEQ ID NO: 52] and PMG 786R: ATACTAGTATTTGTAGTGCCAGCCCAGA [SEQ ID NO: 53]) to produce the PBKCMV-NtHMA RNAi plasmid. The PBI121-NtHMA RNAi expression vectors were constructed by (a) excising the β-glucuronidase ORF from the binary expression vector ("pBI121" from CLONTECH), and (b) substituting the NtHMA RNAi construct, excised from the PBKCMV-NtHMA RNAi plasmid, into *XbaI/SacI* sites of the PBI121 plasmid in place of the removed β-glucuronidase ORF. The PBI121-NtHMA RNAi expression vectors comprise: (i) 352 bp *XbaI–HindIII* NtHMA sense fragment that includes (ii) 80bp intron fragment,

operably-linked to the (iii) 272bp *SpeII–SacI* NtHMA reverse complementary fragment.

EXAMPLE 3

Construction of NtHMA RNAi Expression Vector PBI121-NtHMA (1382-1584) encoding RNAi Polynucleotides

[0125] FIG. 4A shows an exemplary RNAi sequence, NtHMA (1382-1584), for producing NtHMA RNAi polynucleotides of interest. Based on exon mapping and sequence analysis of genomic clone CHO_OF261xo09c1, a RNAi construct (SEQ ID NO: 41) was designed that includes a sense fragment (191 bp) (SEQ ID NO:42) comprising sequences of exon 7, which is positioned upstream and operably-linked to a spacer DNA fragment (139 bp) (SEQ ID NO:43) comprising sequences of intron 8, which is positioned upstream and operably-linked to a reverse complementary fragment (196 bp) (SEQ ID NO:44) comprising sequences of exon 7 positioned in anti-sense orientation. These RNAi constructs encoding NtHMA RNAi polynucleotides of interest were inserted into the PBKCMV cloning vector, and were placed downstream and operably-linked to a cytomegalovirus (CMV) promoter. *XbaI* and *HindIII* sites were incorporated into the 5′ and 3′ ends of the 330 bp NtHMA sense fragment, which included the 139 bp intron fragment by utilizing PCR primers modified to incorporate these restriction enzyme sites (PMG754F: ATTCTAGATGAGAGCAAGTCAGGTCATCC [SEQ ID NO: 54] and PMG754R: ATAAGCTTTTCAAACATCCACCGCATTA [SEQ ID NO: 55]). Similarly, *PstI* and *SacI* sites were incorporated into the 5′ and 3′ ends of the corresponding NtHMA reverse complementary fragment by utilizing PCR primers PMG757F: ATGAGCTCGCATTGAGAGCAAGTCAGGTC [SEQ ID NO: 56] and PMG757R: ATCTGCAGCCTGTGGTACATCCAGCTCTT [SEQ ID NO: 57]) to produce the PBKCMV-NtHMA RNAi expression vector.

[0126] The PBI121-NtHMA RNAi expression vectors were constructed by (a) excising the β-glucuronidase ORF from the binary expression vector ("pBI121" from CLONTECH), and (b) substituting the NtHMA RNAi construct, excised from the PBKCMV-NtHMA RNAi plasmid, into *XbaI/SacI* sites of the PBI121 plasmid in place of the removed β-glucuronidase ORF. The PBI121-NtHMA RNAi expression

vectors comprise: (i) 330 bp *XbaI–HindIII* NtHMA sense fragment that includes (ii) 139 bp intron fragment, operably-linked to the (iii) 196 bp *SpeII–SacI* NtHMA reverse complementary fragment. The PBI121-NtHMA RNAi expression vectors, such as those described in Examples 2 and 3, can be introduced into any host plant cell of interest by various methods known to persons skilled in the art.

EXAMPLE 4

Transformation of Burley (TN90), Flue-cured (K326), and Dark (VA359) Tobacco Varieties with NtHMA RNAi Expression Vectors

[0127] Tobacco seeds from three different varieties, Burley (TN90), Flue-cured (K326), and Dark (VA359), were sterilized and germinated in a petridish containing MS basal media supplemented with 5 ml/L plant preservative mixture (PPM). Seedlings, at approximately 7 to 10 days post-germination, were selected for transformation with various NtHMA RNAi expression vectors. A single colony of *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 was inoculated into a liquid LB medium containing 50 mg l^{-1} kanamycin (kanamycin mono sulphate), and were incubated for 48 h at 28°C with reciprocal shaking (150 cycles min^{-1}). Cultured bacterial cells were collected by centrifugation (6000×*g*, 10 min), and were suspended to a final density of 0.4-0.7 OD_{600}, with 20 ml liquid MS medium containing 20g^{-1} sucrose. The 7-10 day seedling explants were immersed into a bacterial suspension for 5 mins, and were blotted on sterile filter papers. Fifty explants were placed onto 40 ml aliquots of REG agar medium (MS basal medium supplemented with 0.1 mg l^{-1} NAA and 1 mg l^{-1} BAP) in 100 mm X 20 mm petri dishes. The explants were co-cultivated with *Agrobacterium* at 25°C. After 3 days of co-cultivation, the explants were washed and transferred to RCPK medium (REG medium with 100 mg^{-1} kanamycin, 500 mg l^{-1} carbenicillin, and 5ml PPM) to select for transformants. The explants were subcultured every 2 weeks. After 8-12 weeks of growth under selective conditions, the surviving plants, representing transformants that have integrated the NtHMA RNAi expression constructs into their genomes, were transferred to a rooting medium (MS basal medium supplemented with 100 mg l^{-1} Kanamycin). Rooted plants were transferred to pots to promote further growth.

EXAMPLE 5

Cd Reduction in Leaf Lamina of First Generation Transgenics Genetically Modified to Express NtHMA RNAi Polynucleotides

[0128] To determine the effect of NtHMA RNAi polynucleotide expression on Cd transport from the root to aerial portions of transgenic plants, the Cd levels were determined for several transgenic lines that have been genetically modified to express either the NtHMA (660-915) or the (1382-1584) RNAi polynucleotides.

[0129] Approximately 40 independent transgenic plants, representing three tobacco varieties, were transformed with various PBI121-NtHMA RNAi expression vectors. Initially, transformants were grown in floating trays containing Hoaglands medium for 4 weeks. PCR positive plants for NPT II were selected and potted in 10" pots with a hydroponic system containing Hoaglands medium containing 5µM $CdCl_2$. After 4-8 weeks, two middle leaves samples were harvested and freeze-dried for metal analysis, or were frozen in liquid nitrogen for gene expression analysis. Approximately 500 mg of tobacco was weighed and digested in 10 ml of concentrated HNO_3 by microwave-accelerated, reaction system 5 digestion system (CEM corporation, Mathews, NC). Heavy metal concentrations were analyzed utilizing inductively coupled plasma-mass spectrophotometry ("ICP-MS," Agilent 7500A; Agilent Technologies, Palo Alto, CA). As non-transgenic tobacco control, a sample consisting of polish-certified, Virginia tobacco leaves, CTA-VTL-2, was prepared under comparable conditions (Dybczynski et al., 1997).

[0130] FIGS. 3B-3D show Cd reduction in leaf lamina of multiple first generation (T0) transgenic lines, representing three varieties, that have been genetically modified to express NtHMA RNAi polynucleotides (660-915). In each graph, the y-axis unit is µg/mg tissue.

[0131] FIGS. 4B-4D show Cd reduction in leaf lamina of multiple first generation (T0) transgenic lines, representing three varieties, that have been genetically modified to express NtHMA RNAi polynucleotides (1382-1584). In each graph, the y-axis unit is µg/mg tissue.

EXAMPLE 6

Reduction in NtHMA RNA Transcripts in Transgenic Tobacco Leaf

by the Expression of NtHMA RNAi Polynucleotides

[0132] To determine the effect of NtHMA RNAi polynucleotide expression on the steady-state levels of endogenous NtHMA RNA transcripts, the relative change in NtHMA RNA transcripts was measured by isolating total cellular RNA from leaf lamina portions of various transgenic lines, representing three tobacco varieties.

[0133] Total RNA was isolated from middle leaves of T0 plants using TRI® Reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). To remove DNA impurities, purified RNA was treated with RNase-free DNase (TURBO DNA-free, Ambion, Austin TX). To synthesize the first cDNA strand, approximately 10 µg of total RNA was reverse transcribed utilizing the High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). To measure the level of NtHMA transcripts in the samples, a quantitative 2-step RT-PCR was performed according to the Taqman MGB probe-based chemistry. The RT mixture contained 4 µM dNTP mix, 1X random primers, 1X RT Buffer, 10 g cDNA, 50U Multiscribe Reverse transcriptase (Applied Biosystems), 2U Superase-In RNase Inhibitor (Ambion), and nuclease-free water. The PCR mixture contained 1X Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), 400 nM forward primer, 400 nM reverse primer, 250 nM Taqman MGB probe, 2 ng of cDNA, and nuclease-free water. RT-PCR was performed utilizing an ABI 7500 Real-Time System (Applied Biosystems, Foster City, CA) and under amplification conditions: 50°C for 2 min.; 95°C for 10 min.; 40 cycles of 95°C for 15 sec.; and 60°C for 1 min. For normalizing the measured NtHMA RNA transcript levels, the Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (G3PDH) was selected as a control endogenous RNA transcript, whose expression level is not responsive to the sequence-specific RNA interference activity of the NtHMA RNAi polynucleotides under analysis. The fold change in NtHMA RNA transcript level caused by NtHMA-RNAi-polynucleotide expression was calculated by determining the ratio of (a)/(b), in which (a) represents the normalized value of NtHMA RNA transcript level determined for samples derived from transgenic plants transformed with a NtHMA RNAi expression vector, and (b) represents the normalized value of NtHMA RNA transcript level determined for samples derived from transgenic plants transformed with a control expression vector deficient in the NtHMA RNAi RNAi construct.

[0134] FIGS. 5A-C show normalized NtHMA RNA transcript levels in various first generation (T0) transgenic lines that have been genetically modified to express NtHMA RNAi polynucleotides of interest, as determined by quantitative realtime PCR analysis of leaf lamina extracts. FIG. 5A shows that for multiple independently derived K326 transgenic lines, the RNA transcript levels were reduced by the RNA interference activity of NtHMA (660-915) RNAi polynucleotides. FIG. 5B shows that for multiple, independently derived TN90 transgenic lines, the RNA transcript levels were reduced by the RNA interference activity of NtHMA (660-915) RNAi polynucleotides. FIG. 5C shows that for multiple independently derived VA359 transgenic lines, the RNA transcript levels were reduced by the RNA interference activity of NtHMA (660-915) RNAi polynucleotides. The reduction in NtHMA RNA transcript levels is consistent with the reduction in Cd content measured in the middle leaves for the same transgenic lines tested. "PBI121" represents an expression vector deficient in the RNAi construct encoding NtHMA (660-915) RNAi polynucleotides.

EXAMPLE 7

Distribution of Cd and Zn in Transgenic Lines Genetically Modified to Express NtHMA RNAi Polynucleotides

[0135] To determine the effect of NtHMA (660-915) RNAi polynucleotide expression on the distribution of Cd and Zn within the leaf lamina and the root, the metal content of transgenic plants of three varieties were analyzed. Five transgenic lines of each variety, i.e., Flue-cured (K326), Burley (TN90), and Dark (VA359), were selected for exhibiting Cd content at the lowest range in the leaf lamina. The middle leaves and roots of these transgenic plants and control plants were harvested for metal analysis by ICP_MS. For 8 weeks, all plants were grown in Hoaglands medium supplemented with 5 μM $CdCl_2$ prior to harvesting.

[0136] Table 2 lists Cd and Zn levels measured in the leaf lamina and the root of several transgenic lines, representing three tobacco varieties, as provided below. In Table 2, the Cd distribution between the leaf lamina and the root were substantially modified by the expression of NtHMA (660-915) RNAi polynucleotides for all three varieties, Flue-cured (K326), Burley (TN90), and Dark (VA359). For the

K326 transgenic lines, the % Cd reduction ranged from 97.16 - 98.54 % when compared to Cd levels observed in K326 Control plants. For TN90 transgenic lines, the % Cd reduction ranged from 85.12 - 90.96 % when compared to Cd levels observed in the TN90 Control. For VA359 transgenic lines, the % Cd reduction ranged from 93.24 - 99.07 % when compared to Cd levels observed in the VA359 Control. The VA359 NtHMA-11 transgenic line exhibited the lowest Cd level (1.62µg/g) and the highest % Cd reduction (99.07%), when compared against two NtHMA RNAi transgene-deficient control lines ("VA359 PBI121") that exhibited Cd levels at 158.3 - 205.96 µg/g. Comparable root analysis of the transgenic lines showed, that a substantial amount of Cd can accumulate in the root, resulting in fold increase in root Cd levels ranging from 6.90 - 15.38, relative to the Cd levels observed in the respective controls.

[0137] In contrast to the significant Cd reduction in the leaf lamina of transgenic lines, the Zn content of the leaf lamina was not substantially reduced, although some reduction was observed in most transgenic lines, caused by the expression of NtHMA (660-915) RNAi polynucleotides. The Zn content within the root (last column of Table 3) increased in all transgenic lines, resulting in a 4-6 fold increase in the transgenic lines of the K326 and VA359 varieties, and a 3-5 fold increase in the TN90 variety.

[0138] FIG. 6 shows the distribution of Cd and Zn between the leaf lamina and the root of various first generation transgenic lines that have been genetically modified to express NtHMA RNAi polynucleotides of interest, as presented in Table 2. In each graph of FIG. 6, the y-axis unit is µg/mg tissue.

Table 2

Transgenic Variety	Leaf		Root	
	Cd µg/g	Zn µg/g	Cd µg/g	Zn µg/g
K326 06T458	7.09	22.2	703	201
K326 06T459	4.97	24.1	696	225
K326 06T473	3.7	34	929	215
K326 06T480	3.93	38.6	989	224

K326 06T482	2.55	36.3	520	126
K326 Control	174.7	36.3	64.3	35.7
TN90 06T428	26.3	48.6	626	184
TN90 06T430	16.08	37.2	684	213
TN90 06T444	15.98	28.1	738	234
TN90 06T445	20.72	32.6	618	186
TN90 06T455	17.87	24.4	582	157
TN90 PBI121	181.2	35.5	62.6	44.3
TN90 Control	172.4	32.3	72.9	46.6
VA359 06T493	7.59	23.1	543	148
VA359 06T498	1.62	26.2	706	175
VA359 06T506	5.72	28.8	351	109
VA359 06T542	7.03	27.1	738	136
VA359 06T543	11.78	29.3	547	106
VA359 PBI121	206	47.5	35.3	27.6
VA359 Control	158.5	32.6	37.6	26.2

EXAMPLE 8

Cd Distribution in Various Tissues of Transgenic Lines Genetically Modified to Express NtHMA RNAi Polynucleotides

[0139] To determine the effect of NtHMA (1382-1584) RNAi polynucleotide expression on Cd distribution within various tissues *(i.e.,* the bark, lamina, pith, and root), the metal content of several transgenic lines representing two varieties, Burley (TN90) and Flue-cured (K326), were analyzed. Fully matured transgenic plants and control plants were harvested for metal analysis by ICP_MS. For 8 weeks, all plants were grown in 5 μM $CdCl_2$ in Hoaglands medium prior to harvesting.

[0140] Table 3 lists Cd content in the bark, lamina, pith, and root tissues of several transgenic lines, as provided below. In Table 3, Cd levels were

substantially reduced in the bark, lamina, and pith tissues of all transgenic lines tested when compared that of control plants. The "Control" represents non-transgenic plants. The "PBI121" represents transgenic plants transformed with an expression vector deficient in NtHMA RNAi RNAi construct. The extent of Cd reduction in the bark, pith, and leaf lamina of K326 transgenic lines was significantly greater than that observed in TN90 transgenic lines. The expression of RNAi (1382-1584) polynucleotides in K326 transgenic plants resulted in a 9-11 fold Cd reduction in the bark, a 6-13 fold Cd reduction in the pith, and a 31-32 fold Cd reduction in the leaf lamina. The expression of RNAi (1382-1584) polynucleotides in TN90 transgenic plants resulted in a 4-7 fold Cd reduction in the bark, a 5-8 fold Cd reduction in the pith, and a 6-20 fold Cd reduction in the leaf lamina. In contrast, more modest increases (5-6 fold) in Cd content in the root of these transgenic lines were observed when compared to that of control plants.

[0141] FIG. 7 shows Cd distribution among the bark ("B"), leaf lamina ("L"), pith ("P"), and the root ("R") of various first generation transgenic lines that have been genetically modified to express NtHMA RNAi polynucleotides of interest, as presented in Table 3. In each graph of FIG. 7, the y-axis unit is µg/mg tissue.

Table 3

Transgenic Seed Variety	Bark Cd	Lamina Cd	Pith Cd	Root Cd
TN90 06T619	7.36	31.1	4.67	557
TN90 06T658	3.76	8.89	2.89	727
TN90 Control	30.9	151	25.3	115
TN90 PBI121	23.1	201	20	124
K326 06T682	2.02	4.32	1.97	1020
K326 06T696	2.53	4.48	4.25	1030
K326 Control	19.5	133	25.3	145
K326 PBI121	25.5	143	26.2	253

EXAMPLE 9

Cd Reduction in leaf lamina of Second Generation Transgenic Lines Genetically Modified to Express NtHMA RNAi Polynucleotides

[0142] To determine the effect of NtHMA (660-915) RNAi polynucleotide expression on Cd content in leaf lamina, the metal content of two (T1) transgenic lines of VA359 variety were grown in soil containing variable Cd concentrations for 4 weeks. Two transgenic lines, 06T498 and 06T506, selected as kanamycin positives were screened by PCR. Several 10" Pots filled with sand:soil mixture were saturated with either 0, 0.1, 0.5, or 5μM $CdCl_2$. Three plants per treatment per transgenic line were grown for 4 weeks by adding Hoaglands medium to the saucer. Total number of leaves, leaf area index, leaf weight, stalk weight, and root weight were observed. Two middle leaves and root samples were freeze-dried and were subjected to heavy metal analysis.

[0143] FIG. 8 shows Cd distribution between the leaf lamina ("L") and the root ("R") of various second generation (T1) transgenic lines that have been genetically modified to express NtHMA RNAi polynucleotides of interest. In each graph of FIG. 8, the y-axis unit is μg/mg tissue. From FIG. 8 it can be seen that the Cd content of the transgenic plants was consistently lower than that of control plants at all Cd concentrations tested (0, 0.1, 0.5, and 5μM). A reduction in Cd content of the leaf lamina (2-4.7 fold) was observed in various transgenic lines tested. The Cd level for the line 06T498 was only ~20% of control plants at 5μM $CdCl_2$. An increase in root Cd content (4-16 fold) was observed in various transgenic lines tested. The highest root Cd content (a 16 fold increase) was observed for line 06T498 at 5 μM $CdCl_2$. Thus, the reduced heavy metal content in the leaf lamina/shoots in transgenic lines, expressing NtHMA (660-915) RNAi polynucleotide, suggested that the translocation of a substantial amount of heavy metals from the root to the leaf lamina/shoots can be interrupted by RNAi interference. The results are consistent with Cd reduction observed in the leaf lamina of first generation transgenic lines, in that the second generation transgenic lines also demonstrated (a) reduced Cd levels in the leaf lamina, and (b) increased Cd in the roots. The transgenic lines did not demonstrate phenotypical differences in general appearance, growth, and development relative to that of control plants.

EXAMPLE 10

NtHMA Polynucleotides

[0144] A NtHMA polynucleotide will generally contain phosphodiester bonds, although in some cases, nucleic acid analogs are included that may have alternate backbones, comprising, *e.g.*, phosphoramidate, phosphorothioate, phosphorodithioate, or O-methylphophoroamidite linkages (see Eckstein, Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, Oxford University Press); and peptide nucleic acid backbones and linkages. Other analog nucleic acids include those with positive backbones; non-ionic backbones, and non-ribose backbones, including those described in U.S. Pat. Nos. 5,235,033 and 5,034,506, and Chapters 6 and 7, ASC Symposium Series 580, Carbohydrate Modifications in Antisense Research, Sanghui & Cook, eds. Nucleic acids containing one or more carbocyclic sugars are also included within one definition of nucleic acids. Modifications of the ribose-phosphate backbone may be done for a variety of reasons, *e.g.* to increase the stability and half-life of such molecules in physiological environments or as probes on a biochip. Mixtures of naturally occurring nucleic acids and analogs can be made; alternatively, mixtures of different nucleic acid analogs, and mixtures of naturally occurring nucleic acids and analogs may be made.

[0145] A variety of references disclose such nucleic acid analogs, including, for example, phosphoramidate (Beaucage *et al.*, Tetrahedron 49(10):1925 (1993) and references therein; Letsinger, J. Org. Chem. 35:3800 (1970); Sprinzl *et al.*, Eur. J. Biochem. 81:579 (1977); Letsinger *et al.*, Nucl. Acids Res. 14:3487 (1986); Sawai et al, Chem. Lett. 805 (1984), Letsinger *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 110:4470 (1988); and Pauwels *et al.*, Chemica Scripta 26:141 91986)), phosphorothioate (Mag *et al.*, Nucleic Acids Res. 19:1437 (1991); and U.S. Pat. No. 5,644,048), phosphorodithioate (Briu *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 111:2321 (1989), O-methylphophoroamidite linkages (see Eckstein, Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, Oxford University Press), and peptide nucleic acid backbones and linkages (see Egholm, J. Am. Chem. Soc. 114:1895 (1992); Meier *et al.*, Chem. Int. Ed. Engl. 31:1008 (1992); Nielsen, Nature, 365:566 (1993); Carlsson *et al.*, Nature 380:207 (1996), all of which are incorporated by reference). Other analog

nucleic acids include those with positive backbones (Denpcy *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:6097 (1995); non-ionic backbones (U.S. Pat. Nos. 5,386,023, 5,637,684, 5,602,240, 5,216,141 and 4,469,863; Kiedrowshi *et al.*, Angew. Chem. Intl. Ed. English 30:423 (1991); Letsinger *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 110:4470 (1988); Letsinger *et al.*, Nucleoside & Nucleotide 13:1597 (1994); Chapters 2 and 3, ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research", Ed. Y. S. Sanghui and P. Dan Cook; Mesmaeker *et al.*, Bioorganic & Medicinal Chem. Lett. 4:395 (1994); Jeffs *et al.*, J. Biomolecular NMR 34:17 (1994); Tetrahedron Lett. 37:743 (1996)) and non-ribose backbones, including those described in U.S. Pat. Nos. 5,235,033 and 5,034,506, and Chapters 6 and 7, ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research", Ed. Y. S. Sanghui and P. Dan Cook. Nucleic acids containing one or more carbocyclic sugars are also included within one definition of nucleic acids (see Jenkins *et al.*, Chem. Soc. Rev. (1995) pp 169-176). Several nucleic acid analogs are described in Rawls, C & E News Jun. 2, 1997 page 35. These references are hereby expressly incorporated by reference.

[0146] Other analogs include peptide nucleic acids (PNA) which are peptide nucleic acid analogs. These backbones are substantially non-ionic under neutral conditions, in contrast to the highly charged phosphodiester backbone of naturally occurring nucleic acids. This results in two advantages. First, the PNA backbone exhibits improved hybridization kinetics. PNAs have larger changes in the melting temperature (Tm) for mismatched versus perfectly matched basepairs. DNA and RNA typically exhibit a 2-4 °C drop in T_m for an internal mismatch. With the non-ionic PNA backbone, the drop is closer to 7-9 °C. Similarly, due to their non-ionic nature, hybridization of the bases attached to these backbones is relatively insensitive to salt concentration. In addition, PNAs are not degraded by cellular enzymes, and thus can be more stable.

[0147] Among the uses of the disclosed NtHMA polynucleotides, and combinations of fragments thereof, is the use of fragments as probes or primers or in the development of RNAi molecules. Such fragments generally comprise at least about 17 contiguous nucleotides of a DNA sequence. In other embodiments, a DNA fragment comprises at least 30, or at least 60 contiguous nucleotides of a DNA sequence. The basic parameters affecting the choice of hybridization

conditions and guidance for devising suitable conditions are set forth by Sambrook *et al.*, 1989 and are described in detail above. Using knowledge of the genetic code in combination with the amino acid sequences set forth above, sets of degenerate oligonucleotides can be prepared. Such oligonucleotides are useful as primers, *e.g.*, in polymerase chain reactions (PCR), whereby DNA fragments are isolated and amplified. In certain embodiments, degenerate primers can be used as probes for non-human genetic libraries. Such libraries would include but are not limited to cDNA libraries, genomic libraries, and even electronic EST (express sequence tag) or DNA libraries. Homologous sequences identified by this method would then be used as probes to identify non-human homologues of the NtHMA sequence identified herein.

[0148] The invention also includes polynucleotides and oligonucleotides that hybridize under reduced stringency conditions, typically moderately stringent conditions, and commonly highly stringent (also referred to herein as "high-stringency") conditions, to an NtHMA polynucleotide described herein. The basic parameters affecting the choice of hybridization conditions and guidance for devising suitable conditions are set forth by Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., chapters 9 and 11; and Current Protocols in Molecular Biology, 1995, F. M. Ausubel *et al.*, eds., John Wiley & Sons, Inc., sections 2.10 and 6.3-6.4, incorporated herein by reference), and can be readily determined by those having ordinary skill in the art based on, for example, the length and/or base composition of the polynucleotide. One way of achieving moderately stringent conditions involves the use of a prewashing solution containing 5xSSC, 0.5% SDS, 1.0 mM EDTA (pH 8.0), hybridization buffer of about 50% formamide, 6xSSC, and a hybridization temperature of about 55 °C (or other similar hybridization solutions, such as one containing about 50% formamide, with a hybridization temperature of about 42 °C), and washing conditions of about 60 °C, in 0.5xSSC, 0.1% SDS. Generally, highly stringent conditions are defined as hybridization conditions as above, but with washing at approximately 68 °C., 0.2xSSC, 0.1% SDS. SSPE (1x SSPE is 0.15M NaCl, 10 mM NaH_2PO4, and 1.25 mM EDTA, pH 7.4) can be substituted for SSC (1x SSC is 0.15M NaCl and 15 mM sodium citrate) in the hybridization and wash buffers; washes are performed for 15

minutes after hybridization is complete. It should be understood that the wash temperature and wash salt concentration can be adjusted as necessary to achieve a desired degree of stringency by applying the basic principles that govern hybridization reactions and duplex stability, as known to those skilled in the art and described further below (see, *e.g.*, Sambrook *et al.*, 1989). When hybridizing a nucleic acid to a target polynucleotide of unknown sequence, the hybrid length is assumed to be that of the hybridizing nucleic acid. When nucleic acids of known sequence are hybridized, the hybrid length can be determined by aligning the sequences of the nucleic acids and identifying the region or regions of optimal sequence complementarity. The hybridization temperature for hybrids anticipated to be less than 50 base pairs in length should be 5 to 10 °C less than the melting temperature (T_m) of the hybrid, where T_m is determined according to the following equations. For hybrids less than 18 base pairs in length, T_m (°C)=2(# of A+T bases)+4(# of G+C bases). For hybrids above 18 base pairs in length, T_m (°C)=81.5+16.6(log10 [Na+])+0.41(% G+C)-(600/N), where N is the number of bases in the hybrid, and [Na+] is the concentration of sodium ions in the hybridization buffer ([Na+] for 1x SSC=0.165M). Typically, each such hybridizing nucleic acid has a length that is at least 25% (commonly at least 50%, 60%, or 70%, and most commonly at least 80%) of the length of a polynucleotide of the disclosure to which it hybridizes, and has at least 60% sequence identity (*e.g.*, at least 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97.5%, or at least 99%) with a polynucleotide of the disclosure to which it hybridizes.

EXAMPLE 11

NtHMA Polypeptides

[0149] A polypeptide of the disclosure may be prepared by culturing transformed or recombinant host cells under culture conditions suitable to express a polypeptide of the disclosure. The resulting expressed polypeptide may then be purified from such culture using known purification processes. The purification of the polypeptide may also include an affinity column containing agents which will bind to the polypeptide; one or more column steps over such affinity resins as concanavalin A-agarose, heparin-toyopearl® or Cibacrom blue 3GA Sepharose®;

one or more steps involving hydrophobic interaction chromatography using such resins as phenyl ether, butyl ether, or propyl ether; or immunoaffinity chromatography. Alternatively, the polypeptide of the disclosure may also be expressed in a form that will facilitate purification. For example, it may be expressed as a fusion polypeptide, such as those of maltose binding polypeptide (MBP), glutathione-5-transferase (GST) or thioredoxin (TRX). Kits for expression and purification of such fusion polypeptides are commercially available from New England BioLab (Beverly, Mass.), Pharmacia (Piscataway, N.J.), and InVitrogen, respectively. The polypeptide can also be tagged with an epitope and subsequently purified by using a specific antibody directed to such epitope. Finally, one or more reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) steps employing hydrophobic RP-HPLC media, *e.g.*, silica gel having pendant methyl or other aliphatic groups, can be employed to further purify the polypeptide. Some or all of the foregoing purification steps, in various combinations, can also be employed to provide a substantially homogeneous recombinant polypeptide. The polypeptide thus purified is substantially free of other mammalian polypeptides and is defined in accordance with the invention as an "substantially purified polypeptide"; such purified polypeptides include NtHMA polypeptide, fragment, variant, and the like. Expression, isolation, and purification of the polypeptides and fragments of the disclosure can be accomplished by any suitable technique, including but not limited to the methods described herein.

[0150] It is also possible to utilize an affinity column such as a monoclonal antibody generated against polypeptides of the disclosure, to affinity-purify expressed polypeptides. These polypeptides can be removed from an affinity column using conventional techniques, *e.g.*, in a high salt elution buffer and then dialyzed into a lower salt buffer for use or by changing pH or other components depending on the affinity matrix utilized, or be competitively removed using the naturally occurring substrate of the affinity moiety, such as a polypeptide derived from the disclosure.

[0151] A polypeptide of the disclosure may also be produced by known conventional chemical synthesis. Methods for constructing the polypeptides of the disclosure or fragments thereof by synthetic means are known to those skilled in the art. The synthetically-constructed polypeptide sequences, by virtue of sharing

primary, secondary or tertiary structural and/or conformational characteristics with a native polypeptides may possess biological properties in common therewith, including biological activity.

EXAMPLE 12

Anti-NtHMA Antibodies

[0152] In another embodiment, antibodies that are immunoreactive with the polypeptides of the disclosure are provided herein. The NtHMA polypeptides, fragments, variants, fusion polypeptides, and the like, as set forth herein, can be employed as "immunogens" in producing antibodies immunoreactive therewith. Such antibodies specifically bind to the polypeptides via the antigen-binding sites of the antibody. Specifically binding antibodies are those that will specifically recognize and bind with NtHMA family polypeptides, homologues, and variants, but not with other molecules. In one embodiment, the antibodies are specific for polypeptides having an NtHMA amino acid sequence of the disclosure as set forth in SEQ ID NO:2 and do not cross-react with other polypeptides.

[0153] More specifically, the polypeptides, fragment, variants, fusion polypeptides, and the like contain antigenic determinants or epitopes that elicit the formation of antibodies. These antigenic determinants or epitopes can be either linear or conformational (discontinuous). Linear epitopes are composed of a single section of amino acids of the polypeptide, while conformational or discontinuous epitopes are composed of amino acids sections from different regions of the polypeptide chain that are brought into close proximity upon polypeptide folding. Epitopes can be identified by any of the methods known in the art. Additionally, epitopes from the polypeptides of the disclosure can be used as research reagents, in assays, and to purify specific binding antibodies from substances such as polyclonal sera or supernatants from cultured hybridomas. Such epitopes or variants thereof can be produced using techniques known in the art such as solid-phase synthesis, chemical or enzymatic cleavage of a polypeptide, or using recombinant DNA technology.

[0154] Both polyclonal and monoclonal antibodies to the polypeptides of the disclosure can be prepared by conventional techniques. See, for example, Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses,

Kennet *et al.* (eds.), Plenum Press, New York (1980); and Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Land (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1988); Kohler and Milstein, (U.S. Pat. No. 4,376,110); the human B-cell hybridoma technique (Kosbor *et al.*, Immunology Today 4:72, 1983; Cole *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2026, 1983); and the EBV-hybridoma technique (Cole *et al.*, 1985, Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Hybridoma cell lines that produce monoclonal antibodies specific for the polypeptides of the disclosure are also contemplated herein. Such hybridomas can be produced and identified by conventional techniques. For the production of antibodies, various host animals may be immunized by injection with an NtHMA polypeptide, fragment, variant, or mutants thereof. Such host animals may include, but are not limited to, rabbits, mice, and rats, to name a few. Various adjutants may be used to increase the immunological response. Depending on the host species, such adjutants include, but are not limited to, Freund's (complete and incomplete), mineral gels such as aluminum hydroxide, surface active substances such as lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil emulsions, keyhole limpet hemocyanin, dinitrophenol, and potentially useful human adjutants such as BCG (bacille Calmette-Guerin) and Corynebacterium parvum. The monoclonal antibodies can be recovered by conventional techniques. Such monoclonal antibodies may be of any immunoglobulin class including IgG, IgM, IgE, IgA, IgD, and any subclass thereof.

[0155] The antibodies of the disclosure can also be used in assays to detect the presence of the polypeptides or fragments of the disclosure, either *in vitro* or *in vivo*. The antibodies also can be employed in purifying polypeptides or fragments of the disclosure by immunoaffinity chromatography.

EXAMPLE 13

Double-stranded RNAs

[0156] In one embodiment, the disclosure provides double-stranded ribonucleic acid (dsRNA) molecules for inhibiting the expression of the NtHMA gene in a cell (*e.g.*, a plant cell), wherein the dsRNA comprises an antisense strand comprising a region of complementarity which is complementary to at least a part of

an mRNA formed in the expression of the NtHMA gene, and wherein the region of complementarity is less than 30 nucleotides in length and wherein said dsRNA, upon contact with a cell expressing said NtHMA gene, inhibits the expression of said NtHMA gene by at least 20%. The dsRNA comprises two RNA strands that are sufficiently complementary to hybridize to form a duplex structure. One strand of the dsRNA (the antisense strand) comprises a region of complementarity that is substantially complementary, and typically fully complementary, to a target sequence, derived from the sequence of an mRNA formed during the expression of the NtHMA gene, the other strand (the sense strand) comprises a region which is complementary to the antisense strand, such that the two strands hybridize and form a duplex structure when combined under suitable conditions. The duplex structure is between about 15 and 30 (*e.g.*, between about 18 and 25), typically between about 19 and 24 (*e.g.*, between 21 and 23) base pairs in length. Similarly, the region of complementarity to the target sequence is between 15 and 30 (*e.g.*, between about 18 and 25), typically between about 19 and 24 (*e.g.*, between 21 and 23) base pairs in length. The dsRNA of the disclosure may further comprise one or more single-stranded nucleotide overhang(s). The dsRNA can be synthesized by standard methods known in the art as further discussed below, *e.g.*, by use of an automated DNA synthesizer, such as are commercially available from, for example, Biosearch, Applied Biosystems, Inc. In another aspect, an expression vector can be used to express an RNAi molecule *in vivo*.

[0157] The dsRNA of the disclosure can contain one or more mismatches to the target sequence. In one embodiment, the dsRNA of the disclosure contains more than 3 mismatches. If the antisense strand of the dsRNA contains mismatches to a target sequence, it is typical that the area of mismatch not be located in the center of the region of complementarity. If the antisense strand of the dsRNA contains mismatches to the target sequence, it is typical that the mismatch be restricted to 5 nucleotides from either end, for example 5, 4, 3, 2, or 1 nucleotide from either the 5' or 3' end of the region of complementarity. For example, for a 23 nucleotide dsRNA strand which is complementary to a region of the NtHMA gene, the dsRNA preferably does not contain any mismatch within the central 13 nucleotides. The methods described within the disclosure can be used to determine

whether a dsRNA containing a mismatch to a target sequence is effective in inhibiting the expression of the NtHMA gene.

[0158] In one embodiment, at least one end of the dsRNA has a single-stranded nucleotide overhang of 1 to 4 (*e.g.*, 1 or 2 nucleotides). dsRNAs having at least one nucleotide overhang have inhibitory properties. The dsRNA may also have a blunt end, typically located at the 5'-end of the antisense strand.

[0159] In yet another embodiment, the dsRNA is chemically modified to enhance stability. The nucleic acids of the disclosure may be synthesized and/or modified by methods well established in the art, such as those described in "Current protocols in nucleic acid chemistry", Beaucage, S. L. *et al.* (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y., USA, which is hereby incorporated herein by reference. Chemical modifications may include, but are not limited to 2' modifications, introduction of non-natural bases, covalent attachment to a ligand, and replacement of phosphate linkages with thiophosphate linkages. In this embodiment, the integrity of the duplex structure is strengthened by at least one, and typically two, chemical linkages. Chemical linking may be achieved by any of a variety of well-known techniques, for example by introducing covalent, ionic or hydrogen bonds; hydrophobic interactions, van der Waals or stacking interactions; by means of metal-ion coordination, or through use of purine analogues.

[0160] In yet another embodiment, the nucleotides at one or both of the two single strands may be modified to prevent or inhibit the activation of cellular enzymes, such as, for example, without limitation, certain nucleases. Techniques for inhibiting the activation of cellular enzymes are known in the art including, but not limited to, 2'-amino modifications, 2'-fluoro modifications, 2'-alkyl modifications, uncharged backbone modifications, morpholino modifications, 2'-O-methyl modifications, and phosphoramidate (see, *e.g.*, Wagner, Nat. Med. (1995) 1:1116-8). Thus, at least one 2'-hydroxyl group of the nucleotides on a dsRNA is replaced by a chemical group. Also, at least one nucleotide may be modified to form a locked nucleotide. Such locked nucleotide contains a methylene or ethylene bridge that connects the 2'-oxygen of ribose with the 4'-carbon of ribose. Oligonucleotides containing the locked nucleotide are described in Koshkin, A. A., *et al.*, Tetrahedron (1998), 54: 3607-3630) and Obika, S. *et al.*, Tetrahedron Lett. (1998), 39: 5401-5404). Introduction of a locked nucleotide into an oligonucleotide improves the

affinity for complementary sequences and increases the melting temperature by several degrees (Braasch, D. A. and D. R. Corey, Chem. Biol. (2001), 8:1-7).

[0161] Conjugating a ligand to a dsRNA can enhance its cellular absorption. In certain instances, a hydrophobic ligand is conjugated to the dsRNA to facilitate direct permeation of the cellular membrane. Alternatively, a ligand conjugated to the dsRNA is a substrate for receptor-mediated endocytosis. These approaches have been used to facilitate cell permeation of antisense oligonucleotides. In certain instances, conjugation of a cationic ligand to oligonucleotides often results in improved resistance to nucleases. Representative examples of cationic ligands are propylammonium and dimethylpropylammonium. Interestingly, anti-sense oligonucleotides were reported to retain their high binding affinity to mRNA when the cationic ligand was dispersed throughout the oligonucleotide. See M. Manoharan Antisense & Nucleic Acid Drug Development 2002, 12, 103 and references therein.

EXAMPLE 15

Methods For Identifying NtHMA Modulatory Agents

[0162] The disclosure provides methods for identifying agents that can modulate NtHMA expression level and/or activity. Candidates ("a test agent") that may be screened to identify NtHMA-specific modulatory activity include small molecules, chemicals, peptidomimetics, antibodies, peptides, polynucleotides (*e.g.*, RNAi, siRNA, antisense or ribozyme molecules), and agents developed by computer-based design. Modulation of NtHMA includes an increase or decrease in activity or expression. For example, a method for identifying candidates that can modulate NtHMA expression and/or activity, comprises: contacting a sample containing an NtHMA polypeptide or polynucleotide with a test agent under conditions that allow the test agent and the NtHMA polypeptide or polynucleotide to interact, and measuring the expression and/or activity of the NtHMA polypeptide in the presence or absence of the test agent.

[0163] In one embodiment, a cell containing an NtHMA polynucleotide is contacted with a test agent under conditions such that the cell and test agent are allowed to interact. Such conditions typically include normal cell culture conditions

consistent with the particular cell type being utilized, known in the art. It may be desirable to allow the test agent and the cell to interact under conditions associated with increased temperature or in the presence of regents that facilitate the uptake of the test agent by the cell. A control is treated similarly but in the absence of the test agent. Alternatively, the NtHMA activity or expression may be measured prior to contact with the test agent (*e.g.*, the standard or control measurement) and then again following contact with the test agent. The treated cell is then compared to the control and a difference in the expression or activity of NtHMA compared to the control is indicative of an agent that modulates NtHMA activity or expression.

[0164] When NtHMA expression is being measured, detecting the amount of mRNA encoding an NtHMA polypeptide in the cell can be quantified by, for example, PCR or Northern blot. Where a change in the amount of NtHMA polypeptide in the sample is being measured, detecting NtHMA by use of anti-NtHMA antibodies can be used to quantify the amount of NtHMA polypeptide in the cell using known techniques. Alternatively the biological activity (*e.g.*, heavy metal transport) can be measured before and after contact with the test agent.

[0165] It will be appreciated that, although specific embodiments of the invention have been described herein for purposes of illustration, various modifications may be made without departing from the spirit and the scope of the invention. Accordingly, the invention is not limited except as by the appended claims. Unless defined otherwise, all technical and scientific terms have standard meaning as commonly understood to persons skilled in the art. Although exemplary methods, devices, and materials have been described with particularity, alternative methods and materials, that may be similar or equivalent to those described herein, are applicable for making the disclosed compositions and for practicing the disclosed methods.

[0166] Any publication cited or described herein provides relevant information disclosed prior to the filing date of the present application. Statements herein are not to be construed as an admission that the inventors are not entitled to antedate such disclosures.

CLAIMS:

1. An isolated polynucleotide selected from the group consisting of:

a polynucleotide comprising or consisting of a sequence having at least 70% sequence identity to SEQ ID NO:1, and encoding a NtHMA transporter having P1B-type ATPase activity;

a polynucleotide comprising or consisting of a sequence having at least 70% sequence identity to SEQ ID NO: 3;

a polynucleotide comprising or consisting of a sequence having at least 70% sequence identity to SEQ ID NO: 47;

a polynucleotide comprising or consisting of a sequence encoding a polypeptide having at least 70% sequence identity to SEQ ID NO:2, wherein the polypeptide is a NtHMA transporter having P1B-type ATPase activity; and

a polynucleotide comprising or consisting of a sequence encoding a polypeptide having at least 70% sequence identity to SEQ ID NO: 49, wherein the polypeptide is a NtHMA transporter having P1B-type ATPase activity.

2. An expression vector comprising the isolated polynucleotide of claim 1.

3. A transgenic plant made by a process comprising introducing the isolated polynucleotide of claim 1 or the expression vector of claim 2.

4. A cell line made by a process comprising introducing the isolated polynucleotide of claim 1 or the expression vector of claim 2.

5. A consumable tobacco product incorporating leaves harvested from the transgenic plant of claim 3.

6. A NtHMA RNAi construct capable of inhibiting the expression of a NtHMA messenger RNA to which it corresponds, the construct comprising or consisting of:

a first sequence having at least 70% sequence identity to a portion of SEQ ID NO:3 or 47;

a second sequence; and

a third sequence having a reverse complementary sequence of the first sequence, positioned in the same orientation as the first sequence,

wherein the second sequence is positioned between the first sequence and the third sequence, and the second sequence is operably-linked to the first sequence and to the third sequence.

7. The NtHMA RNAi construct of claim 6, wherein:

(a) the first sequence has at least 95% sequence identity to a sequence selected from one or more of the group consisting of: exon 1 (SEQ ID NO:5), a fragment of exon 1 (SEQ ID NO:5), exon 2 (SEQ ID NO:7), a fragment of exon 2 (SEQ ID NO:7), exon 3 (SEQ ID NO:9), a fragment of exon 3 (SEQ ID NO:9), exon 4 (SEQ ID NO:11), a fragment of exon 4 (SEQ ID NO:11), exon 5 (SEQ ID NO:13), a fragment of exon 5 (SEQ ID NO:13), exon 6 (SEQ ID NO:15), a fragment of exon 6 (SEQ ID NO:15), exon 7 (SEQ ID NO:17), a fragment of exon 7 (SEQ ID NO:17), exon 8 (SEQ ID NO:19), a fragment of exon 8 (SEQ ID NO:19), exon 9 (SEQ ID NO:21), a fragment of exon 9 (SEQ ID NO:21), exon 10 (SEQ ID NO:23), a fragment of exon 10 (SEQ ID NO:23), exon 11 (SEQ ID NO:25), and a fragment of exon 11 (SEQ ID NO:25);

(b) the second sequence has at least 95% sequence identity to a sequence selected from one or more of the group consisting of: intron 1 (SEQ ID NO:4), a fragment of intron 1 (SEQ ID NO:4), intron 2 (SEQ ID NO:6), a fragment of intron 2 (SEQ ID NO:6), intron 3 (SEQ ID NO:8), a fragment of intron 3 (SEQ ID NO:8), intron 4 (SEQ ID NO:10), a fragment of intron 4 (SEQ ID NO:10), intron 5 (SEQ ID NO:12), a fragment of intron 5 (SEQ ID NO:12), intron 6 (SEQ ID NO:14), a fragment of intron 6 (SEQ ID NO:14), intron 7 (SEQ ID NO:16), a fragment of intron 7 (SEQ ID NO:16), intron 8 (SEQ ID NO:18), a fragment of intron 8 (SEQ ID NO:18), intron 9 (SEQ ID NO:20), a fragment of intron 9 (SEQ ID NO:20), intron 10 (SEQ ID NO:22), a fragment of intron 10 (SEQ ID NO:22), intron 11 (SEQ ID NO:24), a fragment of intron 11 (SEQ ID NO:24), intron 12 (SEQ ID NO:26), and a fragment of intron 12 (SEQ ID NO:26);

(c) the third sequence has at least 95% sequence identity to a sequence selected from one or more of the group consisting of: SEQ ID NO:27, a fragment of SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, a fragment of SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, a

fragment of SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, a fragment of SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, a fragment of SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, a fragment of SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, a fragment of SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, a fragment of SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, a fragment of SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, a fragment of SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, and a fragment of SEQ ID NO:37;

(d) the first sequence comprises SEQ ID NO:38, the second sequence comprises SEQ ID NO:39, and the third sequence comprises SEQ ID NO:40;

(e) the first sequence comprises SEQ ID NO:42, the second sequence comprises SEQ ID NO:43, and the third sequence comprises SEQ ID NO:44; or

(f) one or two or three of (a), (b), (c), (d) and (e).

8. The NtHMA RNAi construct of claim 6, wherein the first and the second sequence each have a length selected from the group consisting of 20-30 nucleotides, 30-50 nucleotides, 50-100 nucleotides, 100-150 nucleotides, 150-200 nucleotides, 200-300 nucleotides, 300-400 nucleotides, 400-500 nucleotides, 500-600 nucleotides, and 600-700 nucleotides.

9. A transgenic plant comprising the RNAi of any of claims 6 - 8 having a reduced Cd levels in at least a part of the plant compared to the part in a non-transgenic counterpart.

10. A consumable tobacco product incorporating leaves harvested from the transgenic plant of claim 9.

11. The product of claim 10, wherein a % Cd reduction is a value of at least about 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, or 99%.

12. The product of claim 10 or claim 11, wherein the Cd content is a value ranging from about 0.01 to about 0.05 ppm, from about 0.01 to about 0.1 ppm, from about 0.01 to about 0.5 ppm, from about 0.01 to about 1.0 ppm, or from about 0.01 to about 5 ppm.

13. A method for reducing Cd levels in at least a part of a plant, comprising:

reducing levels of an NtHMA mRNA in the plant by causing expression of an RNAi construct.

14. The method of claim 13, wherein the RNAi construct comprises:

a first sequence having at least 90% sequence identity to a portion of SEQ ID NO:3 or 47;

a second sequence; and

a third sequence having a reverse complementary sequence of the first sequence, positioned in the same orientation as the first sequence,

wherein the second sequence is positioned between the first sequence and the third sequence, and the second sequence is operably-linked to the first sequence and to the third sequence.

15. The method of claim 13 or claim 14, wherein following expression of the RNAi construct, the part of the plant has a Cd content reduced by at least about 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, or 99%.

16. The method of any of claims 13 to 15, wherein following expression of the RNAi construct, the part of the plant has a Cd content ranging from about 0.01 to about 0.05 ppm, from about 0.01 to about 0.1 ppm, from about 0.01 to about 0.5 ppm, from about 0.01 to about 1.0 ppm, or from about 0.01 to about 5 ppm.

17. A substantially purified polypeptide having at least 70% sequence identity, or at least 95% sequence identity, to SEQ ID NO:2 or 49, wherein the polypeptide is a NtHMA transporter having P1B-type ATPase activity.

18. An antibody that specifically binds to a polypeptide as defined in claims 17, such as a polypeptide comprising or consisting of SEQ ID NO:2 or 49.

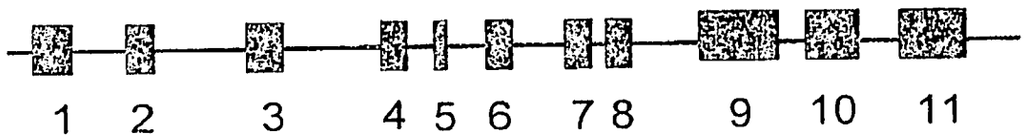
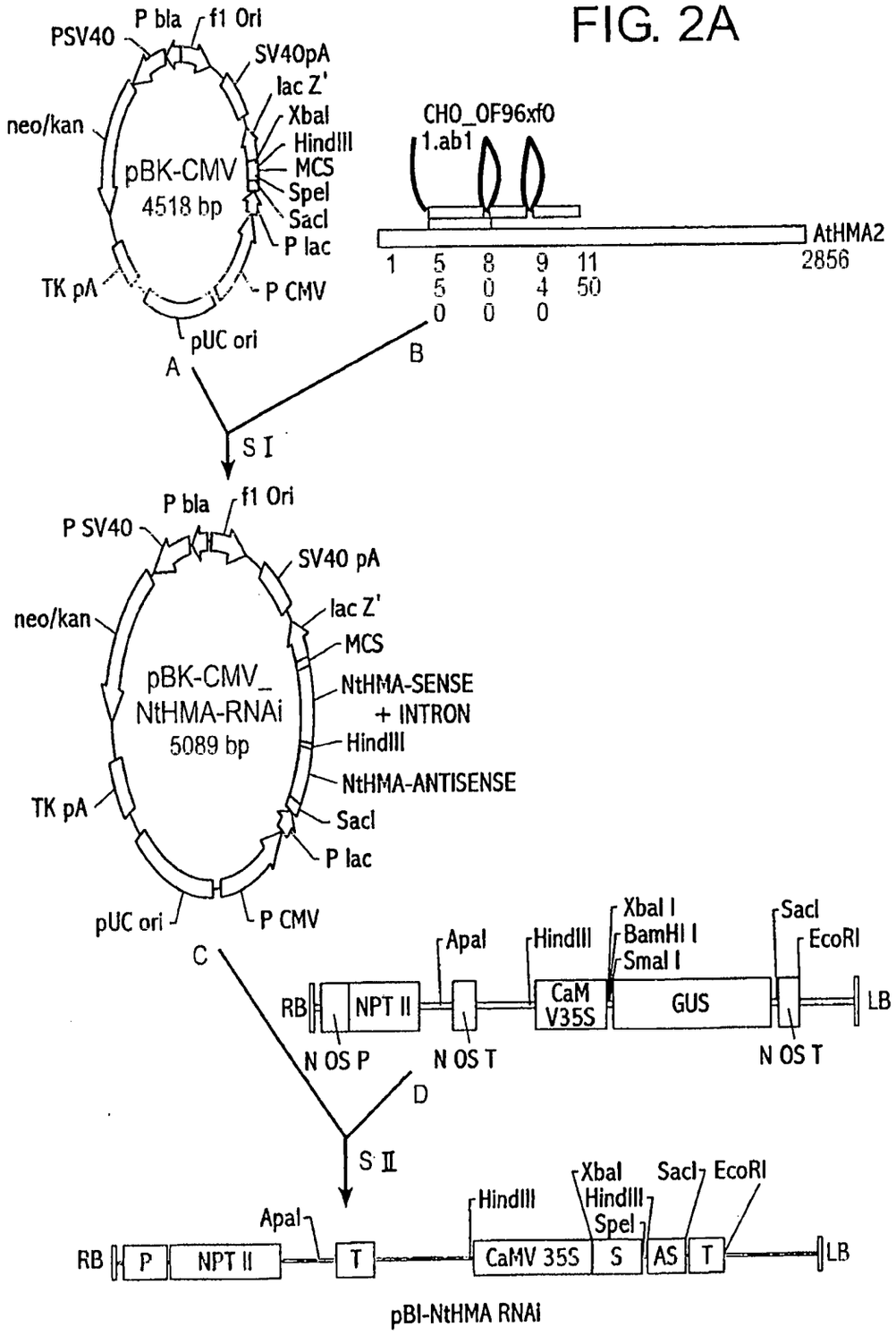


FIG.1

FIG. 2A



pBI-NtHMA RNAi

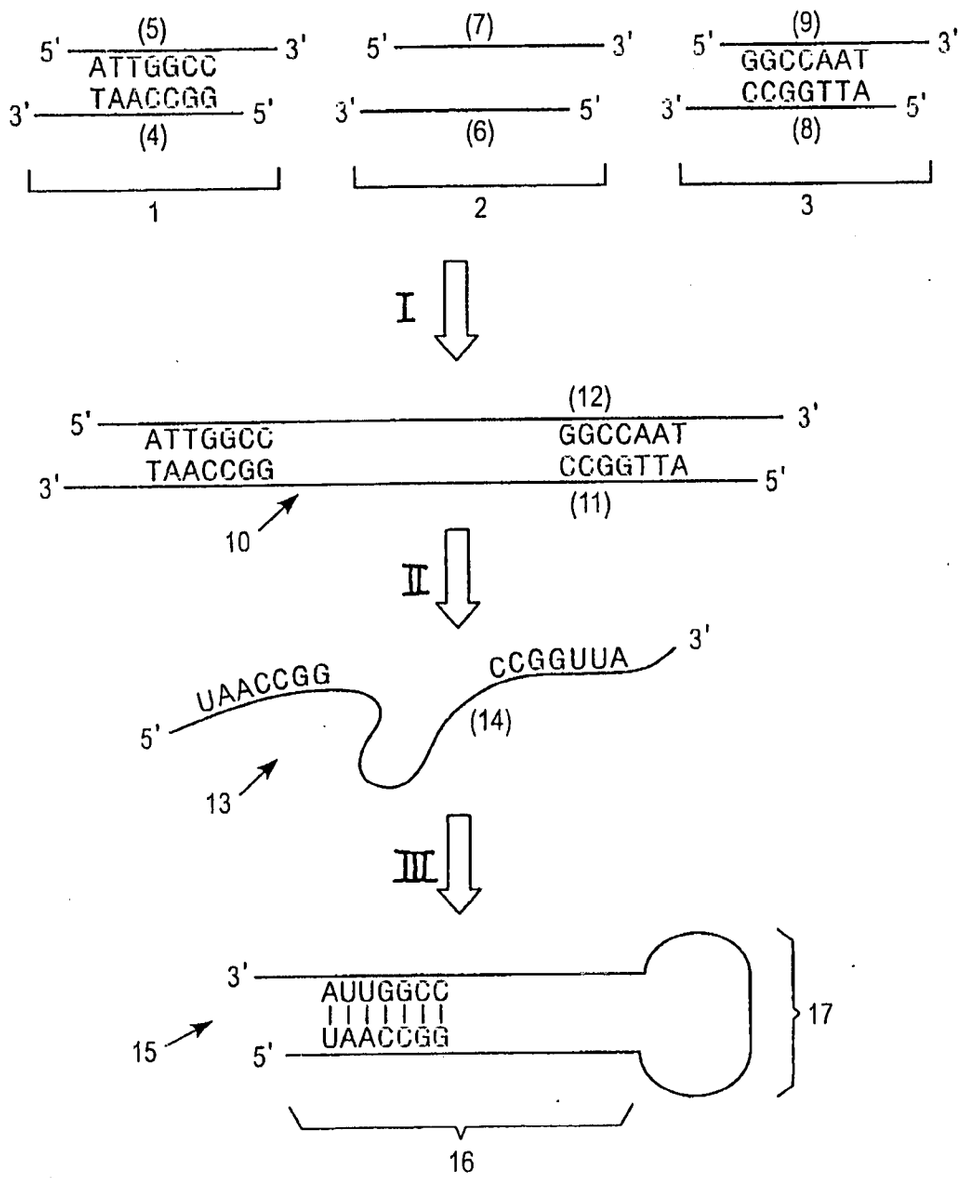

(5)
5'
ATTGGCC
3'
TAACCGG
(4)
5'
3'
1
(7)
5'
3'
(6)
5'
3'
2
(9)
5'
GGCCAAT
3'
CCGGTTA
(8)
5'
3'
3
I
(12)
5'
ATTGGCC
GGCCAAT
3'
TAACCGG
CCGGTTA
(11)
5'
10
II
UAACCGG
CCGGUUA
3'
5'
(14)
13
III
3'
AUUGGCC
UAACCGG
5'
15
17
16

FIG. 2B

SEQ ID NO:38

5'-ATTTGTAGTGCCAGCCCAGACCGTTGAATCTATTTGCTTAGAAAC
TGGAAACGACTCGCCTGTCAGTGTTTTCTCGTCCACGTCACATTCCC
CTTCCATTACAACTCCATCAATAGGTATAGTTTCACCAGCTTTAACAG
CAAGAATGCTATTCAACTTGACTTCATCAACATTTACGACTTCTCCAC
TTTCAGCTAAAACTGCTGTTGGAGGGACTATATTGACCAGTGATGAC
ATAGCAGCAGTAGCCTACATAACCA-3'

SEQ ID NO:39

5'-AGCCTGAAGAATTGAGCAAATAACATTAACAAACAATACTTGAAG
TTTCAGCACTAAATAAATGAAGCATGAAGGAATACTACACTACCATTT
AGA-3'

SEQ ID NO:40

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

FIG. 3A

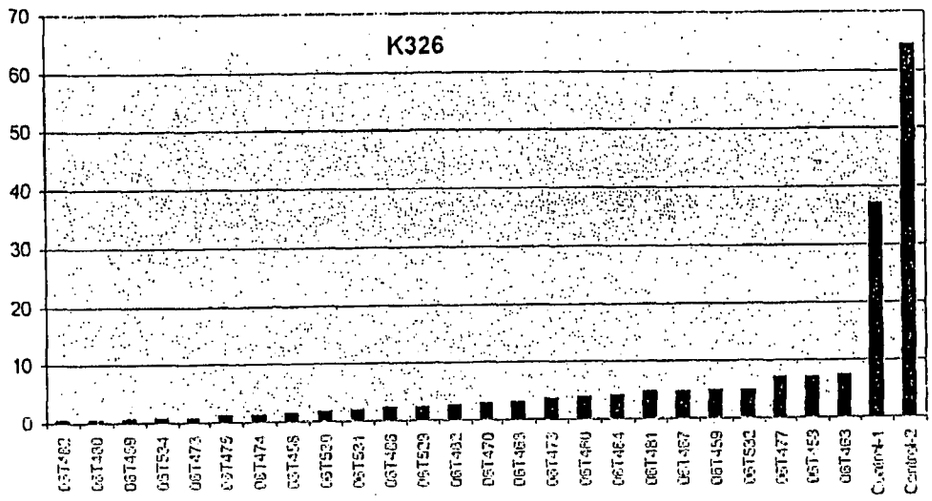

K326
70
60
50
40
30
20
10
0
Control-1
Control-2

FIG. 3B

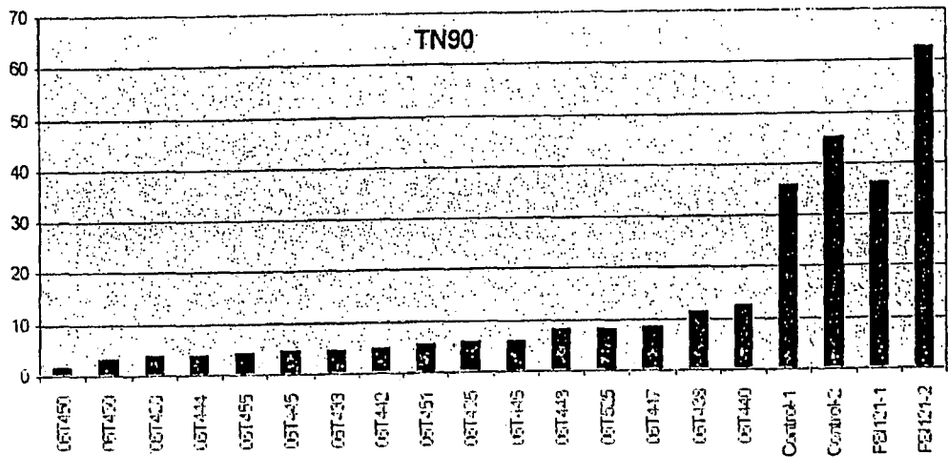

TN90
70
60
50
40
30
20
10
0
Control-1
Control-2
FB121-1
FB121-2

FIG. 3C

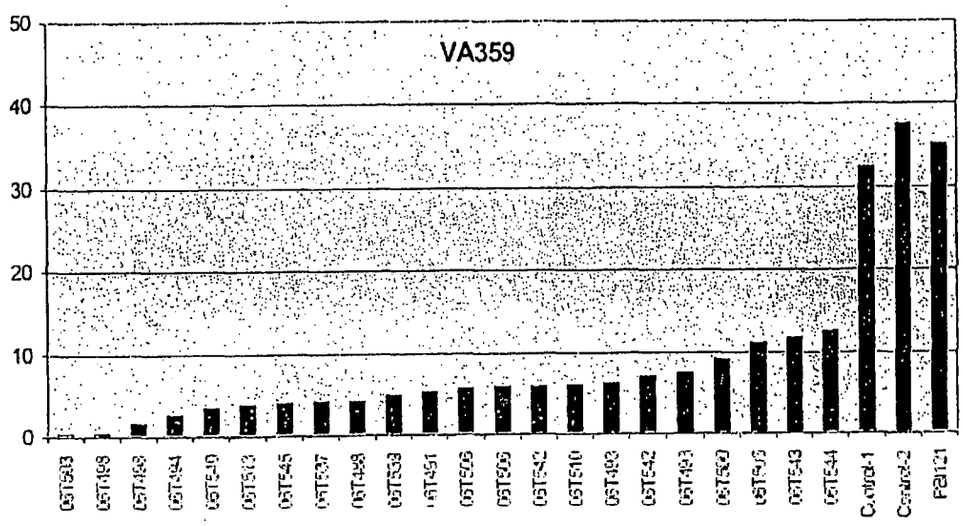


FIG. 3D

SEQ ID NO:42

5'-TGAGAGCAAGTCAGGTCATCCGATGGCAGCCGCTCTGGTGGAC
TATGCACAATCAAATTCCGTTGAGCCAAAGCCTGATAGAGTTGAGCA
GTTTCAAAATTTTCCTGGTGAAGGGATATTTGGAAGAATTGATGGAAT
GGAAATCTATGTCGGGAATAGGAAAATTTCTTCAAGAGCTGGATGTA
CCACAGG-3'

SEQ ID NO:43

5'-TAAATGGTTGAATCATTTCTTATGCTCATAGTAGAGATAAAACATC
AGAGTTATAATTATAAGTATATGATTTCTCCAGTTAATTTTGCTGTTAG
ATTTTCTTTGACCTGTTTAGCACTAATGCGGTGGATGTTTGAA-3'

SEQ ID NO:44

5'-CCTGTGGTACATCCAGCTCTTGAAGAAATTTTCCTATTCCCGACA
TAGATTTCCATTCCATCAATTCTTCCAAATATCCCTTCACCAGGAAAA
TTTTGAAACTGCTCAACTCTATCAGGCTTTGGCTCAACGGAATTTGAT
TGTGCATAGTCCACCAGAGCGGCTGCCATCGGATGACCTGACTTGC
TCTCAATGC-3'

FIG. 4A

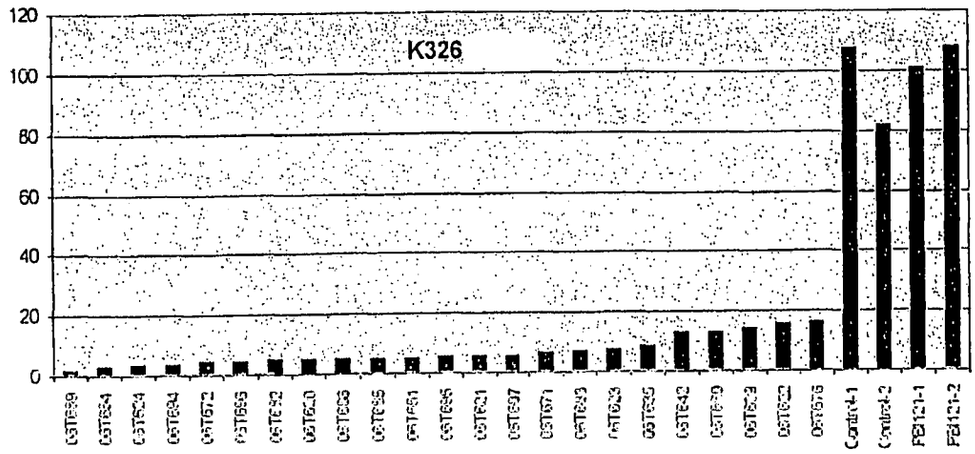

K326
120
100
80
60
40
20
0
Control-1
Control-2
PB1121-1
PB1121-2

FIG. 4B

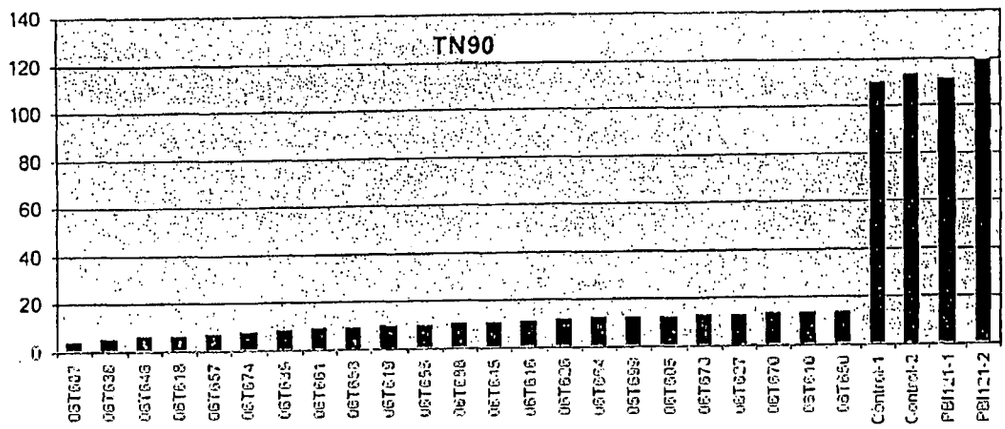

TN90
140
120
100
80
60
40
20
0
Control-1
Control-2
PB1121-1
PB1121-2

FIG. 4C

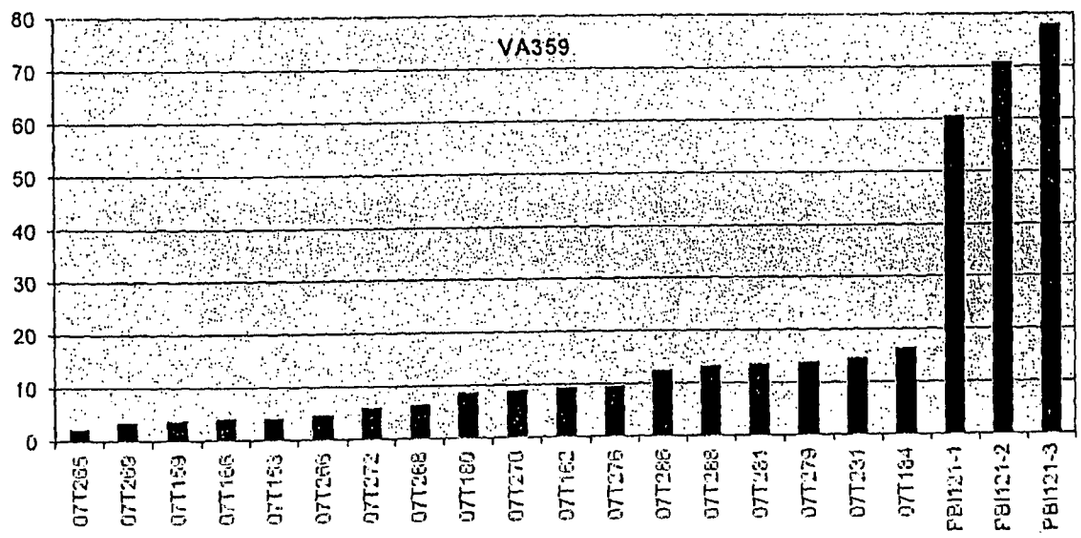

VA359
80
70
60
50
40
30
20
10
0
07T265
07T269
07T159
07T166
07T153
07T266
07T272
07T268
07T160
07T270
07T162
07T276
07T286
07T268
07T281
07T279
07T231
07T164
PB1121-1
PB1121-2
PB1121-3

FIG. 4D

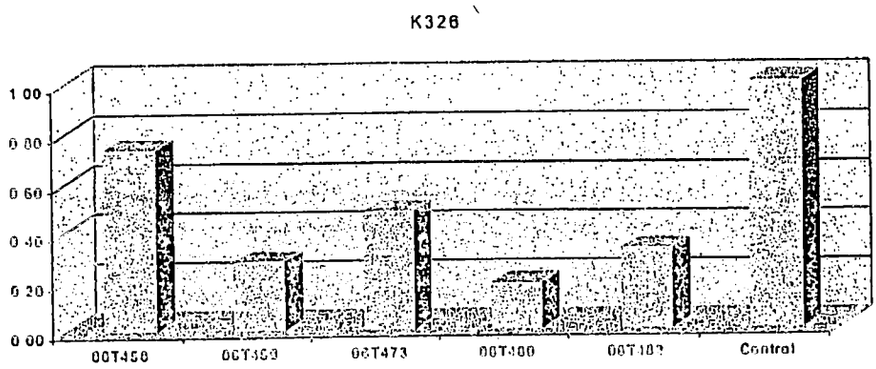


FIG. 5A

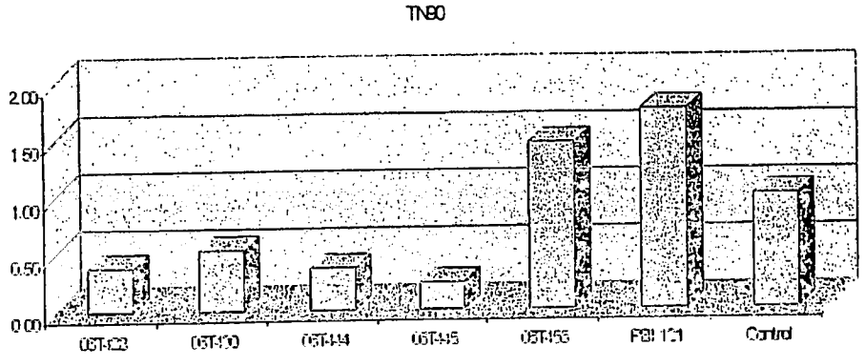


FIG. 5B

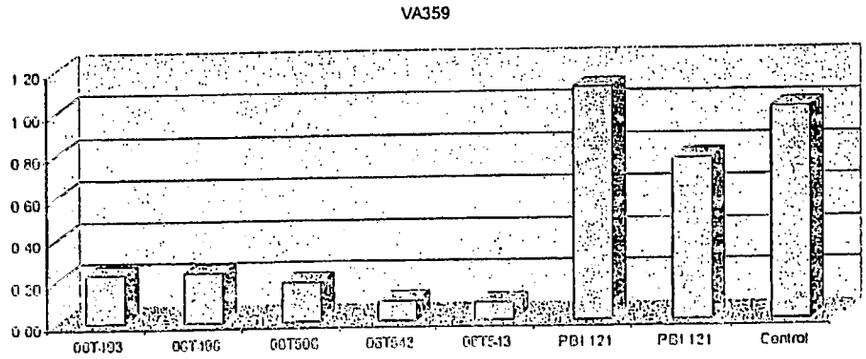


FIG. 5C

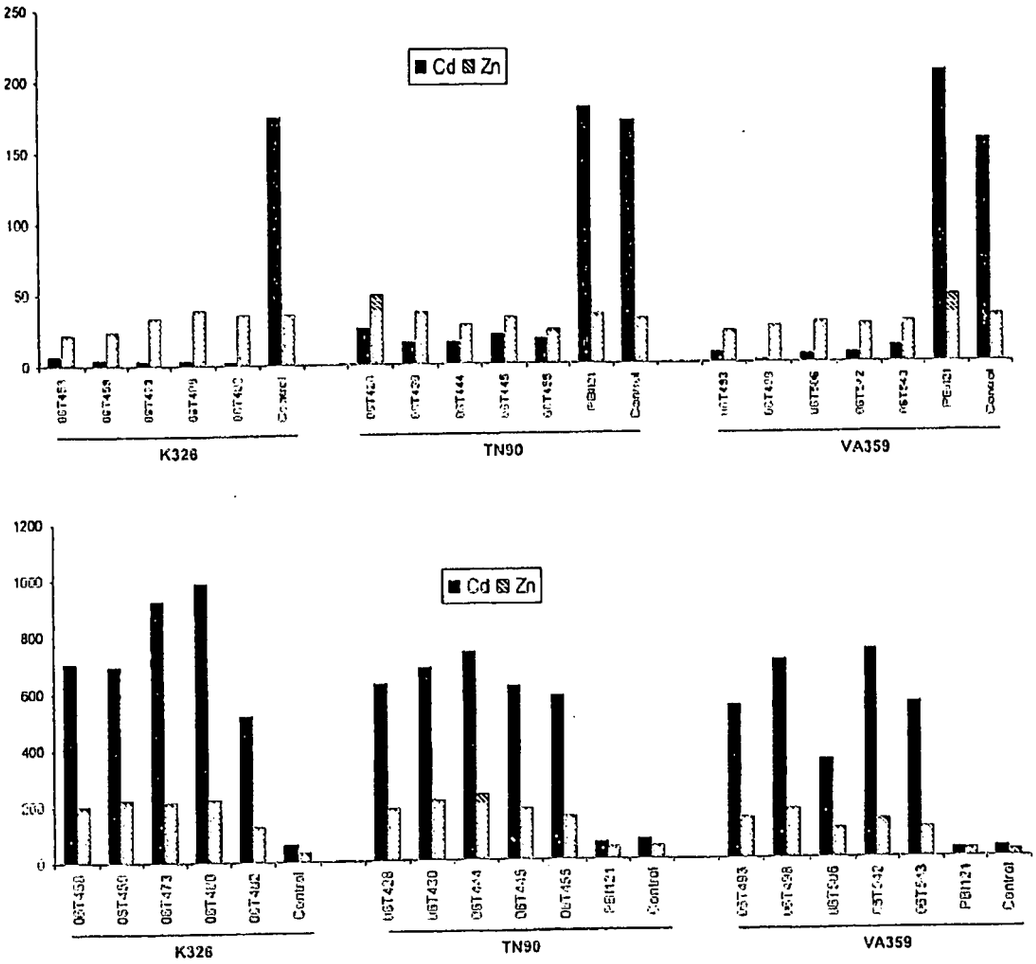

Cd Zn
250
200
150
100
50
0
K326
TN90
VA359
Cd Zn
1200
1000
800
600
400
200
0
Control
K326
TN90
VA359

FIG. 6

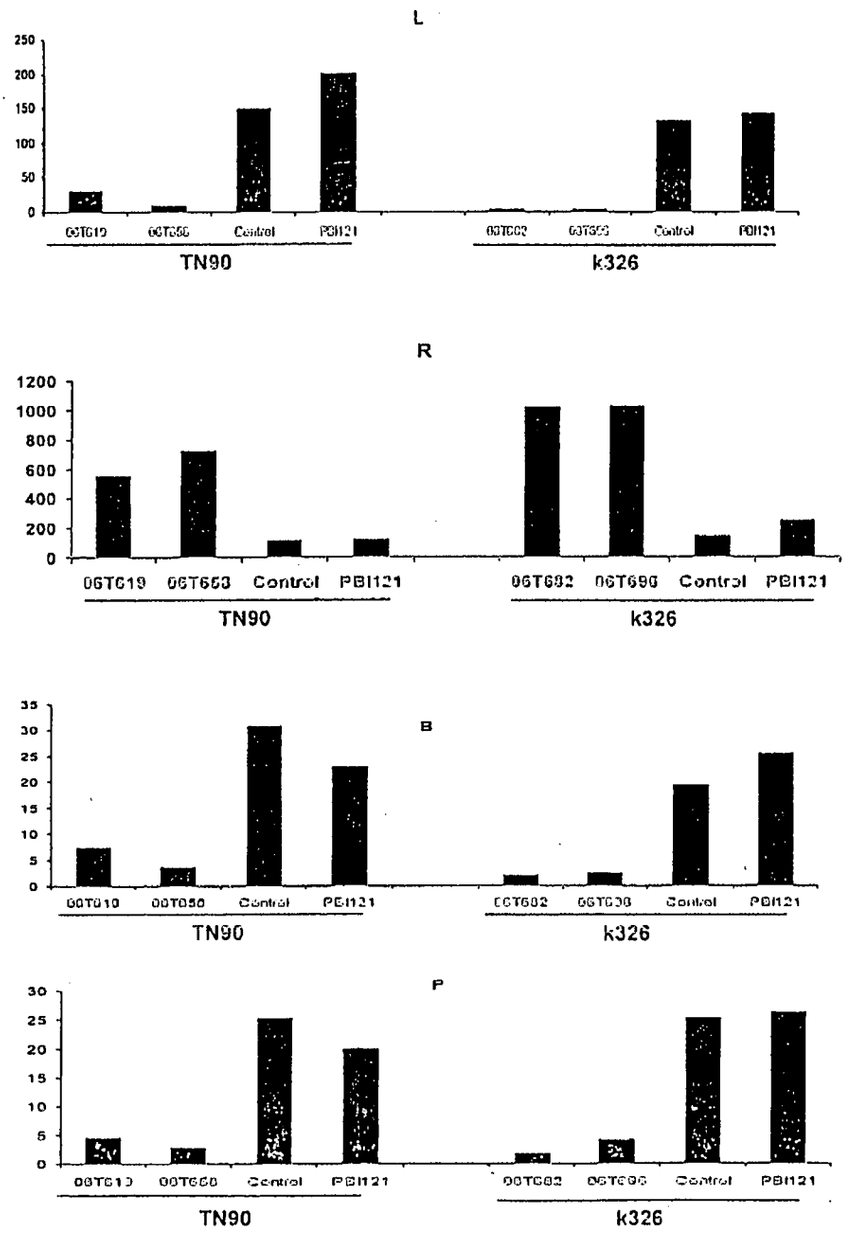

L
250
200
150
100
50
0
06T619
06T653
Control
PBI121
06T692
06T690
Control
PBI121
TN90
k326
R
1200
1000
800
600
400
200
0
06T619
06T653
Control
PBI121
06T692
06T690
Control
PBI121
TN90
k326
B
35
30
25
20
15
10
5
0
06T619
06T653
Control
PBI121
06T692
06T690
Control
PBI121
TN90
k326
P
30
25
20
15
10
5
0
06T619
06T653
Control
PBI121
06T692
06T690
Control
PBI121
TN90
k326

FIG. 7

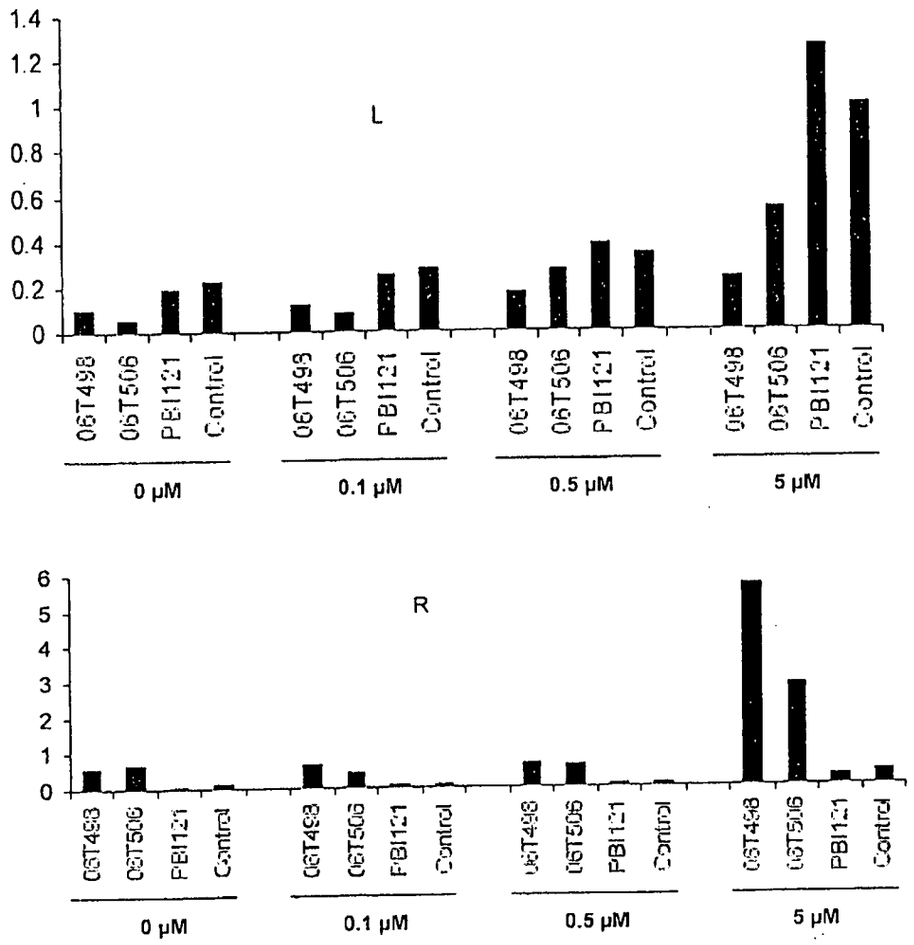

L
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
06T498
06T506
PBI121
Control
0 µM
0.1 µM
0.5 µM
5 µM
R
6
5
4
3
2
1
0

FIG. 8

SEQUENCE LISTING

<110> Philip Morris Products S.A.

<120> Transgenic Plants Modified for Reduced Cadmium Transport, Derivative Products, and Related Methods

<130> P/61020.W001/MAR

<150> US 60/996,982
<151> 2007-12-13

<160> 57

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 17921
<212> DNA
<213> Nicotiana tabacum

<400> 1
gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt 60

aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta 120

tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc 180

gtcaggggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gccttttttac ggttcctggc 240

cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt tcctgcgtta tcccctgatt ctgtggataa 300

ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgccgc agccgaacga ccgagcgcag 360

cgagtcagtg agcgaggaag cggaagagcg cccaatacgc aaaccgcctc tccccgcgcg 420

ttggccgatt cattaatgca gctggcacga caggtttccc gactggaaag cgggcagtga 480

gcgcaacgca attaatgtga gttagctcac tcattaggca ccccaggctt tacactttat 540

gcttccggct cgtatgttgt gtggaattgt gagcggataa caatttcaca caggaaacag 600

ctatgaccat gattacgcca agctatttag gtgacgcgtt agaatactca agctatgcat 660

caagcttggt accgagctcg gatccactag taacggccgc cagtgtgctg gaattcgccc 720

ttatcacctc tttccaaaac aaaagtatat ccaatatatt ccagaactag aaattccttt 780

ttcatctatt atcttctcct cctccttaga gaaggagaaa aatggtggaa agtgaaaaaa 840

tgaatgaaac aaagaagttg agcaagagct attttgatgt tttgggaatt tgctgtactt 900

cagaagttgt tctagttgaa aaaattctca agaatcttga aggggttaaa gaggtttcag 960

taattgtcac aacaaagact gtcattgtta ttcatgattc tcttctcatt tctccgcaac 1020

aaattggtaa gaaagatagt tacacacctt tattactctc tcagttctat tttttacgtg 1080

atactatttt cttttttaata tgttctgaaa agaacgttac ctttttatat attgatgtaa 1140

tttcacttta aacttcatat tttttttctt aaatagtatt gttttatagt cataaaaata 1200

ttattataag tctttcttaa gttttgtggc ttgttaaata aattcacata aaatgaaata 1260

aagcggtagg agtaccattc ttcatctttt cttaattaac tgacatttcc tttctttttt 1320

gtaagtttat atatattaag taaagtgatt tttctcttaa gaaatcgcca aaaaaaaaaa 1380

ggaaagagaa gagaagagac aagaaggggg agacaaatgg aatcagaaac ggttttgatt 1440

tgttcaagtg atatttggtg gtagttgttt caagcactgt tctttctgtt tgttggcatt 1500
tgctagaatt aagtgtatat attaatttgg gaaaatcttt aaagtggtta tttttagttt 1560
tattagattg agtaaccaag acggaaaaaa catgaactat ttttcttttg aaatttctag 1620
tcaagaacat gcataaaaat tctcttttaa aacgactctc ataaaaattc atgtggtcga 1680
gtttacgcag cacatggacc catagtctcc gcctaactaa gtattttaag tatgtatttt 1740
ctaaaattca tctaatattt tctgttggcg cacatgctcc acaaaagatg aattgtgcat 1800
ttgtttgaat attgagttat tactcaaagg aatatggatc aattccactt ttttttcttt 1860
ttctttaata ttgtacccat atcttaaaaa ttctagctcc gcctccgact tgcccatcgt 1920
atccgcccca gccctcagtg ggatagagta ggtgaggagt atagtttata aatgtttttt 1980
ctctaacaat taggttttgg aataaattct gagattcaat ggtctatttg aaacctgtaa 2040
ttactactcc ctccgtttca tattagatga ttactttcct ttttagtcta ttccaaaaca 2100
aataacacat ttctaaattt ggaaataatt caattttaaa atctttcatt ttacccattt 2160
accttaatga atgtttttat agccacacaa atgtcatgac cccacaaatt ttttacccct 2220
taaactttta agaccacaaa ttttaaaagt ttcttctttt ttcttaaact atatgccaag 2280
taaaactaac tcatcttgaa acggaggagt actataagaa tagttatata tgatttggcc 2340
ccacaaatta cataattgtg gcaagaaatc caagtttcta gttgttgata atttagtgat 2400
ggaggcgatc tctgttgaac cgttagagaa aatattttga ctcatgtcgc tttgcatcta 2460
ctgtgttgaa gagtagttgc taggaactaa caaagtaatt gtagtttcct tgtttttttt 2520
ttttcctttc ttgatgaatt actgtacttt attttcccat ttttttaacg tctgttactt 2580
atggtcagtt ttcaagtgtg aaaaattagc cagaaagaat aattcaacaa acttaacctt 2640
ttcttttctt cattcttgcg atctttccta aatatattta gtagagtctc ttttctactt 2700
cagtcttatt gcatttcttg cacacctaac agtagtggta cataaattgg acctagctaa 2760
caaaaggtaa ctcttatctg caagtttaat tggtacagta acatgaaact tgttataatc 2820
ttttaaattg cagccgataa tatatgtatg ttttacattg gttgtgtgta tataatgtaa 2880
attctttaca gcatgtttga ctaacctgca aaaattagtt tttttttttt caaaagtatt 2940
tttggtgaga agcagtttgt gtttggctaa gtaatttgaa aaatacttct gagcaacaat 3000
tagtgtttgt ccaagctttt aaaaactgct tttaattgta tttttgtcaa aagagctttt 3060
taaaaaagta ttttttagag agaaactact tttttctgct tctccaaaat tgtttctgct 3120
tctcctcaaa aacacttttt ttccttctaa aagcttgtac aaacacttca actaaaaaaa 3180
atatattagc acttatatta tccttataat tattgaagtt accatctatc ttttgtggat 3240
gtagttaaag cattgaatca agcaagatta gaagcaagca taagagtgaa aggagagaaa 3300
aactaccaaa agaaatggcc aagtccattt gcaattggca gtgaaatatt gcttggactc 3360
tcatctttga agtacttttt tgcacctttc caatggttag cacttgcagc tgttgcagtt 3420
gggattcctc caattatttt tagaggtgtg gctgccgtgc gaaacctcac tcttgacatc 3480

gacattcttg ttttaatagc aggtactttg cttttccttt tctttctttt taacttttttg 3540
aaaagcaaaa agagatactc ccttttgtcc caatttatat ggcggtattt aattaaacaa 3600
aaaaatctaa gaaaaatatg aatactttaa aaatttatgg tttgaaataa atcttaggca 3660
tctaaataca aggttaaaat aataatttta aagttaaaaa attcaagaaa gaaaggaaga 3720
cttctaaaat ttgtggcaag aaataaatct tagagatttg tgttataaat catctcacta 3780
aggctaaaat aataatttta aagttaaatt acttttaatt atgaaaaggt gatagatttt 3840
tgggaaaaga tagaaaagaa aactgtgcta tataaattga gacagagaga gtaatttacc 3900
ataagagtat ttgaagttga tttggttata gaattaacat gtgctcctac tttagctttg 3960
tgattgaaat ttggctattg ctttaatttc ttagctaatt ggatgcttct aatgtgatgc 4020
ttgaatcctt attcttgata atgctttgtg attcattatt tcattaaaaa gcatgcacca 4080
tagggcatgc aattaaatat tgtatttaag aatgcacttt taactaaccc acaagattgg 4140
agtgggaggg atgattcttg ggtgttagat gctaatattg gaccacccta gtgactttaa 4200
ataacgaaag catgaaaaac aattattgga tgcttgatat actttatgtt ataatatttt 4260
caggtgacct agaactacac aaataaactt ctttttccat attggaatag gatgatttag 4320
atttcaagat ggaattagtg attctatcac agattatctt ttatttaatg atatcaaata 4380
tgaaaagaga aaaaaaaaag gtgtctagga aatagtcaga aagatagtat gacatatatt 4440
attgatacaa attaatcagc tcaacacaaa ggctagcata tatttaacaa atagttatag 4500
acttgtagtg ttgtaccttt agttaagaga ctaaacacta ccaaaaggtt gcgatggagc 4560
agtaggtact cctctattgt catccaggcg ccttgatata aattaattag atcccaaaac 4620
gaggatcaga taccaaataa aaaacaaaaa gaaactatct ttagtgtttg ttgatttaca 4680
tggcgtagaa aaataaagga caatataata aaaaccttgg aatatcagtt aagatgcctt 4740
aatttcaaat cagtggagta tattccgact tccgtattaa tttcgctcta atcaagtctt 4800
ttaaaagatt aaataatgaa aagtttttat agtcacgaaa acattatgac cacaaaattt 4860
tgtcctttaa gctttttaga ccataaattt caaaaaaaaa aatttgactg aaatatttaa 4920
taccacatat ttttaaaaaa ttatttttt cttacattta gtgtcaagta aaattagatg 4980
tgataggaaa aaagaatttc gatttcgtct agtaaggaaa gtacaaaatt gcttatgtaa 5040
ctcgtaatat atcagaaatg gtttcccagg tgtaaagcac aaacaacgga gcccacatca 5100
gtaatgtgta aatgtgtaac gtttactctc ttttttttcct caaataattg caaagaaaat 5160
gactttcctg caagtctttc ttgccccttt tatagaaggt gacgttgact cgtaccagat 5220
tttcttgtca tagtattaat cagtagtaat atcagtcacg gcgaggttta aaatttagtc 5280
tattagtaac gtaaataatt tttaaattgt catatttagt taatctaaaa tatcatgcaa 5340
ttttttatat caagtttgat atgttgacgt aaataataga acaataattt ataaacttga 5400
ttaaattgca ttgataataa atcaaaatat tatttgaacg attaaaatct cacagttaat 5460
tttgcatctt gcataaaaaa atatccatca tatttccttg attatcattt gatgccgtct 5520
tagtttcttt taaaaaaatt tagaatttat atcaaatatg atttttttaat tactcgaact 5580

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

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

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

tggcgctaca aatctaaatg gtagtatagt atttcttcat gcttcattta tttagtgctg 11820
aaacttcaag tattgtttgt taatgttatt tgctcaattc ttcaggctat atcagtgtta 11880
agactacggc tttggctgaa gattgtgcgg tggctaggat ggcacagcct gtcgaagatg 11940
ctcagaacaa gaaatcaaaa acccaaagat acatcgacaa gtgtgctaaa tattatacac 12000
caggctagtg aatcttatgt tgtgccacat caagtcaaaa aatgcacgta ccgtgtgaac 12060
ttgttctttg tcttatgaat cacgtcacta tcctctccct tttcgatatg agatttccct 12120
aaggtgtcat atgaatccct tcttcggaag cttgccagca taggagtcta tcagtccttt 12180
cacttgaccc gccctctcag cctgcctgca gtcatgggcg tcgcactact atattgctct 12240
ttcgtttaaa acttttttatt tctaatactt ccctgctctt tgtgtatgtc taatttcgac 12300
tggtgatgtt ttgcagcaat tgtggctata ccagcttctt tggcaattgt tcctactgca 12360
ttaagagttc acaatcgaaa tgaatggtat cgcttggctt tggtcacatt ggtgagtgca 12420
tgtccgtgtg cactcgttct atctacacca gttgccatgt gttgcgcact ttcaaaagca 12480
gcaacgtccg gtcttctgtt taaaggagca gagtaccttg agactctagc taaaatcaaa 12540
atcatggctt ttgacaaaac agggactata actaaaggag aatttatggt gaccgagttc 12600
aagtctctga ttgatggttt tagtctcaat acactgcttt actggtaaag gttaccactc 12660
atacatattc ttttatgttg ccaaagagaa ttcaaaatct taactggtta tctttcacgg 12720
cacattgata gcgatataac atgattgatt tatatcatat attcataaaa gatgaaatag 12780
ggagtgccac attcacattc tcatattgaa gtttctgaaa tggctctaat ggttcaccat 12840
agagccaaaa taacatatag acacaacgtc agccgtctga tattcaggaa cttagatgga 12900
atagttggat cttatacatt gaggacacat aaaagtactt ggtcatataa attttagaaa 12960
tataatcaat gtattataat ctaaaattct tcaaatattc ttgatactgc aatacaaaag 13020
cacatggcac actgaataga agccttgttc ggtggtctaa aacattcgtt tagagtaaat 13080
actgagttgt ctagtgaata ttttcagggt ttcaagcatt gagagcaagt caggtcatcc 13140
gatggcaacc gctctggtgg actatgcaca atcaaattcc gttgagccaa agcctgatag 13200
agttgagcgg tttcaaaatt ttcctggtga agggatattt ggaagaattg atggaatgga 13260
aatctatgtc gggaatagga aaatttcttc aagagctgga tgtaccacag gtaaatggtt 13320
gaatcatttc ttatgctcat agtagagata aaacatcaga gttataatta taagtatatg 13380
atttctccag ttaattttgc tgttagattt tctttgacct gtttagcact aatgcggtgg 13440
atgtttgaat ttcagtacca gaaatagagg gtgatagttt caaaggaaag tctgttggat 13500
acatattttt gggatcatct ccagctggaa ttttcagtct ttccgatgtt tgtcgaattg 13560
gtgtaaaaga agcaatgaga gaactgaagc agatgggtat caaaaccgcg atgcttactg 13620
gtgatcgtta tgcagctgcc aaccatgtgc aggatcaggt atattaataa ttctgcatta 13680
cgctgaaatg attataaaac cctttggatt attgtttagt cttaagaatt ttcactgaac 13740
tcttattgtt tccttcttct atcatcaaca ttggttaaac atttcatcta aatttagaga 13800
acgtatcacc aagtaagtgc tttaccttta cagggtcata taaaatactt aagacagtgt 13860

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

gcaaatctct agcatcgtga caaaattctt agatcatata caactttgag aatataggct 15960
gtcacagacc cttcttcata ctgcattaga ggagagcagc caatttttta ttcatgattt 16020
gaaacaaata aagttcttct tgaggtgtat ggagaggcta tgagaatcat ttgctgagta 16080
ggtttgagat tttcaggttc aaggtcatgc agaaataaga agtgccagga ctctgcaacc 16140
gagaacagtt ttcattcacc acttactaat ccactcagtg gggaaaagct ttcggagcag 16200
aaaagcttgg atttagtccg aaaagataag gaatcaagtc atgatcttcg tcatggctgc 16260
tctgacgagg aacatgatca tacaaattta gacaaggcat atgacagttg tgccttacaa 16320
gaatgttgtt attcggttca aggcaataaa actgatgtat cagaaactgg aatccaggaa 16380
actgctcatt gtgacagcac caatcaaaca tgccaaactg caagttcagg taggcactac 16440
caaatcatat gatccaaagt gctcctccac cttcactcct acaataaatg ttcgatcaaa 16500
cttcataaga agatagcata tgcatcgcaa atctctaaaa aaatgatgga taatgttact 16560
caccaactag tttgagatag aagtttaact gattgctata tatcgttaac tataaaaaac 16620
tacttgttaa ttagagctga gattttcagg atcgatgaca tgcggaaatg ataagatcct 16680
ggactctcta agcatccatg gttgtcattc gcatgataat ccactccacg aggagaacaa 16740
cctggagcag aaaatcttgg atgttgttgg agaaggtata aaatcacctc atgctgtcgg 16800
tcatggctgt tcggacaagg aacacgatca ctcacatcca gaaaaggcat atgacagttg 16860
tgcaacagat gattgttgtt tttcagttca agtccatggc attgacgacg tatcaaaaag 16920
tgaaattcaa gaaactgctc attgtgacag cacaaagcag agcatggtca tctccagcag 16980
ctgcaaacat gaaccaaaag atcaggtaaa tcactgtgga cttcactcta aaactactcc 17040
aactgatgaa gaactagcca agctggttag aagatgctgc gaatacaaac catgccacga 17100
cgtccgttct ggctgcagga agcatgctgc agaatgtggt ccaaccgttc gatcaactat 17160
caatatctta cgggacaacc atcatcatta cctagactgc agtggtcgta aggtttgttc 17220
gctgttggag aagagacaca tcggtggatg ctgtgacagc ttcagaaaag aatgttgtgc 17280
caagaagaac caccttggag caagtttcgg aggaggttta tcagaaattg tcatagagta 17340
gatgcaatcc gaagtgtaca tatgttgtaa acttcctacc tattttatct tcaagaagtt 17400
gagctgctaa tttgaacaaa gcaagggcga attctgcaga tatccatcac actggcggcc 17460
gctcgagcat gcatctagag ggcccaattc gccctatagt gagtcgtatt acaattcact 17520
ggccgtcgtt ttacaacgtc gtgactggga aaaccctggc gttacccaac ttaatcgcct 17580
tgcagcacat ccccctttcg ccagctggcg taatagcgaa gaggcccgca ccgatcgccc 17640
ttcccaacag ttgcgcagcc tatacgtacg gcagtttaag gtttacacct ataaaagaga 17700
gagccgttat cgtctgtttg tggatgtaca gagtgatatt attgacacgc cggggcgacg 17760
gatggtgatc cccctggcca gtgcacgtct gctgtcagat aaagtctccc gtgaacttta 17820
cccggtggtg catatcgggg atgaaagctg gcgcatgatg accaccgata tggccagtgt 17880
gccggtctcc gttatcgggg aagaagtggc tgatctcagc c 17921

<210> 2
<211> 1397
<212> PRT
<213> Nicotiana tabacum

<400> 2

Met Asn Glu Thr Lys Lys Leu Ser Lys Ser Tyr Phe Asp Val Leu Gly
1 5 10 15

Ile Cys Cys Thr Ser Glu Val Val Leu Val Glu Lys Val Leu Lys Asn
20 25 30

Leu Glu Gly Val Lys Glu Val Ser Val Ile Val Thr Thr Lys Thr Val
35 40 45

Ile Val Ile His Asp Ser Leu Leu Ile Ser Pro Gln Gln Ile Val Lys
50 55 60

Ala Leu Asn Gln Ala Arg Leu Glu Ala Ser Ile Arg Val Lys Gly Glu
65 70 75 80

Lys Asn Tyr Gln Lys Lys Trp Pro Ser Pro Phe Ala Ile Gly Ser Gly
85 90 95

Ile Leu Leu Gly Leu Ser Phe Leu Lys Tyr Phe Phe Ala Pro Phe Gln
100 105 110

Trp Leu Ala Leu Ala Ala Val Ala Val Gly Ile Pro Pro Ile Ile Phe
115 120 125

Arg Gly Val Ala Ala Val Arg Asn Leu Thr Leu Asp Ile Asn Ile Leu
130 135 140

Val Leu Ile Ala Val Ala Gly Ser Ile Val Leu His Asp Tyr Trp Glu
145 150 155 160

Ala Gly Thr Ile Val Phe Leu Phe Ala Ile Ala Glu Trp Leu Glu Ser
165 170 175

Arg Ala Ser His Lys Ala Thr Ala Ala Met Ser Ser Leu Val Asn Ile
180 185 190

Val Pro Pro Thr Ala Val Leu Ala Glu Ser Gly Glu Val Val Asn Val
195 200 205

Asp Glu Val Lys Val Asn Ser Ile Leu Ala Val Lys Ala Gly Glu Thr
210 215 220

Ile Pro Ile Asp Gly Val Val Val Glu Gly Glu Cys Asp Val Asp Glu
225 230 235 240

Lys Thr Leu Thr Gly Glu Ser Phe Pro Val Ser Lys Gln Arg Asp Ser
245 250 255

```
Thr Val Trp Ala Gly Thr Thr Asn Leu Asn Gly Tyr Ile Ser Val Lys
            260                 265                 270

Thr Thr Ala Leu Ala Glu Asp Cys Ala Val Ala Arg Met Ala Gln Leu
        275                 280                 285

Val Glu Asp Ala Gln Asn Lys Lys Ser Lys Thr Gln Arg Tyr Ile Asp
    290                 295                 300

Lys Cys Ala Lys Tyr Tyr Thr Pro Ala Ile Val Ala Ile Ser Ala Ser
305                 310                 315                 320

Leu Ala Ile Val Pro Thr Ala Leu Arg Val His Asn Arg Asn Glu Trp
                325                 330                 335

Tyr Arg Leu Ala Leu Val Thr Leu Val Ser Ala Cys Pro Cys Ala Leu
            340                 345                 350

Val Leu Ser Thr Pro Val Ala Met Cys Cys Ala Leu Ser Lys Ala Ala
        355                 360                 365

Thr Ser Gly Leu Leu Phe Lys Gly Ala Glu Tyr Leu Glu Thr Leu Ala
    370                 375                 380

Lys Ile Lys Ile Met Ala Phe Asp Lys Thr Gly Thr Ile Thr Lys Gly
385                 390                 395                 400

Glu Phe Met Val Thr Glu Phe Lys Ser Leu Ile Asp Gly Phe Ser Leu
                405                 410                 415

Asn Thr Leu Leu Tyr Trp Val Ser Ser Ile Glu Ser Lys Ser Gly His
            420                 425                 430

Pro Met Ala Ala Ala Leu Val Asp Tyr Ala Gln Ser Asn Ser Val Glu
        435                 440                 445

Pro Lys Pro Asp Arg Val Glu Gln Phe Gln Asn Phe Pro Gly Glu Gly
    450                 455                 460

Ile Phe Gly Arg Ile Asp Gly Met Glu Ile Tyr Val Gly Asn Arg Lys
465                 470                 475                 480

Ile Ser Ser Arg Ala Gly Cys Thr Thr Val Pro Glu Ile Glu Gly Asp
                485                 490                 495

Ser Phe Lys Gly Lys Ser Val Gly Tyr Ile Phe Leu Gly Ser Ser Pro
            500                 505                 510

Ala Gly Ile Phe Ser Leu Ser Asp Val Cys Arg Ile Gly Val Lys Glu
        515                 520                 525
```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Gln Phe Gln Asn Gln Ser Arg Ala Glu Ile Ile Ser Ala Gln Thr
805 810 815

Pro Leu Lys Ile Val Val Phe Ile Leu Ile Pro Val Leu Asn Ala Ala
820 825 830

Arg Arg Arg Trp Leu Leu Lys Arg Ala Asn Leu Gln Phe Gln Asn Gln
835 840 845

Ser His Val Glu Ile Ile Ser Ala Gln Thr Pro Leu Lys Asn Ser Gly
850 855 860

Phe His Ser His Pro Arg Pro Gln Cys Cys Ser Ser Lys Met Ala Ala
865 870 875 880

Lys Ala Gly Gln Ser Ala Leu Ser Glu Ser Lys Ser Cys Gly Asn Asn
885 890 895

Asn Cys Ser Asp Ser Ile His Lys Ser Asn Cys His Ser Leu Thr Asn
900 905 910

Ser Leu Val Cys Ser Ser Lys Met Ser Ala Pro Gln Cys His Ser Ala
915 920 925

Thr Ser Ser Asn Lys Ser Cys Gly Ser Thr Lys Cys Ser Asp Phe Ser
930 935 940

Asp Lys Lys Cys Cys Gln Ser Asp Lys Ile Pro Gln Thr Cys Ser Thr
945 950 955 960

Lys Lys Ser Ala Pro Gly Cys Gln Ser Ala Val Ser Gly Ser Lys Ser
965 970 975

Cys Gly Asn Ser Lys Cys Ser Asp Ser Lys Asp Asn Ser Ser His Pro
980 985 990

Ser His Pro Asp His Gln Thr Cys Met Ser Lys Leu Cys Ala Pro Gln
995 1000 1005

Ser Gln Ser Ala Thr Ser Ser Ser Arg Thr Cys Gly Asn Thr Lys
1010 1015 1020

Cys Ser Asp Thr Asn Ser Lys Asn Ser Cys Tyr Ser Gln Thr Asn
1025 1030 1035

Ser Glu Ser Cys Ser Ser Lys Met Ser Gly Pro Ser Cys Lys Thr
1040 1045 1050

Ala Asn Ser Gly Ser Arg Ser Cys Arg Asn Lys Lys Cys Gln Asp
1055 1060 1065

Ser Ala Thr Glu Asn Ser Phe His Ser Pro Leu Thr Asn Pro Leu

1070 1075 1080

Ser Gly Glu Lys Leu Ser Glu Gln Lys Ser Leu Asp Leu Val Arg
1085 1090 1095

Lys Asp Lys Glu Ser Ser His Asp Leu Arg His Gly Cys Ser Asp
1100 1105 1110

Glu Gly His Asp His Thr Asn Leu Asp Lys Ala Tyr Asp Ser Cys
1115 1120 1125

Ala Leu Gln Glu Cys Cys Tyr Ser Val Gln Gly Asn Lys Thr Asp
1130 1135 1140

Val Ser Glu Thr Gly Ile Gln Glu Thr Ala His Cys Asp Ser Thr
1145 1150 1155

Asn Gln Thr Cys Gln Thr Ala Ser Ser Gly Ser Met Thr Cys Gly
1160 1165 1170

Asn Asp Lys Ile Leu Asp Ser Leu Ser Ile His Gly Cys His Ser
1175 1180 1185

His Asp Asn Pro Leu His Glu Glu Asn Asn Leu Glu Gln Lys Ile
1190 1195 1200

Leu Asp Val Val Gly Glu Gly Ile Lys Ser Pro His Ala Val Gly
1205 1210 1215

His Gly Cys Ser Asp Lys Glu His Asp His Ser His Pro Glu Lys
1220 1225 1230

Ala Tyr Asp Ser Cys Ala Thr Asp Asp Cys Cys Phe Ser Val Gln
1235 1240 1245

Val His Gly Ile Asp Asp Val Ser Lys Ser Glu Ile Gln Glu Thr
1250 1255 1260

Ala His Cys Asp Ser Thr Lys Gln Ser Met Val Ile Ser Ser Ser
1265 1270 1275

Cys Lys His Glu Pro Lys Asp Gln Val Asn His Cys Gly Leu His
1280 1285 1290

Ser Lys Thr Thr Pro Thr Asp Glu Glu Leu Ala Lys Leu Val Arg
1295 1300 1305

Arg Cys Cys Lys Tyr Lys Pro Cys His Asp Val Arg Ser Gly Cys
1310 1315 1320

Arg Lys His Ala Ala Glu Cys Gly Pro Thr Val Arg Ser Thr Ile
1325 1330 1335

Asn Ile Leu Arg Asp Asn His His His Tyr Leu Asp Cys Ser Gly
1340 1345 1350

Arg Lys Val Cys Ser Leu Leu Glu Lys Arg His Ile Gly Gly Cys
1355 1360 1365

Cys Asp Ser Phe Arg Lys Glu Cys Cys Ala Lys Lys Lys His Leu
1370 1375 1380

Gly Ala Ser Phe Gly Gly Gly Leu Ser Glu Ile Val Ile Glu
1385 1390 1395

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

<400> 3
tcacctcttt ccaaaacaaa agtatatcca atatattcca gaactagaaa ttccttttc 60

atctattatc ttctcctcct ccttagagaa ggagaaaaat ggtggaaagt gaaaaaatga 120

atgaaacaaa gaagttgagc aagagctatt ttgatgtttt gggaatttgc tgtacttcag 180

aagttgttct agttgaaaaa gttctcaaga atcttgaagg ggttaaagag gtttcagtaa 240

ttgtcacaac aaagactgtc attgttattc atgattctct tctcatttct ccgcaacaaa 300

ttgttaaagc attgaatcaa gcaagattag aagcaagcat aagagtgaaa ggagagaaaa 360

actaccaaaa gaaatggcca agtccatttg caattggcag tggaatattg cttggactct 420

catttttgaa gtactttttt gcacctttcc aatggttagc acttgcagct gttgcagttg 480

ggattcctcc aattattttt agaggtgtgg ctgccgtgcg aaacctcact cttgacatca 540

acattcttgt tttaatagca gtggctggat caattgtttt acacgattat tgggaagctg 600

gtactattgt cttcttattc gccattgcag aatggctaga gtcaagggca agtcacaagg 660

ctaccgctgc tatgtcatca ctggtcaata tagtccctcc aacagcagtt ttagctgaaa 720

gcggagaagt cgtaaatgtt gatgaagtca aggtgaatag cattcttgct gtgaaagctg 780

gtgaaactat acctattgat ggagttgtag tggaagggga atgtgacgtg gacgagaaaa 840

cactgacagg cgagtcgttt ccagtttcta agcaaagaga ttcaacggtc tgggctggca 900

ctacaaatct aaatggctat atcagtgtta agactacggc tttggctgaa gattgtgcgg 960

tggctaggat ggcacagctt gtcgaagatg ctcagaacaa gaaatcaaaa acccaaagat 1020

acatcgacaa gtgtgctaaa tattatacac cagcaattgt ggctatatca gcttctttgg 1080

caattgttcc tactgcatta agagttcaca atcgaaatga atggtatcgc ttggctttgg 1140

tcacattggt gagtgcatgt ccgtgtgcac ttgttctatc tacaccagtt gccatgtgtt 1200

gcgcactttc aaaagcagca acgtccggtc ttctgtttaa aggagcagag taccttgaga 1260

ctctagctaa aatcaaaatc atggcttttg acaaaacagg gactataact aaaggagaat 1320

ttatggtgac cgagttcaag tctctgattg atggttttag tctcaataca ctgctttact 1380

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

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

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

<220>
<221> Intron
<222> (1)..(723)

<400> 4
gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt 60
aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta 120
tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc 180
gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttcctggc 240
cttttgctgg cctttttgctc acatgttctt tcctgcgtta tcccctgatt ctgtggataa 300
ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgccgc agccgaacga ccgagcgcag 360
cgagtcagtg agcgaggaag cggaagagcg cccaatacgc aaaccgcctc tccccgcgcg 420
ttggccgatt cattaatgca gctggcacga caggtttccc gactggaaag cgggcagtga 480
gcgcaacgca attaatgtga gttagctcac tcattaggca ccccaggctt tacactttat 540
gcttccggct cgtatgttgt gtggaattgt gagcggataa caatttcaca caggaaacag 600
ctatgaccat gattacgcca agctatttag gtgacgcgtt agaatactca agctatgcat 660
caagcttggt accgagctcg gatccactag taacggccgc cagtgtgctg gaattcgccc 720

tta 723

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

<220>
<221> exon
<222> (1)..(303)

<400> 5
tca cct ctt tcc aaa aca aaa gta tat cca ata tat tcc aga act aga 48
Ser Pro Leu Ser Lys Thr Lys Val Tyr Pro Ile Tyr Ser Arg Thr Arg
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

<220>
<221> Intron
<222> (1)..(2218)

<400> 6
gtaagaaaga tagttacaca cctttattac tctctcagtt ctatttttta cgtgatacta 60

ttttcttttt aatatgttct gaaaagaacg ttacctttt atatattgat gtaatttcac 120

tttaaacttc atatttttt tcttaaatag tattgtttta tagtcataaa aatattatta 180

taagtctttc ttaagttttg tggcttgtta aataaattca cataaaatga aataaagcgg 240

taggagtacc attcttcatc ttttcttaat taactgacat ttccttttctt ttttgtaagt 300

ttatatatat taagtaaagt gatttttctc ttaagaaatc gccaaaaaaa aaaaggaaag 360

agaagagaag agacaagaag ggggagacaa atggaatcag aaacggtttt gatttgttca 420

agtgatattt ggtggtagtt gtttcaagca ctgttctttc tgtttgttgg catttgctag 480
aattaagtgt atatattaat ttgggaaaat ctttaaagtg gttattttta gttttattag 540
attgagtaac caagacggaa aaaacatgaa ctatttttct tttgaaattt ctagtcaaga 600
acatgcataa aaattctctt ttaaaacgac tctcataaaa attcatgtgg tcgagtttac 660
gcagcacatg gacccatagt ctccgcctaa ctaagtattt taagtatgta ttttctaaaa 720
ttcatctaat attttctgtt ggcgcacatg ctccacaaaa gatgaattgt gcatttgttt 780
gaatattgag ttattactca aaggaatatg gatcaattcc actttttttc tcttttcttt 840
aatattgtac ccatatctta aaaattctag ctccgcctcc gacttgccca tcgtatccgc 900
cccagccctc agtgggatag agtaggtgag gagtatagtt tataaatgtt ttttctctaa 960
caattaggtt ttggaataaa ttctgagatt caatggtcta tttgaaacct gtaattacta 1020
ctccctccgt ttcatattag atgattactt tcctttttag tctattccaa aacaaataac 1080
acatttctaa atttggaaat aattcaattt taaaatcttt cattttaccc atttaccttа 1140
atgaatgttt ttatagccac acaaatgtca tgaccccaca aatttttttac cccttaaact 1200
tttaagacca caaattttaa aagtttcttc ttttttctta aactatatgc caagtaaaac 1260
taactcatct tgaaacggag gagtactata agaatagtta tatatgattt ggccccacaa 1320
attacataat tgtggcaaga aatccaagtt tctagttgtt gataatttag tgatggaggc 1380
gatctctgtt gaaccgttag agaaaatatt ttgactcatg tcgctttgca tctactgtgt 1440
tgaagagtag ttgctaggaa ctaacaaagt aattgtagtt tccttgtttt ttttttttcc 1500
tttcttgatg aattactgta ctttatttttc ccatttttttt aacgtctgtt acttatggtc 1560
agttttcaag tgtgaaaaat tagccagaaa gaataattca acaaacttaa cctttttctt 1620
tcttcattct tgcgatcttt cctaaatata tttagtagag tctcttttct acttcagtct 1680
tattgcattt cttgcacacc taacagtagt ggtacataaa ttggacctag ctaacaaaag 1740
gtaactctta tctgcaagtt taattggtac agtaacatga aacttgttat aatcttttaa 1800
attgcagccg ataatatatg tatgttttac attggttgtg tgtatataat gtaaattctt 1860
tacagcatgt ttgactaacc tgcaaaaatt agtttttttt ttttcaaaag tatttttggt 1920
gagaagcagt ttgtgtttgg ctaagtaatt tgaaaaatac ttctgagcaa caattagtgt 1980
ttgtccaagc ttttaaaaac tgcttttaat tgtatttttg tcaaaagagc tttttaaaaa 2040
agtatttttt agagagaaac tacttttttc tgcttctcca aaattgtttc tgcttctcct 2100
caaaaacact ttttttcctt ctaaaagctt gtacaaacac ttcaactaaa aaaaatatat 2160
tagcacttat attatcctta taattattga agttaccatc tatcttttgt ggatgtag 2218

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

<220>
<221> exon

<222> (1)..(258)

<400> 7

```
tta aag cat tga atc aag caa gat tag aag caa gca taa gag tga aag          48
Leu Lys His     Ile Lys Gln Asp     Lys Gln Ala     Glu     Lys
1               5                  10

gag aga aaa act acc aaa aga aat ggc caa gtc cat ttg caa ttg gca          96
Glu Arg Lys Thr Thr Lys Arg Asn Gly Gln Val His Leu Gln Leu Ala
        15                  20                  25

gtg aaa tat tgc ttg gac tct cat ctt tga agt act ttt ttg cac ctt         144
Val Lys Tyr Cys Leu Asp Ser His Leu     Ser Thr Phe Leu His Leu
    30                  35                  40

tcc aat ggt tag cac ttg cag ctg ttg cag ttg gga ttc ctc caa tta         192
Ser Asn Gly     His Leu Gln Leu Leu Gln Leu Gly Phe Leu Gln Leu
    45                  50                  55

ttt tta gag gtg tgg ctg ccg tgc gaa acc tca ctc ttg aca tcg aca         240
Phe Leu Glu Val Trp Leu Pro Cys Glu Thr Ser Leu Leu Thr Ser Thr
    60                  65                  70

ttc ttg ttt taa tag cag                                                258
Phe Leu Phe         Gln
75
```

<210> 8
<211> 3861
<212> DNA
<213> Nicotiana tabacum

<220>
<221> Intron
<222> (1)..(3861)

<400> 8

```
gtactttgct tttccttttc tttcttttta acttttgaa aagcaaaaag agatactccc          60

ttttgtccca atttatatgg cggtatttaa ttaaacaaaa aaatctaaga aaaatatgaa         120

tactttaaaa atttatggtt tgaaataaat cttaggcatc taaatacaag gttaaaataa         180

taattttaaa gttaaaaaat tcaagaaaga aaggaagact tctaaaattt gtggcaagaa         240

ataaatctta gagatttgtg ttataaatca tctcactaag gctaaaataa taattttaaa         300

gttaaattac ttttaattat gaaaaggtga tagatttttg ggaaaagata gaaaagaaaa         360

ctgtgctata taaattgaga cagagagagt aatttaccat aagagtattt gaagttgatt         420

tggttataga attaacatgt gctcctactt tagctttgtg attgaaattt ggctattgct         480

ttaatttctt agctaattgg atgcttctaa tgtgatgctt gaatccttat tcttgataat         540

gctttgtgat tcattatttc attaaaaagc atgcaccata gggcatgcaa ttaaatattg         600

tatttaagaa tgcacttta actaacccac aagattggag tgggagggat gattcttggg         660

tgttagatgc taatattgga ccaccctagt gactttaaat aacgaaagca tgaaaaacaa         720

ttattggatg cttgatatac tttatgttat aatattttca ggtgacctag aactacacaa         780

ataaacttct ttttccatat tggaatagga tgatttagat ttcaagatgg aattagtgat         840

tctatcacag attatctttt atttaatgat atcaaatatg aaaagagaaa aaaaaaaggt         900
```

gtctaggaaa tagtcagaaa gatagtatga catatattat tgatacaaat taatcagctc 960
aacacaaagg ctagcatata tttaacaaat agttatagac ttgtagtgtt gtacctttag 1020
ttaagagact aaacactacc aaaaggttgc gatggagcag taggtactcc tctattgtca 1080
tccaggcgcc ttgatataaa ttaattagat cccaaaacga ggatcagata ccaaataaaa 1140
aacaaaaaga aactatcttt agtgtttgtt gatttacatg gcgtagaaaa ataaaggaca 1200
atataataaa aaccttggaa tatcagttaa gatgccttaa tttcaaatca gtggagtata 1260
ttccgacttc cgtattaatt tcgctctaat caagtctttt aaaagattaa ataatgaaaa 1320
gtttttatag tcacgaaaac attatgacca caaaattttg tcctttaagc tttttagacc 1380
ataaatttca aaaaaaaaaa tttgactgaa atatttaata ccacatattt ttaaaaaatt 1440
attttttttct tacatttagt gtcaagtaaa attagatgtg ataggaaaaa agaatttcga 1500
tttcgtctag taaggaaagt acaaaattgc ttatgtaact cgtaatatat cagaaatggt 1560
ttcccaggtg taaagcacaa acaacggagc ccacatcagt aatgtgtaaa tgtgtaacgt 1620
ttactctctt ttttttcctca aataattgca aagaaaatga ctttcctgca agtctttctt 1680
gccccttttа tagaaggtga cgttgactcg taccagattt tcttgtcata gtattaatca 1740
gtagtaatat cagtcacggc gaggtttaaa atttagtcta ttagtaacgt aaataatttt 1800
taaattgtca tatttagtta atctaaaata tcatgcaatt ttttatatca agtttgatat 1860
gttgacgtaa ataatagaac aataatttat aaacttgatt aaattgcatt gataataaat 1920
caaaatatta tttgaacgat taaaatctca cagttaattt tgcatcttgc ataaaaaaat 1980
atccatcata tttccttgat tatcatttga tgccgtctta gtttctttta aaaaaattta 2040
gaatttatat caaatatgat tttttaatta ctcgaactta caagcagact aagtttgata 2100
ttttcctaat tcaacgatat acggttacta cggaaggcat ttactagaaa tactctgaga 2160
tgttactgca attattatta ttattatttt aaaaagagaa aaaaataact tttaaagctc 2220
catgtgaaat tatgtatatt ttattatagc atgaagtgac cccatttttt atctcataaa 2280
taacattgat cccatatttt tctactgtat catcactatc atgaaaaata catctagatt 2340
actgagatgt ttattggcag tagtatctac agatacaaca gatgcttcta gttctattga 2400
tgttttcatt ttgacaaaaa tttaattgag aaagcaaaag attttgcaag aattcttagg 2460
gttttattca aaaaaaaaaa agaattctta gaaatataag ttttggcaat taaataattc 2520
cagtaattgg gaaaaaacac ttgaataggc tatagaagta aaagaaactt ctatatatta 2580
ccaggcagca gagtttccca aaatcctttt ttctaaaaaa aaaatagtag aaaatgagca 2640
atgtaatttc tttaagtaac attctctatt tagtaaaatg tccatttttc taatgaggta 2700
aaagcaatag caaataaaag aaagtttatt cctttttttc gagggtgttg ccgaccaagg 2760
cttaaataga taggaataat cacctaatta agaaaaacta cctatcaatt tttgtctcgg 2820
ttggatttca acatgatacc tcatagttct acgtacgccc acttcaatta ccactaggaa 2880
caccgtttgg tgcaggaaaa ttttggtcat aaacttcaat tttaagcctt catataaaca 2940
ataaaagagc taattagcag ttaacagtcg agttaatata gctgaataat gcagttcaac 3000

taaatatgta tggaaatggt gaaaagcaca aaggtgactt atccttaggt actttatagc 3060

tttatctttt aaaaagtagt agcaagatat gatatgattc cttgaagaag aaaaggtcac 3120

tgtgactctt tatttctatc agtacctgtt tgaataaaat tggctaagaa agttgtaaaa 3180

tggactagca ggacaagaat ctcaatttgg tgttgctta ccatctttag agtgacagca 3240

atcaaaaacc caaaaattaa ataaataata agaaaagaaa aagatgagtt attggaaagg 3300

gtaaaatgaa tgaagataag aatactccat tcagtccaaa atattaagct agcatttgga 3360

catagatttg gttgaagctt gaagaaaaga aaaaagagtt tttgaagatt atatgaaaaa 3420

taatttttga aagttaaaat tgtgttaggg aagttttgtg attcaaaaac tactctagaa 3480

ctgtttttgg gatttaaata ttttcttttc aacatgtgcc aaaaaatgat taaaatctat 3540

aaacgaacac ataattgaaa aaagctctca aattttatga ccaaacagga gcttattgtt 3600

ttggcaaatt gaatttgttt cgaaatactt gatgattaag gagagacaaa ggatagtata 3660

gacaaaaggc tattagtatt tgtaattgag gctattaaat gtctttttaa agcgatgtgc 3720

aaaaacctta aaaaagacga attatatgga ttatattaga agtagtatta aattttaatg 3780

gaacttagtg caatcatttt acaagggcat agtgttaaag ctagaaatgc tgattcttat 3840

agctggcttt gtcatgtgca g 3861

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

<220>
<221> exon
<222> (1)..(98)

<400> 9
tgg ctg gat caa ttg ttt tac acg att att ggg aag ctg gta cta ttg 48
Trp Leu Asp Gln Leu Phe Tyr Thr Ile Ile Gly Lys Leu Val Leu Leu
1 5 10 15

tct tct tat tcg cca ttg cag aat ggc tag agt caa ggg caa gtc aca 96
Ser Ser Tyr Ser Pro Leu Gln Asn Gly Ser Gln Gly Gln Val Thr
20 25 30

ag 98

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

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

<400> 10
gtttgtgaat tttcgtccct gtttaatttc cttgcacaag aaatggctag tgtacatcta 60

ctttcctagg atgacagtaa tgtgtgtttt ttttatttat tgtgatacca aaagtatgaa 120

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

gatgaataat cccatgagag ttcataaact tctgaaatgg ggaagacaaa tactctaggg 2280
cattatcact acgaaatgtg cggatagaaa ccccaaattg attttgaatt tcagcgtgga 2340
aggtctgaaa aatagaaaat agctcagacc gatttttcat caaaaatatc caagtgcacc 2400
tggaataatc atcaatgaaa ctgacaaagt agcggaatcc caaggtagaa ctgacccgac 2460
taggacccca aacatctgaa tggaccaaag taaaaggtga cgctgaggga aatgggagtg 2520
ggtatactta ccgagctgtc atgactcata ctctagagtg gacaagtgag ataaaccagg 2580
tatcattttc taaagttttg acaaactggg atgtcccaac cgtttatgta ataaatctgg 2640
tgaatcggta acaagacaag ttattaaagg aagacaagat gcgagtccat atgattttgc 2700
aaggataagg taataaaatc catctaattc atgtctgata ccaatgatcc gccccgtact 2760
atgtttctct ataaaaataa ggtcatcaag aaataaaaca gcgcatttaa gtgatttggc 2820
taagcgacta acggctatga gattaaaagg actattggga acataaagga ctgaatctaa 2880
aggtgaggaa ggaagtgggc ctgcttgacc tattgcagtt gccatggttt gagactcatt 2940
ggccattgtg actgttagaa gagattgaga atatgaatac tggtgaaaag agatttgtta 3000
ccagaaatat gatcagatgc atttgaatca atgacccaag actcaaaggt ttaagattcg 3060
gagacacaag tcacgctact atctgtttga acaatggaag ctatccctga agatgtctgt 3120
ttacatgctt tgtactgaag gaactcagta taatccgata aagaaaccat ctggattgga 3180
ttcaacgaat tggatccaac agattgtgag ttaaaggctt ctgatacgaa tgtcattata 3240
atgttgtgcc gaaaaaacaa aaaattcctg gaaattacta ttcacgccgg aaaaatataa 3300
aagtgatctg aatttgattt aaattggatg ggtatgctcg tatttgcaag gagaagacac 3360
tgccctgaag gaattttacc aaattctggc cggaaattgc ctcatgtgcg gcgtgtgggc 3420
gtcagaactt cgtcggaaaa attcttccgg cggcgcgtga gggcgcgtgt agccttttt 3480
gccagagatt ttttaatagg ttggtcgctg agctctgaac tacttcccgg tggtgttacc 3540
ttttgcacaa cactgacaga tagtatgatt cttgcggaca gacctatttt tgccggaaaa 3600
gagcttccgg ttgactgttt tcttttcccg gagtcgctgg aatttatgca ctacgataaa 3660
tttctcacgg ttgctctgat accatgtgag aatgcacggg agaaaattat tatattgatt 3720
aaagtattgt acaaccctat ttatatacag taattacata ataataggta tctacttccc 3780
gatgtgggac actaaacatg actaactact taacaaatat ggtattggaa tttagtctct 3840
ttgacataaa cgacataagc ctatgcttat cttttcttac ttttttagca atgctaaata 3900
gtaggtccta actacaaact ttatagcaca ctgaaaatta ccaaaatata gagatggcca 3960
atgaaggttt tgtctgctaa cataactctg tgtctttatt ttctcactga tattgtatat 4020
ggataaagca ttctgataaa tgaaaacctt tatggttatg tag 4063

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

<220>
<221> exon
<222> (1)..(256)

<400> 11
gct acc gcc gct atg tca tca ctg gtc aat ata gtc cct cca aca gca 48
Ala Thr Ala Ala Met Ser Ser Leu Val Asn Ile Val Pro Pro Thr Ala
1 5 10 15

gtt tta gcg gaa agc gga gaa gtc gta aat gtt gat gaa gtc aag gtg 96
Val Leu Ala Glu Ser Gly Glu Val Val Asn Val Asp Glu Val Lys Val
20 25 30

aat agc att ctt gct gtg aaa gct ggt gaa act ata cct att gat gga 144
Asn Ser Ile Leu Ala Val Lys Ala Gly Glu Thr Ile Pro Ile Asp Gly
35 40 45

gtt gta gtg gaa ggg gaa tgt gac gtg gac gag aaa aca ctg aca ggc 192
Val Val Val Glu Gly Glu Cys Asp Val Asp Glu Lys Thr Leu Thr Gly
50 55 60

gag tcg ttt cca gtt tct aag caa aga gat tca acg gtc tgg gct ggc 240
Glu Ser Phe Pro Val Ser Lys Gln Arg Asp Ser Thr Val Trp Ala Gly
65 70 75 80

gct aca aat cta aat g 256
Ala Thr Asn Leu Asn
85

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

<220>
<221> Intron
<222> (1)..(85)

<400> 12
gtagtatagt atttcttcat gcttcattta tttagtgctg aaacttcaag tattgtttgt 60

taatgttatt tgctcaattc ttcag 85

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

<220>
<221> exon
<222> (1)..(142)

<400> 13
gct ata tca gtg tta aga cta cgg ctt tgg ctg aag att gtg cgg tgg 48
Ala Ile Ser Val Leu Arg Leu Arg Leu Trp Leu Lys Ile Val Arg Trp
1 5 10 15

cta gga tgg cac agc ctg tcg aag atg ctc aga aca aga aat caa aaa 96
Leu Gly Trp His Ser Leu Ser Lys Met Leu Arg Thr Arg Asn Gln Lys
20 25 30

ccc aaa gat aca tcg aca agt gtg cta aat att ata cac cag gct a 142
Pro Lys Asp Thr Ser Thr Ser Val Leu Asn Ile Ile His Gln Ala
35 40 45

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

<220>
<221> Intron
<222> (1)..(309)

<400> 14
gtgaatctta tgttgtgcca catcaagtca aaaaatgcac gtaccgtgtg aacttgttct 60

ttgtcttatg aatcacgtca ctatcctctc ccttttcgat atgagatttc cctaaggtgt 120

catatgaatc ccttcttcgg aagcttgcca gcataggagt ctatcagtcc tttcacttga 180

cccgccctct cagcctgcct gcagtcatgg gcgtcgcact actatattgc tctttcgttt 240

aaaacttttt atttctaata cttccctgct ctttgtgtat gtctaatttc gactggtgat 300

gttttgcag 309

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

<220>
<221> exon
<222> (1)..(328)

<400> 15
caa ttg tgg cta tac cag ctt ctt tgg caa ttg ttc cta ctg cat taa 48
Gln Leu Trp Leu Tyr Gln Leu Leu Trp Gln Leu Phe Leu Leu His
1 5 10 15

gag ttc aca atc gaa atg aat ggt atc gct tgg ctt tgg tca cat tgg 96
Glu Phe Thr Ile Glu Met Asn Gly Ile Ala Trp Leu Trp Ser His Trp
20 25 30

tga gtg cat gtc cgt gtg cac tcg ttc tat cta cac cag ttg cca tgt 144
Val His Val Arg Val His Ser Phe Tyr Leu His Gln Leu Pro Cys
35 40 45

gtt gcg cac ttt caa aag cag caa cgt ccg gtc ttc tgt tta aag gag 192
Val Ala His Phe Gln Lys Gln Gln Arg Pro Val Phe Cys Leu Lys Glu
50 55 60

cag agt acc ttg aga ctc tag cta aaa tca aaa tca tgg ctt ttg aca 240
Gln Ser Thr Leu Arg Leu Leu Lys Ser Lys Ser Trp Leu Leu Thr
65 70 75

aaa cag gga cta taa cta aag gag aat tta tgg tga ccg agt tca agt 288
Lys Gln Gly Leu Leu Lys Glu Asn Leu Trp Pro Ser Ser Ser
80 85 90

ctc tga ttg atg gtt tta gtc tca ata cac tgc ttt act g 328
Leu Leu Met Val Leu Val Ser Ile His Cys Phe Thr
95 100

<210> 16
<211> 463
<212> DNA

<213> Nicotiana tabacum

<220>
<221> Intron
<222> (1)..(463)

<400> 16
gtaaaggtta ccactcatac atattctttt atgttgccaa agagaattca aaatcttaac 60

tggttatctt tcacggcaca ttgatagcga tataacatga ttgatttata tcatatattc 120

ataaaagatg aaatagggag tgccacattc acattctcat attgaagttt ctgaaatggc 180

tctaatggtt caccatagag ccaaaataac atatagacac aacgtcagcc gtctgatatt 240

caggaactta gatggaatag ttggatctta tacattgagg acacataaaa gtacttggtc 300

atataaattt tagaaatata atcaatgtat tataatctaa aattcttcaa atattcttga 360

tactgcaata caaaagcaca tggcacactg aatagaagcc ttgttcggtg gtctaaaaca 420

ttcgtttaga gtaaatactg agttgtctag tgaatatttt cag 463

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

<220>
<221> exon
<222> (1)..(203)

<400> 17
ggt ttc aag cat tga gag caa gtc agg tca tcc gat ggc aac cgc tct 48
Gly Phe Lys His Glu Gln Val Arg Ser Ser Asp Gly Asn Arg Ser
1 5 10 15

ggt gga cta tgc aca atc aaa ttc cgt tga gcc aaa gcc tga tag agt 96
Gly Gly Leu Cys Thr Ile Lys Phe Arg Ala Lys Ala Ser
20 25

tga gcg gtt tca aaa ttt tcc tgg tga agg gat att tgg aag aat tga 144
Ala Val Ser Lys Phe Ser Trp Arg Asp Ile Trp Lys Asn
30 35 40

tgg aat gga aat cta tgt cgg gaa tag gaa aat ttc ttc aag agc tgg 192
Trp Asn Gly Asn Leu Cys Arg Glu Glu Asn Phe Phe Lys Ser Trp
45 50 55

atg tac cac ag 203
Met Tyr His

<210> 18
<211> 145
<212> DNA
<213> Nicotiana tabacum

<220>
<221> Intron
<222> (1)..(145)

<400> 18
gtaaatggtt gaatcatttc ttatgctcat agtagagata aaacatcaga gttataatta 60

taagtatatg atttctccag ttaattttgc tgttagattt tctttgacct gtttagcact 120

aatgcggtgg atgtttgaat ttcag 145

<210> 19
<211> 203
<212> DNA
<213> Nicotiana tabacum

<220>
<221> exon
<222> (1)..(203)

<400> 19
tac cag aaa tag agg gtg ata gtt tca aag gaa agt ctg ttg gat aca 48
Tyr Gln Lys Arg Val Ile Val Ser Lys Glu Ser Leu Leu Asp Thr
1 5 10 15

tat ttt tgg gat cat ctc cag ctg gaa ttt tca gtc ttt ccg atg ttt 96
Tyr Phe Trp Asp His Leu Gln Leu Glu Phe Ser Val Phe Pro Met Phe
20 25 30

gtc gaa ttg gtg taa aag aag caa tga gag aac tga agc aga tgg gta 144
Val Glu Leu Val Lys Lys Gln Glu Asn Ser Arg Trp Val
35 40

tca aaa ccg cga tgc tta ctg gtg atc gtt atg cag ctg cca acc atg 192
Ser Lys Pro Arg Cys Leu Leu Val Ile Val Met Gln Leu Pro Thr Met
45 50 55 60

tgc agg atc ag 203
Cys Arg Ile

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

<220>
<221> Intron
<222> (1)..(619)

<400> 20
gtatattaat aattctgcat tacgctgaaa tgattataaa acccttttgga ttattgttta 60

gtcttaagaa ttttcactga actcttattg tttccttctt ctatcatcaa cattggttaa 120

acatttcatc taaatttaga gaacgtatca ccaagtaagt gctttacctt tacagggtca 180

tataaaatac ttaagacagt gtgatgtgaa gatgaaggtt aaatgttgat ctggataaac 240

caagttatta tcacaactaa tataagatat gctattgttc tccaataatt ggacgatttt 300

cggacgtacg acgtacaatt cttcacatat gaaacctaca tcagacgtac atgacacgct 360

atgtttagca taaagagtca agattagcat gatgatttaa gctgaatctg aatttcaagt 420

atctattctt gtattgtacc caggggcgga actagtgttg tgcttagagg tctcaaacat 480

tgtatttgtg ttaaaaaatt cacttcatat gtatttaaat aatttatcca gagcagtgag 540

ccatattttt tagaatccag aacccataaa ctcaaaatca tagatccacc tctgattgta 600

agtcggaaca attatgcag 619

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

<220>
<221> exon
<222> (1)..(1498)

<400> 21

```
tta ggt gga gct ttg gat gaa ttt caa gca gaa ctc cta cca gag gac  48
Leu Gly Gly Ala Leu Asp Glu Phe Gln Ala Glu Leu Leu Pro Glu Asp
1               5                  10                  15

aag gca aca atc atc aag ggt ttt cag aag gaa gct cca aca gcg atg  96
Lys Ala Thr Ile Ile Lys Gly Phe Gln Lys Glu Ala Pro Thr Ala Met
            20                  25                  30

ata ggc gac ggc ctt aat gat gct cct gca tta gca aca gct gac att 144
Ile Gly Asp Gly Leu Asn Asp Ala Pro Ala Leu Ala Thr Ala Asp Ile
        35                  40                  45

ggc atc tca atg ggc atc tct ggg tca gct ctc gct aaa gaa aca ggc 192
Gly Ile Ser Met Gly Ile Ser Gly Ser Ala Leu Ala Lys Glu Thr Gly
    50                  55                  60

cat gct ata cta atg aca aat gac atc gga aga ata ccg aaa gct gca 240
His Ala Ile Leu Met Thr Asn Asp Ile Gly Arg Ile Pro Lys Ala Ala
65                  70                  75                  80

cgt ctt gct aga aga gtt cga agg aag att gtt gag aat atg att ata 288
Arg Leu Ala Arg Arg Val Arg Arg Lys Ile Val Glu Asn Met Ile Ile
                85                  90                  95

tca gcc gtt aca aag gct gcc ata gtt gca ttg gca ata gca ggt tat 336
Ser Ala Val Thr Lys Ala Ala Ile Val Ala Leu Ala Ile Ala Gly Tyr
            100                 105                 110

cca ttg gtt tgg gct gct gtc ctc gca gat act ggg aca tgc ttg cta 384
Pro Leu Val Trp Ala Ala Val Leu Ala Asp Thr Gly Thr Cys Leu Leu
        115                 120                 125

gtg att ttg aac agc atg cta ctt cta cga gga ggc aca cgc aga cat 432
Val Ile Leu Asn Ser Met Leu Leu Leu Arg Gly Gly Thr Arg Arg His
    130                 135                 140

ggg aaa aaa tgt tgg aga tct tct act cct tcg cat gct ccc cac cac 480
Gly Lys Lys Cys Trp Arg Ser Ser Thr Pro Ser His Ala Pro His His
145                 150                 155                 160

aaa gac aaa gct tca tgt tgc aag tcg gaa aat gct ccc cag ctg tgt 528
Lys Asp Lys Ala Ser Cys Cys Lys Ser Glu Asn Ala Pro Gln Leu Cys
                165                 170                 175

tgc tct gat att gag tca caa aag aaa tgt aca agt caa tca tgc tcg 576
Cys Ser Asp Ile Glu Ser Gln Lys Lys Cys Thr Ser Gln Ser Cys Ser
            180                 185                 190

tcc gag gtg tgt gtt cca aga tgt caa cct gtc tcc tcg gga tca aag 624
Ser Glu Val Cys Val Pro Arg Cys Gln Pro Val Ser Ser Gly Ser Lys
        195                 200                 205

tca tgt gga aat aat cag tgc cca gac tcc att gaa aat agt ggt ttt 672
Ser Cys Gly Asn Asn Gln Cys Pro Asp Ser Ile Glu Asn Ser Gly Phe
    210                 215                 220
```

```
cat tct cat cgc cgt cct caa tgc tgc tcg tcg aag atg gct gct aaa        720
His Ser His Arg Arg Pro Gln Cys Cys Ser Ser Lys Met Ala Ala Lys
225                 230                 235                 240

gca tgc caa tct gca gtt tca gaa tca aag tca tgc gga aat aat cag        768
Ala Cys Gln Ser Ala Val Ser Glu Ser Lys Ser Cys Gly Asn Asn Gln
                245                 250                 255

tgc cca gac tcc gtt gaa aat agt ggt ttt cat tct cat ccc cgt cct        816
Cys Pro Asp Ser Val Glu Asn Ser Gly Phe His Ser His Pro Arg Pro
            260                 265                 270

gaa tgc tgc tcg tcg aag atg gct gct aaa gcg tgc caa tct gca gtt        864
Glu Cys Cys Ser Ser Lys Met Ala Ala Lys Ala Cys Gln Ser Ala Val
        275                 280                 285

tca gaa tca aag tca tgt gga aat aat cag tgc cca gac tcc gtt gga        912
Ser Glu Ser Lys Ser Cys Gly Asn Asn Gln Cys Pro Asp Ser Val Gly
    290                 295                 300

aat agt ggt ttt cat tct cat ccc cgt cct caa tgc tgt tca tcg aag        960
Asn Ser Gly Phe His Ser His Pro Arg Pro Gln Cys Cys Ser Ser Lys
305                 310                 315                 320

atg gct gct aaa gca ggc caa tct gca ctt tca gaa tca aag tca tgt       1008
Met Ala Ala Lys Ala Gly Gln Ser Ala Leu Ser Glu Ser Lys Ser Cys
                325                 330                 335

gga aat aac aat tgc tca gac tcc att cac aag agt aat tgt cat tct       1056
Gly Asn Asn Asn Cys Ser Asp Ser Ile His Lys Ser Asn Cys His Ser
            340                 345                 350

tta act aac tct cta gta tgt tct tcc aag atg tct gct cca caa tgt       1104
Leu Thr Asn Ser Leu Val Cys Ser Ser Lys Met Ser Ala Pro Gln Cys
        355                 360                 365

cat tct gct act tca agc aac aaa tca tgt gga agt acc aag tgc tcc       1152
His Ser Ala Thr Ser Ser Asn Lys Ser Cys Gly Ser Thr Lys Cys Ser
    370                 375                 380

gac ttc agt gat aaa aaa tgt tgt caa tcc gac aaa att cct caa gcg       1200
Asp Phe Ser Asp Lys Lys Cys Cys Gln Ser Asp Lys Ile Pro Gln Ala
385                 390                 395                 400

tgc tct acc aag aag tct gct cca ggg tgt caa tct gca gtt tct ggg       1248
Cys Ser Thr Lys Lys Ser Ala Pro Gly Cys Gln Ser Ala Val Ser Gly
                405                 410                 415

tct aaa tca tgt gga aat agc aag tgt tca gac tca aaa gac aat agt       1296
Ser Lys Ser Cys Gly Asn Ser Lys Cys Ser Asp Ser Lys Asp Asn Ser
            420                 425                 430

agc cat cct tca cat ccc gat cat caa aca tgc atg tct aag ttg tgt       1344
Ser His Pro Ser His Pro Asp His Gln Thr Cys Met Ser Lys Leu Cys
        435                 440                 445

gct cca caa agc caa tct gca act tca agc tcc agg aca tgt gga aat       1392
Ala Pro Gln Ser Gln Ser Ala Thr Ser Ser Ser Arg Thr Cys Gly Asn
    450                 455                 460

aca aag tgc tcg gac acc aat agc aag aat tct tgt tat tca caa acc       1440
Thr Lys Cys Ser Asp Thr Asn Ser Lys Asn Ser Cys Tyr Ser Gln Thr
465                 470                 475                 480

aac tct gaa tca tgc tct tca aag atg tct ggt cca tca tgc aaa act       1488
Asn Ser Glu Ser Cys Ser Ser Lys Met Ser Gly Pro Ser Cys Lys Thr
                485                 490                 495
```

gct aat tca g 1498
Ala Asn Ser

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

<220>
<221> Intron
<222> (1)..(321)

<400> 22
gtacgaccag attcctcttc ttgttaatac ccccgaaccc aaactatagg atctaaagta 60

ttatttggcc ctctgtcgga ggatataatg gttagttaaa cctgaaatca tgtagtctat 120

gaattgcaaa tctctagcat cgtgacaaaa ttcttagatc atatacaact ttgagaatat 180

aggctgtcac agacccttct tcatactgca ttagaggaga gcagccaatt ttttattcat 240

gatttgaaac aaataaagtt cttcttgagg tgtatggaga ggctatgaga atcatttgct 300

gagtaggttt gagattttca g 321

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

<220>
<221> exon
<222> (1)..(333)

<400> 23
gtt caa ggt cat gca gaa ata aga agt gcc agg act ctg caa ccg aga 48
Val Gln Gly His Ala Glu Ile Arg Ser Ala Arg Thr Leu Gln Pro Arg
1 5 10 15

aca gtt ttc att cac cac tta cta atc cac tca gtg ggg aaa agc ttt 96
Thr Val Phe Ile His His Leu Leu Ile His Ser Val Gly Lys Ser Phe
20 25 30

cgg agc aga aaa gct tgg att tag tcc gaa aag ata agg aat caa gtc 144
Arg Ser Arg Lys Ala Trp Ile Ser Glu Lys Ile Arg Asn Gln Val
35 40 45

atg atc ttc gtc atg gct gct ctg acg agg aac atg atc ata caa att 192
Met Ile Phe Val Met Ala Ala Leu Thr Arg Asn Met Ile Ile Gln Ile
50 55 60

tag aca agg cat atg aca gtt gtg cct tac aag aat gtt gtt att cgg 240
Thr Arg His Met Thr Val Val Pro Tyr Lys Asn Val Val Ile Arg
65 70 75

ttc aag gca ata aaa ctg atg tat cag aaa ctg gaa tcc agg aaa ctg 288
Phe Lys Ala Ile Lys Leu Met Tyr Gln Lys Leu Glu Ser Arg Lys Leu
80 85 90

ctc att gtg aca gca cca atc aaa cat gcc aaa ctg caa gtt cag 333
Leu Ile Val Thr Ala Pro Ile Lys His Ala Lys Leu Gln Val Gln
95 100 105

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

<220>
<221> Intron
<222> (1)..(220)

<400> 24
gtaggcacta ccaaatcata tgatccaaag tgctcctcca ccttcactcc tacaataaat 60

gttcgatcaa acttcataag aagatagcat atgcatcgca aatctctaaa aaaatgatgg 120

ataatgttac tcaccaacta gtttgagata gaagtttaac tgattgctat atatcgttaa 180

ctataaaaaa ctacttgtta attagagctg agattttcag 220

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

<220>
<221> exon
<222> (1)..(774)

<400> 25
gat cga tga cat gcg gaa atg ata aga tcc tgg act ctc taa gca tcc 48
Asp Arg His Ala Glu Met Ile Arg Ser Trp Thr Leu Ala Ser
1 5 10

atg gtt gtc att cgc atg ata atc cac tcc acg agg aga aca acc tgg 96
Met Val Val Ile Arg Met Ile Ile His Ser Thr Arg Arg Thr Thr Trp
15 20 25 30

agc aga aaa tct tgg atg ttg ttg gag aag gta taa aat cac ctc atg 144
Ser Arg Lys Ser Trp Met Leu Leu Glu Lys Val Asn His Leu Met
35 40 45

ctg tcg gtc atg gct gtt cgg aca agg aac acg atc act cac atc cag 192
Leu Ser Val Met Ala Val Arg Thr Arg Asn Thr Ile Thr His Ile Gln
50 55 60

aaa agg cat atg aca gtt gtg caa cag atg att gtt gtt ttt cag ttc 240
Lys Arg His Met Thr Val Val Gln Gln Met Ile Val Val Phe Gln Phe
65 70 75

aag tcc atg gca ttg acg acg tat caa aaa gtg aaa ttc aag aaa ctg 288
Lys Ser Met Ala Leu Thr Thr Tyr Gln Lys Val Lys Phe Lys Lys Leu
80 85 90

ctc att gtg aca gca caa agc aga gca tgg tca tct cca gca gct gca 336
Leu Ile Val Thr Ala Gln Ser Arg Ala Trp Ser Ser Pro Ala Ala Ala
95 100 105

aac atg aac caa aag atc agg taa atc act gtg gac ttc act cta aaa 384
Asn Met Asn Gln Lys Ile Arg Ile Thr Val Asp Phe Thr Leu Lys
110 115 120

cta ctc caa ctg atg aag aac tag cca agc tgg tta gaa gat gct gcg 432
Leu Leu Gln Leu Met Lys Asn Pro Ser Trp Leu Glu Asp Ala Ala
125 130 135

aat aca aac cat gcc acg acg tcc gtt ctg gct gca gga agc atg ctg 480
Asn Thr Asn His Ala Thr Thr Ser Val Leu Ala Ala Gly Ser Met Leu

```
140                 145                 150                 155

cag aat gtg gtc caa ccg ttc gat caa cta tca ata tct tac ggg aca      528
Gln Asn Val Val Gln Pro Phe Asp Gln Leu Ser Ile Ser Tyr Gly Thr
                160                 165                 170

acc atc atc att acc tag act gca gtg gtc gta agg ttt gtt cgc tgt      576
Thr Ile Ile Ile Thr     Thr Ala Val Val Val Arg Phe Val Arg Cys
            175                 180                 185

tgg aga aga gac aca tcg gtg gat gct gtg aca gct tca gaa aag aat      624
Trp Arg Arg Asp Thr Ser Val Asp Ala Val Thr Ala Ser Glu Lys Asn
            190                 195                 200

gtt gtg cca aga aga acc acc ttg gag caa gtt tcg gag gag gtt tat      672
Val Val Pro Arg Arg Thr Thr Leu Glu Gln Val Ser Glu Glu Val Tyr
        205                 210                 215

cag aaa ttg tca tag agt aga tgc aat ccg aag tgt aca tat gtt gta      720
Gln Lys Leu Ser     Ser Arg Cys Asn Pro Lys Cys Thr Tyr Val Val
    220                 225                 230

aac ttc cta cct att tta tct tca aga agt tga gct gct aat ttg aac      768
Asn Phe Leu Pro Ile Leu Ser Ser Arg Ser     Ala Ala Asn Leu Asn
    235                 240                 245

aaa gca                                                             774
Lys Ala
    250
```

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

<220>
<221> Intron
<222> (1)..(498)

<400> 26
agggcgaatt ctgcagatat ccatcacact ggcggccgct cgagcatgca tctagagggc 60

ccaattcgcc ctatagtgag tcgtattaca attcactggc cgtcgtttta caacgtcgtg 120

actgggaaaa ccctggcgtt acccaactta atcgccttgc agcacatccc cctttcgcca 180

gctggcgtaa tagcgaagag gcccgcaccg atcgcccttc ccaacagttg cgcagcctat 240

acgtacggca gtttaaggtt tacacctata aaagagagag ccgttatcgt ctgtttgtgg 300

atgtacagag tgatattatt gacacgccgg ggcgacggat ggtgatcccc ctggccagtg 360

cacgtctgct gtcagataaa gtctcccgtg aactttaccc ggtggtgcat atcggggatg 420

aaagctggcg catgatgacc accgatatgg ccagtgtgcc ggtctccgtt atcggggaag 480

aagtggctga tctcagcc 498

<210> 27
<211> 303
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse Complementary Sequence of Exon 1

<400> 27
caatttgttg cggagaaatg agaagagaat catgaataac aatgacagtc tttgttgtga 60

caattactga aacctcttta acccccttcaa gattcttgag aatttttttca actagaacaa 120

cttctgaagt acagcaaatt cccaaaacat caaaatagct cttgctcaac ttctttgttt 180

cattcatttt ttcactttcc accatttttc tccttctcta aggaggagga gaagataata 240

gatgaaaaag gaatttctag ttctggaata tattggatat acttttgttt tggaaagagg 300

tga 303

<210> 28
<211> 258
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse Complementary Sequence of Exon 2

<400> 28
ctgctattaa aacaagaatg tcgatgtcaa gagtgaggtt tcgcacggca gccacacctc 60

taaaaataat tggaggaatc ccaactgcaa cagctgcaag tgctaaccat tggaaaggtg 120

caaaaaagta cttcaaagat gagagtccaa gcaatatttc actgccaatt gcaaatggac 180

ttggccattt cttttggtag ttttttctctc ctttcactct tatgcttgct tctaatcttg 240

cttgattcaa tgctttaa 258

<210> 29
<211> 98
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse Complementary Sequence of Exon 3

<400> 29
cttgtgactt gcccttgact ctagccattc tgcaatggcg aataagaaga caatagtacc 60

agcttcccaa taatcgtgta aaacaattga tccagcca 98

<210> 30
<211> 256
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse Complementary Sequence of Exon 4

<400> 30
catttagatt tgtagcgcca gcccagaccg ttgaatctct ttgcttagaa actggaaacg 60

actcgcctgt cagtgttttc tcgtccacgt cacattcccc ttccactaca actccatcaa 120

taggtatagt ttcaccagct ttcacagcaa gaatgctatt caccttgact tcatcaacat 180

ttacgacttc tccgctttcc gctaaaactg ctgttggagg gactatattg accagtgatg 240

acatagcggc ggtagc 256

<210> 31

<211> 142
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse Complementary Sequence of Exon 5

<400> 31
tagcctggtg tataatattt agcacacttg tcgatgtatc tttgggtttt tgatttcttg 60

ttctgagcat cttcgacagg ctgtgccatc ctagccaccg cacaatcttc agccaaagcc 120

gtagtcttaa cactgatata gc 142

<210> 32
<211> 328
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse Complementary Sequence of Exon 6

<400> 32
cagtaaagca gtgtattgag actaaaacca tcaatcagag acttgaactc ggtcaccata 60

aattctcctt tagttatagt ccctgttttg tcaaaagcca tgattttgat tttagctaga 120

gtctcaaggt actctgctcc tttaaacaga agaccggacg ttgctgcttt tgaaagtgcg 180

caacacatgg caactggtgt agatagaacg agtgcacacg gacatgcact caccaatgtg 240

accaaagcca agcgatacca ttcatttcga ttgtgaactc ttaatgcagt aggaacaatt 300

gccaaagaag ctggtatagc cacaattg 328

<210> 33
<211> 203
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse Complementary Sequence of Exon 7

<400> 33
ctgtggtaca tccagctctt gaagaaattt tcctattccc gacatagatt tccattccat 60

caattcttcc aaatatccct tcaccaggaa aattttgaaa ccgctcaact ctatcaggct 120

ttggctcaac ggaatttgat tgtgcatagt ccaccagagc ggttgccatc ggatgacctg 180

acttgctctc aatgcttgaa acc 203

<210> 34
<211> 203
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse Complementary Sequence of Exon 8

<400> 34
ctgatcctgc acatggttgg cagctgcata acgatcacca gtaagcatcg cggttttgat 60

acccatctgc ttcagttctc tcattgcttc ttttacacca attcgacaaa catcggaaag 120

actgaaaatt ccagctggag atgatcccaa aaatatgtat ccaacagact ttcctttgaa 180

actatcaccc tctatttctg gta 203

<210> 35
<211> 1498
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse Complementary Sequence of Exon 9

<400> 35
ctgaattagc agttttgcat gatggaccag acatctttga agagcatgat tcagagttgg 60
tttgtgaata acaagaattc ttgctattgg tgtccgagca ctttgtattt ccacatgtcc 120
tggagcttga agttgcagat tggctttgtg gagcacacaa cttagacatg catgtttgat 180
gatcgggatg tgaaggatgg ctactattgt cttttgagtc tgaacacttg ctatttccac 240
atgatttaga cccagaaact gcagattgac accctggagc agacttcttg gtagagcacg 300
cttgaggaat tttgtcggat tgacaacatt ttttatcact gaagtcggag cacttggtac 360
ttccacatga tttgttgctt gaagtagcag aatgacattg tggagcagac atcttggaag 420
aacatactag agagttagtt aaagaatgac aattactctt gtgaatggag tctgagcaat 480
tgttatttcc acatgacttt gattctgaaa gtgcagattg gcctgcttta gcagccatct 540
tcgatgaaca gcattgagga cggggatgag aatgaaaacc actatttcca acggagtctg 600
ggcactgatt atttccacat gactttgatt ctgaaactgc agattggcac gctttagcag 660
ccatcttcga cgagcagcat tcaggacggg gatgagaatg aaaaccacta ttttcaacgg 720
agtctgggca ctgattattt ccgcatgact ttgattctga aactgcagat tggcatgctt 780
tagcagccat cttcgacgag cagcattgag gacggcgatg agaatgaaaa ccactatttt 840
caatggagtc tgggcactga ttatttccac atgactttga tccgaggag acaggttgac 900
atcttggaac acacacctcg gacgagcatg attgacttgt acatttcttt tgtgactcaa 960
tatcagagca acacagctgg ggagcatttt ccgacttgca acatgaagct ttgtctttgt 1020
ggtggggagc atgcgaagga gtagaagatc tccaacattt tttcccatgt ctgcgtgtgc 1080
ctcctcgtag aagtagcatg ctgttcaaaa tcactagcaa gcatgtccca gtatctgcga 1140
ggacagcagc ccaaaccaat ggataacctg ctattgccaa tgcaactatg gcagcctttg 1200
taacggctga tataatcata ttctcaacaa tcttccttcg aactcttcta gcaagacgtg 1260
cagctttcgg tattcttccg atgtcatttg tcattagtat agcatggcct gtttctttag 1320
cgagagctga cccagagatg cccattgaga tgccaatgtc agctgttgct aatgcaggag 1380
catcattaag gccgtcgcct atcatcgctg ttggagcttc cttctgaaaa cccttgatga 1440
ttgttgcctt gtcctctggt aggagttctg cttgaaattc atccaaagct ccacctaa 1498

<210> 36
<211> 333
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse Complementary Sequence of Exon 10

<400> 36
ctgaacttgc agtttggcat gtttgattgg tgctgtcaca atgagcagtt tcctggattc 60

cagtttctga tacatcagtt ttattgcctt gaaccgaata acaacattct tgtaaggcac 120

aactgtcata tgccttgtct aaatttgtat gatcatgttc ctcgtcagag cagccatgac 180

gaagatcatg acttgattcc ttatcttttc ggactaaatc caagcttttc tgctccgaaa 240

gcttttcccc actgagtgga ttagtaagtg gtgaatgaaa actgttctcg gttgcagagt 300

cctggcactt cttatttctg catgaccttg aac 333

<210> 37
<211> 774
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse Complementary Sequence of Exon 11

<400> 37
tgctttgttc aaattagcag ctcaacttct tgaagataaa ataggtagga agtttacaac 60

atatgtacac ttcggattgc atctactcta tgacaatttc tgataaacct cctccgaaac 120

ttgctccaag gtggttcttc ttggcacaac attcttttct gaagctgtca cagcatccac 180

cgatgtgtct cttctccaac agcgaacaaa ccttacgacc actgcagtct aggtaatgat 240

gatggttgtc ccgtaagata ttgatagttg atcgaacggt tggaccacat tctgcagcat 300

gcttcctgca gccagaacgg acgtcgtggc atggtttgta ttcgcagcat cttctaacca 360

gcttggctag ttcttcatca gttggagtag ttttagagtg aagtccacag tgatttacct 420

gatcttttgg ttcatgtttg cagctgctgg agatgaccat gctctgcttt gtgctgtcac 480

aatgagcagt ttcttgaatt tcacttttta atacgtcgtc aatgccatgg acttgaactg 540

aaaaacaaca atcatctgtt gcacaactgt catatgcctt ttctggatgt gagtgatcgt 600

gttccttgtc cgaacagcca tgaccgacag catgaggtga ttttatacct tctccaacaa 660

catccaagat tttctgctcc aggttgttct cctcgtggag tggattatca tgcgaatgac 720

aaccatggat gcttagagag tccaggatct tatcatttcc gcatgtcatc gatc 774

<210> 38
<211> 260
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sense Sequence Transgene Construct

<400> 38
atttgtagtg ccagcccaga ccgttgaatc tatttgctta gaaactggaa acgactcgcc 60

tgtcagtgtt ttctcgtcca cgtcacattc cccttccatt acaactccat caataggtat 120

agtttcacca gctttaacag caagaatgct attcaacttg acttcatcaa catttacgac 180

ttctccactt tcagctaaaa ctgctgttgg agggactata ttgaccagtg atgacatagc 240

agcagtagcc tacataacca 260

<210> 39
<211> 96
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Spacer Sequence Transgene Construct

<400> 39
agcctgaaga attgagcaaa taacattaac aaacaatact tgaagtttca gcactaaata 60

aatgaagcat gaaggaatac tacactacca tttaga 96

<210> 40
<211> 260
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse Complement Sequence Transgene Construct

<400> 40
tggttatgta ggctactgct gctatgtcat cactggtcaa tatagtccct ccaacagcag 60

ttttagctga aagtggagaa gtcgtaaatg ttgatgaagt caagttgaat agcattcttg 120

ctgttaaagc tggtgaaact atacctattg atggagttgt aatggaaggg gaatgtgacg 180

tggacgagaa aacactgaca ggcgagtcgt ttccagtttc taagcaaata gattcaacgg 240

tctgggctgg cactacaaat 260

<210> 41
<211> 616
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> RNAi sequence

<400> 41
atttgtagtg ccagcccaga ccgttgaatc tatttgctta gaaactggaa acgactcgcc 60

tgtcagtgtt ttctcgtcca cgtcacattc cccttccatt acaactccat caataggtat 120

agtttcacca gctttaacag caagaatgct attcaacttg acttcatcaa catttacgac 180

ttctccactt tcagctaaaa ctgctgttgg agggactata ttgaccagtg atgacatagc 240

agcagtagcc tacataacca agcctgaaga attgagcaaa taacattaac aaacaatact 300

tgaagtttca gcactaaata aatgaagcat gaaggaatac tacactacca tttagatggt 360

tatgtaggct actgctgcta tgtcatcact ggtcaatata gtccctccaa cagcagtttt 420

agctgaaagt ggagaagtcg taaatgttga tgaagtcaag ttgaatagca ttcttgctgt 480

taaagctggt gaaactatac ctattgatgg agttgtaatg gaaggggaat gtgacgtgga 540

cgagaaaaca ctgacaggcg agtcgtttcc agtttctaag caaatagatt caacggtctg 600

ggctggcact acaaat 616

<210> 42
<211> 192
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sense Sequence Transgene Construct

<400> 42
tgagagcaag tcaggtcatc cgatggcagc cgctctggtg gactatgcac aatcaaattc 60

cgttgagcca aagcctgata gagttgagca gtttcaaaat tttcctggtg aagggatatt 120

tggaagaatt gatggaatgg aaatctatgt cgggaatagg aaaatttctt caagagctgg 180

atgtaccaca gg 192

<210> 43
<211> 138
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Space Sequence Transgene Construct

<400> 43
taaatggttg aatcatttct tatgctcata gtagagataa aacatcagag ttataattat 60

aagtatatga tttctccagt taattttgct gttagatttt ctttgacctg tttagcacta 120

atgcggtgga tgtttgaa 138

<210> 44
<211> 196
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse Complementary Sequence Transgene Construct

<400> 44
cctgtggtac atccagctct tgaagaaatt ttcctattcc cgacatagat ttccattcca 60

tcaattcttc caaatatccc ttcaccagga aaattttgaa actgctcaac tctatcaggc 120

tttggctcaa cggaatttga ttgtgcatag tccaccagag cggctgccat cggatgacct 180

gacttgctct caatgc 196

<210> 45
<211> 526
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> RNAi Sequence

<400> 45
tgagagcaag tcaggtcatc cgatggcagc cgctctggtg gactatgcac aatcaaattc 60

cgttgagcca aagcctgata gagttgagca gtttcaaaat tttcctggtg aagggatatt 120

tggaagaatt gatggaatgg aaatctatgt cgggaatagg aaaatttctt caagagctgg 180

atgtaccaca ggtaaatggt tgaatcattt cttatgctca tagtagagat aaaacatcag 240

agttataatt ataagtatat gatttctcca gttaattttg ctgttagatt ttctttgacc 300
tgtttagcac taatgcggtg gatgtttgaa cctgtggtac atccagctct tgaagaaatt 360
ttcctattcc cgacatagat ttccattcca tcaattcttc caaatatccc ttcaccagga 420
aaatttttgaa actgctcaac tctatcaggc tttggctcaa cggaatttga ttgtgcatag 480
tccaccagag cggctgccat cggatgacct gacttgctct caatgc 526

<210> 46
<211> 4392
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse Complement Sequence

<400> 46
acgaaacaag tttaatcgtc gagttgaaga acttctattt tatccatcct tcaaatgttg 60
tatacatgtg aagcctaacg tagatgagat actgttaaag actatttgga ggaggttttg 120
aacgaggttc cacaaaaaag aaccgtgttg taagaaaaga cttcgacagt gtcgtaggtg 180
gctacacaga gaagaggttg tcgcttgttt ggaatgctgg tgacgtcaga tccattacta 240
ctaccaacag ggcattctat aactaccaac tagcttgcca acctggtgta agacgtcgta 300
cgaaggacgt cggtcttgcc tgcagcaccg taccaaacat aaacgtcgta gaagattggt 360
cgaaccgatc aagaagtagt caacctcatc aaaatctcac ttcaggtgtc actaaatgga 420
ctagaaaacc aagtacaaac gtcgacgacc tctactggta cgagacgaaa cacgacagtg 480
ttactcgtca aagaacttaa agtgaaaaac tatgcagcag ttacggtacc tgaacttgac 540
tttttgttgt tagtagacaa cgtgttgaca gtatacggaa aagacctaca ctcactagca 600
caaggaacag gcttgtcggt actggctgtc gtactccact aaaatatgga agaggttgtt 660
gtaggttcta aaagacgagg ttcaacaaga ggagcacctc acctaatagt acgcttactg 720
ttggtaccta cgaatctctc aggtcctaga atagtaaagg cgtacagtag ctaggacttg 780
aacgtcaaac cgtacaaact aaccacgaca gtgttactcg tcaaaggacc taaggtcaaa 840
gactatgtag tcaaaataac ggaacttggc ttattgttgt aagaacattc cgtgttgaca 900
gtatacggaa cagatttaaa catactagta cagggagcag tctcgtcggt actgcttcta 960
gtactgaact aaggaataga aaagcctgat ttaggttcga aaagacgagg ctttcgaaaa 1020
ggggtgactc acctaatcat tcaccactta cttttgacaa gagccaacgt ctcaggaccg 1080
tgaagaataa agacgtactg gaacttggac ttaatcgtca aaacgtacta cctggtctgt 1140
agaaacttct cgtactaagt ctcaaccaaa cacttattgt tcttaagaac gataaccaca 1200
ggctcgtgaa acataaaggt gtacaggacc tcgaacttca acgtctaacc gaaacacctc 1260
gtgtgttgaa tctgtacgta caaactacta gccctacact tcctaccgat gataacagaa 1320
aactcagact tgtgaacgat aaaggtgtac taaatctggg tctttgacgt ctaactgtag 1380
gacctcgtct gaagaaccat ctcgtgcaaa ctccttaaaa cagcctaact gttgtaaaaa 1440

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

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

<210> 47
<211> 4011
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sense Sequence

<400> 47
acgacggcca gtgaattgta atacgactca ctatagggcg aattgggccc tctagatgca 60
tgctcgagcg gccgccagtg tgatggatat ctgcagaatt cgcccttgag gaaacataga 120
aagaagagaa tggtggaaag tgagaaaatg aatgacacaa agaatctgag caagagctat 180
tttgatgttt tgggaatttg ctgtacttca gaagttgttc ttgttgaaaa aattctcaag 240
aatcttgaag gggttaaaga ggtttcagta attgtcacaa caaagactgt cattgttatt 300
catgattctc tcctcatttc tcagcaacaa attgttaaag cattgaatca agcaagatta 360
gaagcaagta taagagtgaa aggagagaaa aactaccaaa agaaatggcc aagtccattt 420
gcaattggca gtggaatatt gcttggactc tcatttttga agtacttttt tgcacctttc 480
caatggttag cacttgcagc tgttgcagtt gggattcctc caattatttt taggggtgtg 540
gctgccgtgc gaaacctcac tcttgacatc aacattcttg ttttaatagc agtgacggga 600
tcaattgttt tacacgatta ttgggaagct gatactattg tcttcttatt caccattgca 660
gaatggctag agtcaagggc aagtcacaag gctactgctg ctatgtcatc actggtcaat 720
atagtcgctc caacagcagt tttagctgaa agtggagaag tcgtaaatgt tgatgaagtc 780
aagttgaata gcattcttgc tgttaaagct ggtgaaacta tacctattga tggagttgta 840

atggaagggg aatgtgacgt ggacgagaaa acactgacag gcgagtcgtt tccagtttct 900

aagcaaatag attcaacggt ctgggctggc actacaaatc taaatggcta tatcagtgtt 960

aagactacgg ctttggctga agattgtgcg gtggctagga tggcgcagct tgtcgaagat 1020

gctcagaaca agaaatcaaa aacccaaaga tacattgaca agtgtgctaa atattataca 1080

ccagcaattg tggctatatc agcttctttg gcaatagttc ctactgcatt aagagttcac 1140

aatcgaaatg agtggtatcg cttggctttg gtcacgttgg tgagtgcatg tccgtgtgca 1200

cttgtgctat ctacaccagt tgccatgtgt tgtgcacttt ctaaagcagc aacgtccggt 1260

cttctgttta aaggagcaga gtaccttgag actcttgcta aaatcaaaat catggctttt 1320

gacaaaacag ggactataac tagaggagaa tttatggtga ccgagttcaa gtctctggtt 1380

gatggtcttg gtctcaatac actgctttac tgggtttcaa gtattgagag caagtcaggt 1440

catccgatgg cagccgctct ggttgactat gcacaatcaa attccgttga gccaaagcct 1500

gatagagttg agcagtttca aaatttttct ggtgaaggga tatttggaag aattgatgga 1560

atggaaatct atgtcgggaa taggaaaatt tcttcaagag ctggatgtac tacagtacca 1620

gaaatagagg gtgatagttt ccaaggaaag tctgttggat acatattttt gggatcatct 1680

cccgctggaa ttttcggtct ttccgatgtt tgtcgaattg gtgtaaaaga agcaatgaga 1740

gagctgaagc agatgggtat caaaaccgcg atgcttactg gtgattgtta tgcagctgcc 1800

aaccatgtgc aggatcagtt aggtggagct atggatgaat ttcaagcgga actcttacca 1860

gaggacaagg caacaatcat caagggtttt cagaaggaag ctccaacagc gatgataggc 1920

gacggcctta atgatgctcc tgcattagca acagctgaca ttggcatctc aatgggcatc 1980

tctgggtcag ctctcgcgaa agaaacaggc catgttatac taatgacaaa tgacatcgga 2040

agaataccaa aagctgcacg tcttgctaga agagttcgaa ggaagattgt tgagaatatg 2100

attatatcag tcgttacaaa ggccgccata gttgcattgg caatagcagg ttatccattg 2160

gtttgggctg ctgtcctcgc ggatactggg acatgcttgc tagtgatctt gaacagcatg 2220

ctacttctac gagtaggcac acacagacat gggaaaaaat gttgtagatc tgctactcct 2280

tcgcatgctc ccaaccacaa agacaaagct tcttgttgca agtcggaaaa tgctccgcag 2340

ctgtgttgct ctgatattga gtcacaaaag aaatgtacga gtcaatcatg ctcgtccgag 2400

gtgtgtgttc caagatgcca acctgtctcc tcgggatcaa agtcatgtgg aaataatcag 2460

tgcccagact ccgttgaaaa tagtggtttt cattctcatc cccgtcctct agtatgttct 2520

tccaagatgt ctgctccaca atgtcattct gccacttcaa gctccaaatc atgtggaagt 2580

accaagtgct ccaacttcag tgacaaaaaa tgttgccaat atgacaaaat tcctcaaacg 2640

tgctctacca agaagtctgc tccaggatgt caatctgcag tttctgggtc taaatcatgt 2700

ggagatagca agtgttcaga ctcgaaagac aatagtagcc atccttcaca tcccgatcat 2760

caaatatgca cgtctaagtt gtgtgctcca caaagccaat ctgcaacttc aagctccagg 2820

acatgtggaa atatgaagtg ctcggacacc aatagcaaga attcttgtta ttcacatacc 2880

aactctgaat catgctcttc aaagatgtct ggtccagcat gcaaaactgc taattcaggt 2940

tcaaggttat gcggaaataa gaagtgccta gactctgcaa acgagaacag ttttcattca 3000
cttactaatc cactctgtga ggaaaagctt ttggagaagg aaagcttgga tttagcccga 3060
aaagataggg aatcaaatca tgatcttagt catggttact ctgacgagga acatgatcat 3120
ctaaatttag acaaggcaca tgacagttgt gccttacaag aatgttgtta ttctgttcaa 3180
ggcaataaaa ctgatgtatc agaaactgga atccaggaag ctgctcattg tgacagcatc 3240
aatcaaacat gccaaactgc aatttcagga tcaatgacat gcggaaataa taagagtctg 3300
gactctctaa gcatccatgg ttgtcattca catgatagtc cactccacaa ggagagcaac 3360
ttggagcaga aaagcttgga tgttgctgga gaaggtataa aatcacctca tgctgtcggt 3420
caaggctgtt cggacaagga gcacaatcac tcgcatccag aaaaggcgta tgacagttgt 3480
gcaacagacg attgttgttt ttcagttcaa gtccatggca ttgacgacgt atcaagaagt 3540
gaaattcaag aaactgctca ttgtgacagc acaaaacaga gcacggtcat ccccagcagc 3600
tgcgaacatg aaccaaaaga tcaggtaaat cactgtggat ctcactctaa aagtattcca 3660
actgatgaag aactagccaa gctggttaga agatgctgca aatacaaacc atgccacgat 3720
gtccgctctg gctgcaggaa gcatgctgca gaatgtggtc caaccgttcg atcaaccatc 3780
aatatcttac gggacaacca tcatcatcat ctagactgca gtggtcgtaa ggtttgttcg 3840
ctgttggaga agagacacat tggtggatgc tgtgacagct tcagaaaaga atgttgtgcc 3900
aagaacaatc accttggagc aagttttgga ggaggtttat cagaaattgt caaagggcga 3960
attccagcac actggcggcc gttactagtg gatccgagct cggtaccaag c 4011

<210> 48
<211> 4011
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse Complement Sequence

<400> 48
gcttggtacc gagctcggat ccactagtaa cggccgccag tgtgctggaa ttcgcccttt 60
gacaatttct gataaacctc ctccaaaact tgctccaagg tgattgttct tggcacaaca 120
ttcttttctg aagctgtcac agcatccacc aatgtgtctc ttctccaaca gcgaacaaac 180
cttacgacca ctgcagtcta gatgatgatg atggttgtcc cgtaagatat tgatggttga 240
tcgaacggtt ggaccacatt ctgcagcatg cttcctgcag ccagagcgga catcgtggca 300
tggtttgtat ttgcagcatc ttctaaccag cttggctagt tcttcatcag ttggaatact 360
tttagagtga gatccacagt gatttacctg atcttttggt tcatgttcgc agctgctggg 420
gatgaccgtg ctctgttttg tgctgtcaca atgagcagtt tcttgaattt cacttcttga 480
tacgtcgtca atgccatgga cttgaactga aaaacaacaa tcgtctgttg cacaactgtc 540
atacgccttt tctggatgcg agtgattgtg ctccttgtcc gaacagcctt gaccgacagc 600
atgaggtgat tttatacctt ctccagcaac atccaagctt ttctgctcca agttgctctc 660

cttgtggagt ggactatcat gtgaatgaca accatggatg cttagagagt ccagactctt 720
attatttccg catgtcattg atcctgaaat tgcagtttgg catgtttgat tgatgctgtc 780
acaatgagca gcttcctgga ttccagtttc tgatacatca gttttattgc cttgaacaga 840
ataacaacat tcttgtaagg cacaactgtc atgtgccttg tctaaattta gatgatcatg 900
ttcctcgtca gagtaaccat gactaagatc atgatttgat tccctatctt ttcgggctaa 960
atccaagctt tccttctcca aaagcttttc ctcacagagt ggattagtaa gtgaatgaaa 1020
actgttctcg tttgcagagt ctaggcactt cttatttccg cataaccttg aacctgaatt 1080
agcagttttg catgctggac cagacatctt tgaagagcat gattcagagt tggtatgtga 1140
ataacaagaa ttcttgctat tggtgtccga gcacttcata tttccacatg tcctggagct 1200
tgaagttgca gattggcttt gtggagcaca caacttagac gtgcatattt gatgatcggg 1260
atgtgaagga tggctactat tgtctttcga gtctgaacac ttgctatctc cacatgattt 1320
agacccagaa actgcagatt gacatcctgg agcagacttc ttggtagagc acgtttgagg 1380
aattttgtca tattggcaac attttttgtc actgaagttg gagcacttgg tacttccaca 1440
tgatttggag cttgaagtgg cagaatgaca ttgtggagca gacatcttgg aagaacatac 1500
tagaggacgg ggatgagaat gaaaaccact attttcaacg gagtctgggc actgattatt 1560
tccacatgac tttgatcccg aggagacagg ttggcatctt ggaacacaca cctcggacga 1620
gcatgattga ctcgtacatt tcttttgtga ctcaatatca gagcaacaca gctgcggagc 1680
attttccgac ttgcaacaag aagctttgtc tttgtggttg ggagcatgcg aaggagtagc 1740
agatctacaa catttttttc catgtctgtg tgtgcctact cgtagaagta gcatgctgtt 1800
caagatcact agcaagcatg tcccagtatc cgcgaggaca gcagcccaaa ccaatggata 1860
acctgctatt gccaatgcaa ctatggcggc ctttgtaacg actgatataa tcatattctc 1920
aacaatcttc cttcgaactc ttctagcaag acgtgcagct tttggtattc ttccgatgtc 1980
atttgtcatt agtataacat ggcctgtttc tttcgcgaga gctgacccag agatgcccat 2040
tgagatgcca atgtcagctg ttgctaatgc aggagcatca ttaaggccgt cgcctatcat 2100
cgctgttgga gcttccttct gaaaaccctt gatgattgtt gccttgtcct ctggtaagag 2160
ttccgcttga aattcatcca tagctccacc taactgatcc tgcacatggt tggcagctgc 2220
ataacaatca ccagtaagca tcgcggtttt gataccccatc tgcttcagct ctctcattgc 2280
ttcttttaca ccaattcgac aaacatcgga aagaccgaaa attccagcgg gagatgatcc 2340
caaaaatatg tatccaacag actttccttg gaaactatca ccctctattt ctggtactgt 2400
agtacatcca gctcttgaag aaatttttct attcccgaca tagatttcca ttccatcaat 2460
tcttccaaat atcccttcac caggaaaatt ttgaaactgc tcaactctat caggctttgg 2520
ctcaacggaa tttgattgtg catagtcaac cagagcggct gccatcggat gacctgactt 2580
gctctcaata cttgaaaccc agtaaagcag tgtattgaga ccaagaccat caaccagaga 2640
cttgaactcg gtcaccataa attctcctct agttatagtc cctgttttgt caaaagccat 2700
gattttgatt ttagcaagag tctcaaggta ctctgctcct ttaaacagaa gaccggacgt 2760

tgctgcttta gaaagtgcac aacacatggc aactggtgta gatagcacaa gtgcacacgg 2820
acatgcactc accaacgtga ccaaagccaa gcgataccac tcatttcgat tgtgaactct 2880
taatgcagta ggaactattg ccaaagaagc tgatatagcc acaattgctg gtgtataata 2940
tttagcacac ttgtcaatgt atctttgggt ttttgatttc ttgttctgag catcttcgac 3000
aagctgcgcc atcctagcca ccgcacaatc ttcagccaaa gccgtagtct taacactgat 3060
atagccattt agatttgtag tgccagccca gaccgttgaa tctatttgct tagaaactgg 3120
aaacgactcg cctgtcagtg ttttctcgtc cacgtcacat tccccttcca ttacaactcc 3180
atcaataggt atagtttcac cagctttaac agcaagaatg ctattcaact tgacttcatc 3240
aacatttacg actttctcac tttcagctaa aactgctgtt ggagggacta tattgaccag 3300
tgatgacata gcagcagtag ccttgtgact tgcccttgac tctagccatt ctgcaatggt 3360
gaataagaag acaatagtat cagcttccca ataatcgtgt aaaacaattg atcccgtcac 3420
tgctattaaa acaagaatgt tgatgtcaag agtgaggttt cgcacggcag ccacaccccc 3480
aaaaataatt ggaggaatcc caactgcaac agctgcaagt gctaaccatt ggaaaggtgc 3540
aaaaaagtac ttcaaaaatg agagtccaag caatattcca ctgccaattg caaatggact 3600
tggccatttc ttttggtagt ttttctctcc tttcactctt atacttgctt ctaatcttgc 3660
ttgattcaat gctttaacaa tttgttgctg agaaatgagg agagaatcat gaataacaat 3720
gacagtcttt gttgtgacaa ttactgaaac ctctttaacc ccttcaagat tcttgagaat 3780
tttttcaaca agaacaactt ctgaagtaca gcaaattccc aaaacatcaa aatagctctt 3840
gctcagattc tttgtgtcat tcatttttctc actttccacc attctcttct ttctatgttt 3900
cctcaagggc gaattctgca gatatccatc acactggcgg ccgctcgagc atgcatctag 3960
agggcccaat tcgccctata gtgagtcgta ttacaattca ctggccgtcg t 4011

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

<400> 49

Gly Glu Leu Gly Pro Leu Asp Ala Cys Ser Ser Gly Arg Gln Cys Asp
1 5 10 15

Gly Tyr Leu Gln Asn Ser Pro Leu Arg Lys His Arg Lys Lys Arg Met
20 25 30

Val Glu Ser Glu Lys Met Asn Asp Thr Lys Asn Leu Ser Lys Ser Tyr
35 40 45

Phe Asp Val Leu Gly Ile Cys Cys Thr Ser Glu Val Val Leu Val Glu
50 55 60

Lys Ile Leu Lys Asn Leu Glu Gly Val Lys Glu Val Ser Val Ile Val
65 70 75 80

Thr Thr Lys Thr Val Ile Val Ile His Asp Ser Leu Leu Ile Ser Gln
85 90 95

Gln Gln Ile Val Lys Ala Leu Asn Gln Ala Arg Leu Glu Ala Ser Ile
100 105 110

Arg Val Lys Gly Glu Lys Asn Tyr Gln Lys Lys Trp Pro Ser Pro Phe
115 120 125

Ala Ile Gly Ser Gly Ile Leu Leu Gly Leu Ser Phe Leu Lys Tyr Phe
130 135 140

Phe Ala Pro Phe Gln Trp Leu Ala Leu Ala Ala Val Ala Val Gly Ile
145 150 155 160

Pro Pro Ile Ile Phe Arg Gly Val Ala Ala Val Arg Asn Leu Thr Leu
165 170 175

Asp Ile Asn Ile Leu Val Leu Ile Ala Val Thr Gly Ser Ile Val Leu
180 185 190

His Asp Tyr Trp Glu Ala Asp Thr Ile Val Phe Leu Phe Thr Ile Ala
195 200 205

Glu Trp Leu Glu Ser Arg Ala Ser His Lys Ala Thr Ala Ala Met Ser
210 215 220

Ser Leu Val Asn Ile Val Pro Pro Thr Ala Val Leu Ala Glu Ser Gly
225 230 235 240

Glu Val Val Asn Val Asp Glu Val Lys Leu Asn Ser Ile Leu Ala Val
245 250 255

Lys Ala Gly Glu Thr Ile Pro Ile Asp Gly Val Val Met Glu Gly Glu
260 265 270

Cys Asp Val Asp Glu Lys Thr Leu Thr Gly Glu Ser Phe Pro Val Ser
275 280 285

Lys Gln Ile Asp Ser Thr Val Trp Ala Gly Thr Thr Asn Leu Asn Gly
290 295 300

Tyr Ile Ser Val Lys Thr Thr Ala Leu Ala Glu Asp Cys Ala Val Ala
305 310 315 320

Arg Met Ala Gln Leu Val Glu Asp Ala Gln Asn Lys Lys Ser Lys Thr
325 330 335

Gln Arg Tyr Ile Asp Lys Cys Ala Lys Tyr Tyr Thr Pro Ala Ile Val
340 345 350

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

900 905 910

Ser Lys Leu Cys Ala Pro Gln Ser Gln Ser Ala Thr Ser Ser Ser Arg
915 920 925

Thr Cys Gly Asn Met Lys Cys Ser Asp Thr Asn Ser Lys Asn Ser Cys
930 935 940

Tyr Ser His Thr Asn Ser Glu Ser Cys Ser Ser Lys Met Ser Gly Pro
945 950 955 960

Ala Cys Lys Thr Ala Asn Ser Gly Ser Arg Leu Cys Gly Asn Lys Lys
965 970 975

Cys Leu Asp Ser Ala Asn Glu Asn Ser Phe His Ser Leu Thr Asn Pro
980 985 990

Leu Cys Glu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Glu Ser Leu Asp Leu Ala Arg
995 1000 1005

Lys Asp Arg Glu Ser Asn His Asp Leu Ser His Gly Tyr Ser Asp
1010 1015 1020

Glu Glu His Asp His Leu Asn Leu Asp Lys Ala His Asp Ser Cys
1025 1030 1035

Ala Leu Gln Glu Cys Cys Tyr Ser Val Gln Gly Asn Lys Thr Asp
1040 1045 1050

Val Ser Glu Thr Gly Ile Gln Glu Ala Ala His Cys Asp Ser Ile
1055 1060 1065

Asn Gln Thr Cys Gln Thr Ala Ile Ser Gly Ser Met Thr Cys Gly
1070 1075 1080

Asn Asn Lys Ser Leu Asp Ser Leu Ser Ile His Gly Cys His Ser
1085 1090 1095

His Asp Ser Pro Leu His Lys Glu Ser Asn Leu Glu Gln Lys Ser
1100 1105 1110

Leu Asp Val Ala Gly Glu Gly Ile Lys Ser Pro His Ala Val Gly
1115 1120 1125

Gln Gly Cys Ser Asp Lys Glu His Asn His Ser His Pro Glu Lys
1130 1135 1140

Ala Tyr Asp Ser Cys Ala Thr Asp Asp Cys Cys Phe Ser Val Gln
1145 1150 1155

Val His Gly Ile Asp Asp Val Ser Arg Ser Glu Ile Gln Glu Thr
1160 1165 1170

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ser
1325

<210> 50
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer PMG783F

<400> 50
attctagact gctgctatgt catcactgg 29

<210> 51
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer PMG783R

<400> 51
ataagcttag cctgaagaat tgagcaaa 28

<210> 52
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR Primer PMG 785F

<400> 52
atgagctctg gttatgtagg ctactgctgc t 31

<210> 53
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR Primer PMG 786R

<400> 53
atactagtat ttgtagtgcc agcccaga 28

<210> 54
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR Primer PMG754F

<400> 54
attctagatg agagcaagtc aggtcatcc 29

<210> 55
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR Primer PMG754R

<400> 55
ataagctttt caaacatcca ccgcatta 28

<210> 56
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR Primer PMG757F

<400> 56
atgagctcgc attgagagca agtcaggtc 29

<210> 57
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR Primer PMG757R

<400> 57
atctgcagcc tgtggtacat ccagctctt 29

PLANTAS TRANSGÉNICAS MODIFICADAS PARA REDUCIR EL TRANSPORTE DE CADMIO, PRODUCTOS DERIVADOS, Y MÉTODOS RELACIONADOS

CAMPO TÉCNICO

[0001] Composiciones, vectores de expresión, polinucleótidos, polipéptidos, plantas transgénicas, estirpes celulares transgénicas, y semillas transgénicas, y métodos para elaborar y utilizar estas realizaciones para producir varias plantas que pueden reducir el trasporte de metales pesados en porciones aéreas.

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUD RELACIONADA

[0002] Esta solicitud reivindica la prioridad para la Solicitud Provisional Estadounidense No. 60/996,982, presentada en Diciembre 13, 2007, cuyo contenido total se incorpora aquí como referencia.

ANTECEDENTE

[0003] Las plantas obtienen metales pesados esenciales, tales como Zn, Ni, y Cu, al absorber sustratos con iones metálicos de su ambiente mediante varios mecanismos de transporte mediados por los transportadores de transmembrana expresados en la superficie de las células de la raíz y otros tejidos vasculares. Los transportadores clasificados como ATPasas tipo P, tales como ATPasas tipo P1 B, son transportadores que translocan sustratos cargados positivamente a través de las membranas de plasma al utilizar la energía liberada de reacciones de hidrólisis ATP exergónicas. Las ATPasas tipo P1 B también se denominan como ATPasas

de metal pesado ("HMA") o ATPasas tipo CPx. Las HMA se han agrupado mediante especificidad de sustrato en dos subclases, los grupo Cu/Ag y Zn/Co/Cd/Pb. La primera ATPasa tipo P1 B a ser caracterizada en plantas es AtHMA4, clonada de *Arabidopsis*. La selectividad del sustrato por las HMA no se limita estrictamente al trasporte de metales esenciales en los que varios metales no esenciales se pueden reconocer indiscriminadamente como sustratos, lo que resulta en la acumulación de muchos metales no esenciales, tales como Cd, Pb, As, y Hg.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

[0004] Varios aspectos de la invención se dirigen a composiciones y métodos para producir plantas transgénicas, que incluyen plantas de tabaco transgénicas, modificadas genéticamente para impedir el trasporte de Cadmio (Cd) del sistema de raíz a la lámina de la hoja al reducir los niveles de expresión de los transportadores de la familia HMA. Un homólogo de HMA ("NtHMA") se ha identificado en el tabaco, que se puede utilizar para construir varias construcciones de ARNi, que codifican polinucleótidos de ARNi NtHMA de interés que pueden facilitar la degradación de transcriptos de ARN NtHMA endógenos. Las plantas transgénicas que pueden expresar polinucleótidos de ARNi NtHMA de acuerdo con la invención se pueden utilizar para reducir los niveles en estado estacionario de los transcriptos de ARN NtHMA, y consecuentemente, para reducir el número de transportadores de NtHMA activos funcionalmente disponibles para transportar metales a través de las membranas celulares.

[0005] Otros aspectos de la invención se dirigen a vectores de expresión recombinantes que comprenden varias construcciones ARNi NtHMA, plantas

149

transgénicas y semillas genéticamente modificadas para expresar exógenamente polinucleótidos de ARNi NtHMA, las estirpes celulares derivadas de plantas transgénicas y semillas, y productos consumibles que incorporan hojas derivadas de plantas transgénicas producidas de acuerdo con los métodos descritos.

[0006] De acuerdo con la presente invención se proporciona en un aspecto un polinucleótido aislado seleccionado del grupo que consiste de: un polinucleótido que comprende o consiste de una secuencia que tiene por lo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia, por ejemplo por lo menos 70% de identidad de secuencia, con la SEQ ID NO:1, y que codifica un transportador NtHMA que tiene actividad ATPasa tipo P1 B; un polinucleótido que comprende o consiste de una secuencia que tiene por lo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia, por ejemplo por lo menos 70% de identidad de secuencia, con la SEQ ID NO: 3; un polinucleótido que comprende o consiste de una secuencia que tiene por lo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia, por ejemplo por lo menos 70% de identidad de secuencia, con la SEQ ID NO: 47; un polinucleótido que comprende o consiste de una secuencia que codifica un polipéptido que tiene por lo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia, por ejemplo por lo menos 70% de identidad de secuencia, con la SEQ ID NO:2, en donde el polipéptido es un transportador NtHMA que tiene actividad ATPasa tipo P1B; y un polinucleótido que comprende o consiste de una secuencia que codifica un polipéptido que tiene por lo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia, por ejemplo por lo

menos 70% de identidad de secuencia, con la SEQ ID NO: 49, en donde el polipéptido es un transportador NtHMA que tiene actividad ATPasa tipo P1 B.

[0007] El polinucleótido aislado de la invención se puede hibridar a una molécula de ácido nucleico que comprende o consiste de la SEQ ID NOs: 1, 3, o 47, o secuencia complementaria de la SEQ ID NOs: 1, 3 o 47, bajo altas condiciones de rigurosidad.

[0008] Otro aspecto de la invención es un vector de expresión que comprende el polinucleótido aislado como se define aquí.

[0009] También se proporciona una planta transgénica hecha mediante un proceso que comprende introducir el polinucleótido aislado como se define aquí o el vector de expresión como se define aquí. La planta transgénica puede ser, por ejemplo, una planta de tabaco.

[0010] Se proporciona adicionalmente una estirpe celular hecha mediante un proceso que comprende introducir el polinucleótido aislado como se define aquí o el vector de expresión como se define aquí.

[0011] En un aspecto adicional se proporciona un producto de tabaco consumible (por ejemplo, pero no limitado a, un artículo para fumar o producto de tabaco no fumable) que incorpora hojas cosechadas de la planta transgénica como se define aquí.

[0012] En otro aspecto, se proporciona una construcción ARNi NtHMA capaz de inhibir la expresión de un ARN mensajero NtHMA a la que esta corresponde, la construcción comprende:

una primera secuencia que tiene por lo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia, por ejemplo por lo menos 70% de identidad de secuencia, para una porción de la SEQ ID NO:3 o 47;

una segunda secuencia; y

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

en donde la segunda secuencia se posiciona entre la primera secuencia y la tercera secuencia, y la segunda secuencia se liga operablemente a la primera secuencia y a la tercera secuencia.

[0013] En la construcción ARNi NtHMA:

(a) la primera secuencia puede tener por lo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia, por ejemplo por lo menos 95% de identidad de secuencia, con una secuencia seleccionada de una o más del grupo que consiste de: exón 1 (SEQ ID NO:5), un fragmento de exón 1 (SEQ ID NO:5), exón 2 (SEQ ID NO:7), un fragmento de exón 2 (SEQ ID NO:7), exón 3 (SEQ ID NO:9), un fragmento de

exón 3 (SEQ ID NO:9), exón 4 (SEQ ID NO: 11), un fragmento de exón 4 (SEQ ID NO:11), exón 5 (SEQ ID NO:13), un fragmento de exón 5 (SEQ ID NO:13), exón 6 (SEQ ID NO: 15), un fragmento de exón 6 (SEQ ID NO:15), exón 7 (SEQ ID NO: 17), un fragmento de exón 7 (SEQ ID NO:17), exón 8 (SEQ ID NO:19), un fragmento de exón 8 (SEQ ID NO:19), exón 9 (SEQ ID NO:21), un fragmento de exón 9 (SEQ ID NO:21), exón 10 (SEQ ID NO:23), un fragmento de exón 10 (SEQ ID NO:23), exón 11 (SEQ ID NO:25), y un fragmento de exón 11 (SEQ ID NO:25);

(b) la segunda secuencia puede tener por lo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia, por ejemplo por lo menos 95% de identidad de secuencia, con una secuencia seleccionada de una o más del grupo que consiste de: intrón 1 (SEQ ID NO:4), un fragmento de intrón 1 (SEQ ID NO:4), intrón 2 (SEQ ID NO:6), un fragmento de intrón 2 (SEQ ID NO:6), intrón 3 (SEQ ID NO:8), un fragmento de intrón 3 (SEQ ID NO:8), intrón 4 (SEQ ID NO: 10), un fragmento de intrón 4 (SEQ ID NO:10), intrón 5 (SEQ ID NO:12), un fragmento de intrón 5 (SEQ ID NO:12), intrón 6 (SEQ ID NO:14), un fragmento de intrón 6 (SEQ ID NO:14), intrón 7 (SEQ ID NO:16), un fragmento de intrón 7 (SEQ ID NO:16), intrón 8 (SEQ ID NO:18), un fragmento de intrón 8 (SEQ ID NO:18), intrón 9 (SEQ ID NO:20), un fragmento de intrón 9 (SEQ ID NO:20), intrón 10 (SEQ ID NO:22), un fragmento de intrón 10 (SEQ ID NO:22), intrón 11 (SEQ ID NO:24), un fragmento de intrón 11 (SEQ ID NO:24), intrón 12 (SEQ ID NO:26), y un fragmento de intrón 12 (SEQ ID NO:26);

(c) la tercera secuencia puede tener por lo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia, por ejemplo por lo menos 95% de identidad de secuencia, con una secuencia seleccionada de una o más del grupo que consiste de: SEQ ID NO:27,

un fragmento de la SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, un fragmento de la SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, un fragmento de la SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, un fragmento de la SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, un fragmento de la SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, un fragmento de la SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, un fragmento de la SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, un fragmento de la SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, un fragmento de la SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, un fragmento de la SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, y un fragmento de la SEQ ID NO:37;

(d) la primera secuencia puede comprender la SEQ ID NO:38, la segunda secuencia puede comprender la SEQ ID NO:39, y la tercera secuencia puede comprender la SEQ ID NO:40;

(e) la primera secuencia puede comprender la SEQ ID NO:42, la segunda secuencia puede comprender la SEQ ID NO:43, y la tercera secuencia puede comprender la SEQ ID NO:44; o

(f) se puede aplicar uno o dos o tres de (a), (b), (c), (d) y (e).

[0014] La invención también abarca un vector de expresión que comprende un promotor posicionado en dirección 5' y ligado operablemente a la construcción ARNi NtHMA como se define aquí. El promotor se puede seleccionar del grupo que consiste de: un promotor específico a tejido, un promotor inducible, y un promotor constitutivo.

[0015] En la construcción ARNi NtHMA, la primera y la segunda secuencia puede cada una tener una longitud seleccionada del grupo que consiste de 20-30

nucleótidos, 30-50 nucleótidos, 50-100 nucleótidos, 100-150 nucleótidos, 150-200 nucleótidos, 200- 300 nucleótidos, 300-400 nucleótidos, 400-500 nucleótidos, 500-600 nucleótidos, y 600-700 nucleótidos.

[0016] Un aspecto adicional de la invención es una planta transgénica que comprende el ARNi (o la construcción ARNi NtHMA, o el vector de expresión) como se define aquí, en donde la planta transgénica tiene niveles de Cd reducidos en por lo menos una parte de la planta comparada con la parte en una contraparte no transgénica. La planta transgénica puede ser, por ejemplo, una planta de tabaco.

[0017] También se proporciona el producto de tabaco consumible (por ejemplo, pero no limitado a, un artículo para fumar o producto de tabaco no fumable) que incorpora hojas cosechadas de la planta transgénica que comprende el ARNi como se define aquí.

[0018] El producto puede tener un valor de reducción de % de Cd de por lo menos aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99%.

[0019] El producto puede tener un contenido de Cd que es un valor que varía de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 0.05 ppm, de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 0.1 ppm, de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 0.5 ppm, de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 1.0 ppm, o de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 5 ppm.

150.

[0020] En otro aspecto de la invención, se proporciona un método para reducir los niveles de Cd en por lo menos una parte de una planta, que comprende: reducir los niveles de un mARN NtHMA en la planta al provocar la expresión de una construcción de ARNi.

[0021] Para este método, la construcción ARNi puede ser como se define aquí, y en particular puede comprender: una primera secuencia que tiene por lo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia, por ejemplo por lo menos 90% de identidad de secuencia, para una porción de la SEQ ID NO:3 o 47; una segunda secuencia; y una tercera secuencia que tiene una secuencia complementaria inversa de la primera secuencia, posicionada en la misma orientación como la primera secuencia, en donde la segunda secuencia se posiciona entre la primera secuencia y la tercera secuencia, y la segunda secuencia se liga operablemente a la primera secuencia y a la tercera secuencia.

[0022] De acuerdo con el método, luego de la expresión de la construcción ARNi, la parte de la planta puede tener un contenido de Cd reducido en por lo menos aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99%.

[0023] Adicionalmente o alternativamente, luego de la expresión de la construcción ARNi, la parte de la planta puede tener un contenido de Cd que varía de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 0.05 ppm, de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 0.1 ppm, de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 0.5 ppm, de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 1.0 ppm, o de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 5 ppm.

[0024] De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un polipéptido purificado sustancialmente que tiene por lo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia, por ejemplo por lo menos 70% de identidad de secuencia o por lo menos 95% de identidad de secuencia, con la SEQ ID NO:2 o 49, en donde el polipéptido es un transportador NtHMA que tiene actividad ATPasa tipo P1 B.

[0025] Un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido como se define aquí, por ejemplo que comprende o consiste de la SEQ ID NO:2 o 49, también se abarca por la invención.

[0026] Aspectos varios y adicionales (también denominados aquí como "realizaciones") de la presente invención se describen adelante.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0027] La figura 1 es un esquema de un clon genómico NtHMA que comprende 11 exones.

[0028] La figura 2A ilustra una estrategia de subclonación de ejemplo para construir un vector de expresión ARNi NtHMA que permite la expresión constitutiva de los polinucleótidos de ARNi NtHMA de interés, como se describe en el Ejemplo 2.

[0029] La figura 2B ilustra un dúplex de ARN bicatenario hipotético formado (como estructura en "horquilla") de interacciones intra-moleculares, de pares base dentro

del polinucleótido ARNi NtHMA producido como un producto transcrito de una construcción ARNi NtHMA de ejemplo.

[0030] La figura 3A muestra una secuencia de ARNi de ejemplo, NtHMA (660-915), para producir polinucleótidos de ARNi NtHMA de interés, como se describe en el Ejemplo 2.

[0031] Las figuras 3B-3D muestran la reducción de Cd en la lámina de la hoja de estirpes transgénicas de primera generación múltiples (T0), que representan tres variedades, que se han modificado genéticamente para expresar polinucleótidos de ARNi NtHMA (660-915), como se describe en el Ejemplo 5.

[0032] La figura 4A muestra una secuencia de ARNi de ejemplo, NtHMA (1382-1584), para producir polinucleótidos de ARNi NtHMA de interés, como se describe en el Ejemplo 3.

[0033] Las figuras 4B-4D muestran reducción de Cd en la lámina de la hoja de estirpes transgénicas de primera generación múltiples (T0), que representan tres variedades, que se han modificado genéticamente para expresar polinucleótidos de ARNi NtHMA (1382-1584), como se describe en el Ejemplo 5.

[0034] Las figuras 5A-C muestran niveles de transcriptos de ARN NtHMA normalizados en varias estirpes transgénicas de primera generación (T0) que se han modificado genéticamente para expresar polinucleótidos de ARNi NtHMA de interés, según se determina por análisis PCR en tiempo real cuantitativo de lámina de los extractos de hoja, como se describe en el Ejemplo 6.

153

[0035] La figura 6 muestra la distribución de Cd y Zn entre la lámina de la hoja y la raíz de varias estirpes transgénicas de primera generación (T0) que se han modificado genéticamente para expresar polinucleótidos de ARNi NtHMA de interés, como se presenta en la Tabla 2 y se describe en el Ejemplo 7.

[0036] La figura 7 muestra la distribución de Cd entre la corteza ("B"), lámina de la hoja ("L"), médula ("P"), y tejidos de raíz ("R") de varias estirpes transgénicas de primera generación (T0) que se han modificado genéticamente para expresar polinucleótidos de ARNi NtHMA de interés, como se presenta en la Tabla 3 y se describe en el Ejemplo 8.

[0037] La figura 8 muestra la distribución de Cd entre la lámina de la hoja ("L") y la raíz ("R") de varias estirpes transgénicas de segunda generación (T1) que se han modificado genéticamente para expresar polinucleótidos de ARNi NtHMA de interés, como se describe en el Ejemplo 9.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

[0038] I. Aislamiento de Genes de NtHMA de Tabaco y Productos Génicos

[0039] La figura 1 es un esquema de un clon genómico NtHMA que comprende 11 exones que codifican un transportador de metal pesado relacionado con la familia HMA de trasportadores. El Ejemplo 1 describe adicionalmente la identificación del clon genómico NtHMA (_HO- 18-2) y 4 clones cADN NtHMA. La Tabla 1 adelante proporciona posiciones de nucleótido que corresponden a las subregiones del exón e intrón mapeadas dentro del clon genómico NtHMA (_HO-18-2).

[0040] A. Polinucleótidos de NtHMA

[0041] El término "polinucleótido" se refiere a un polímero de nucleótidos que comprenden por lo menos 10 bases en longitud. Los polinucleótidos pueden ser ADN, ARN o un híbrido ADN/ARN, que comprende ribonucleótidos, desoxiribonucleótidos, combinaciones de desoxiribo- y ribo-nucleótidos, y combinaciones de las bases y/o modificaciones, que incluyen uracilo, adenina, timina, citosina, guanina, inosina, xantina, hipoxantina, isocitosina, y isoguanina. El término incluye formas mono y bicatenarias de ADN o ARN. El término "ADN" incluye ADN genómicos, cADNs, ADNs sintetizados químicamente, ADN amplificados por PCR, y combinaciones/equivalentes de los mismos. El término "polinucleótido aislado" se refiere a un polinucleótido no contiguo con cualquier genoma de origen, o separado de un contexto natural. El término incluye cualquier molécula de polinucleótido recombinante tal como construcciones ARNi NtHMA, vectores de expresión ARNi NtHMA, clones genómicos NtHMA, y fragmentos y variantes de los mismos.

[0042] Como se muestra en la figura 1, el clon genómico NtHMA, designado como la SEQ ID NO:1, comprende: intrón 1 (SEQ ID NO:4), exón 1 (SEQ ID NO:5), intrón 2 (SEQ ID NO:6), exón 2 (SEQ ID NO:7), intrón 3 (SEQ ID NO:8), exón 3 (SEQ ID NO:9), intrón 4 (SEQ ID NO:10), exón 4 (SEQ ID NO:11), intrón 5 (SEQ ID NO:12), exón 5 (SEQ ID NO:13), intrón 6 (SEQ ID NO:14), exón 6 (SEQ ID NO:15), intrón 7 (SEQ ID NO:16), exón 7 (SEQ ID NO:17), intrón 8 (SEQ ID NO:18), exón 8 (SEQ ID NO:19), intrón 9 (SEQ ID NO:20), exón 9 (SEQ ID NO:21), intrón 10 (SEQ ID NO:22), exón 10 (SEQ ID NO:23), intrón 11 (SEQ ID NO:24, exón 11 (SEQ ID NO:25), y intrón 12 (SEQ ID NO:26). Para las secuencias, ver Listado de Secuencias adelante. Varias realizaciones de la

LSS

invención se dirigen a polinucleótidos aislados que representan fragmentos genómicos aislados en el locus NtHMA, que comprenden la SEQ ID NO:1, fragmentos de la SEQ ID NO:1, o variantes de los mismos. Varias realizaciones se dirigen a variantes de polinucleótido NtHMA aislados que comprenden por lo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, y 99% de identidad de secuencia para la SEQ ID NO:1, o fragmentos de la SEQ ID NO:1.

[0043] Varias realizaciones se dirigen a polinucleótidos aislados que tienen secuencias que complementan aquellas de las variantes de polinucleótido NtHMA que comprenden por lo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, y 99% de identidad de secuencia para la SEQ ID NO:1, o fragmentos de la SEQ ID NO:1. Varias realizaciones se dirigen a polinucleótidos aislados que se pueden hibridar específicamente, bajo condiciones moderadas a altamente estrictas, a polinucleótidos que comprenden la SEQ ID NO:1, o fragmentos de la SEQ ID NO:1.

[0044] Varias realizaciones se dirigen a polinucleótidos aislados de cADN NtHMA (Clon P6663), que comprenden la SEQ ID NO:3, fragmentos de la SEQ ID NO:3, o variantes de los mismos. Varias realizaciones se dirigen a variantes de polinucleótido NtHMA aislados que comprenden por lo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, y 99% de identidad de secuencia para la SEQ ID NO:3, o fragmentos de la SEQ ID NO:3. Varias realizaciones se dirigen a variantes de polinucleótido NhTMA aislado que comprenden por lo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, y 99% de identidad de secuencia para la SEQ ID NO:3, o fragmentos de la SEQ ID NO:3, y en las que Ts se ha sustituido con Us (por ejemplo, ARNs). Varias realizaciones se dirigen a

polinucleótidos aislados que se pueden hibridar específicamente, bajo condiciones moderadas a altamente estrictas, a polinucleótidos que comprenden la SEQ ID NO:3, o fragmentos de la SEQ ID NO:3. Varias realizaciones se dirigen a polinucleótidos aislados que tienen una secuencia que complementa aquella de las variantes de polinucleótido NtHMA que comprenden por lo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, y 99% de identidad de secuencia para la SEQ ID NO:3, o fragmentos de la SEQ ID NO:3.

[0045] Varias realizaciones se dirigen a polinucleótidos aislados de cADN NtHMA (Clon P6643), que comprenden la SEQ ID NO:47, fragmentos de la SEQ ID NO:47, o variantes de los mismos. Varias realizaciones se dirigen a variantes de polinucleótido NtHMA aislados que comprenden por lo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, y 99% de identidad de secuencia para la SEQ ID NO:47, fragmentos de la SEQ ID NO:47. Varias realizaciones se dirigen a variantes de polinucleótido NhTMA aislado que comprenden por lo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, y 99% de identidad de secuencia para la SEQ ID NO:47, fragmentos de la SEQ ID NO:47, y en las que Ts se ha sustituido con Us (por ejemplo, ARNs). Varias realizaciones se dirigen a polinucleótidos aislados que se pueden hibridar específicamente, bajo condiciones moderadas a altamente estrictas, a polinucleótidos que comprenden la SEQ ID NO:47, fragmentos de la SEQ ID NO:47. Varias realizaciones se dirigen a polinucleótidos aislados que tienen una secuencia que complementa aquella de variantes de polinucleótido NtHMA que comprenden por lo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, y 99% de identidad de secuencia para la SEQ ID NO:47, fragmentos de la SEQ ID NO:47.

[0046] Varias realizaciones se dirigen a biopolímeros que son homólogos a polinucleótidos NtHMA y polipéptidos NtHMA ("homólogos de NtHMA"), que se pueden identificar de diferentes especies de planta. Por ejemplo, los homólogos de NtHMA se pueden aislar experimentalmente al exhibir colecciones de ácido nucleico derivadas de diferentes especies de plantas de interés. Alternativamente, los homólogos de NtHMA se pueden identificar al exhibir bases de datos de genomas que contienen secuencias de una o más especies utilizando una secuencia derivada de polinucleótidos NtHMA y/o polipéptidos NtHMA. Tales bases de datos genómicas están fácilmente disponibles para un número de especies (por ejemplo, en la amplia red mundial (www) en tigr.org/tdb; genetics.wisc.edu; Stanford. edu/.about.ball; hiv-web.lan1.gov; ncbi.nlm.nig.gov; ebi.ac.uk; y pasteur.fr/other/biology). Por ejemplo, las secuencias de oligonucleótido degeneradas se pueden obtener mediante "traducción inversa" de los fragmentos de polipéptido NtHMA. Se pueden utilizar los polinucleótidos NtHMA como sondas o cebadores para identificar/amplificar secuencias relacionadas, o para obtener secuencias de longitud completa para NtHMA relacionados mediante PCR, por ejemplo, o mediante otras técnicas bien conocidas (por ejemplo, ver PCR Protocols: A Guide to Methods and Applicación s, Innis et. al., eds., Academic Press, Inc. (1990)).

[0047] B. Polipéptidos NtHMA

[0048] El término "polipéptido NtHMA" se refiere a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácido designada como la SEQ ID NO:2; los polipéptidos tienen homología sustancial (es decir, similitud de secuencia) o identidad sustancial para la SEQ ID NO:2; fragmentos de la SEQ ID NO:2; y variantes de los mismos. Los polipéptidos NtHMA incluyen secuencias que tienen grado sustancial

o suficiente de identidad o similitud para la SEQ ID NO:2, y que pueden funcionar al trasportar metales pesados a través de membranas celulares.

[0049] Los polipéptidos NtHMA incluyen variantes producidas al introducir cualquier tipo de alteraciones (por ejemplo, inserciones, eliminaciones, o sustituciones de aminoácidos; cambios en estados de glucosilación; cambios que afectan el replegamiento o las isomerizaciones, estructuras tridimensionales, o estados de autoasociación), que se pueden hacer por ingeniería deliberadamente o aislar naturalmente. Los polipéptidos NtHMA pueden estar en forma lineal o ciclizada utilizando métodos conocidos (por ejemplo, H. U. Saragovi, *et al.*, Bio/Technology 10, 773 (1992); y R. S. McDowell, *et al.*, J. Amer. Chem. Soc. 114:9245 (1992), ambos incorporados aquí como referencia). Los polipéptidos NtHMA comprenden por lo menos 8 a 10, por lo menos 20, por lo menos 30, o por lo menos 40 aminoácidos contiguos.

[0050] Varias realizaciones se dirigen a polipéptidos NtHMA aislados codificados por la secuencia de polinucleótido, SEQ ID NO:1, que comprende la SEQ ID NO:2, fragmentos de la SEQ ID NO:2, o variantes de los mismos. Varias realizaciones se dirigen a variantes de polipéptido NtHMA aislado que comprenden por lo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, y 99% de identidad de secuencia para la SEQ ID NO:2, o fragmentos de la SEQ ID NO:2.

[0051] Varias realizaciones se dirigen a polipéptidos NtHMA aislados (Clon P6663), que comprenden la SEQ ID NO:2, fragmentos de la SEQ ID NO:2, o variantes de los mismos. Varias realizaciones se dirigen a variantes de polipéptido NtHMA aislado que comprenden por lo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%,

96%, 97%, 98%, y 99% de identidad de secuencia para la SEQ ID NO:2, o fragmentos de la SEQ ID NO:2.

[0052] Varias realizaciones se dirigen a polipéptidos NtHMA aislados (Clon P6643), que comprenden la SEQ ID NO:49, fragmentos de la SEQ ID NO:49, o variantes de los mismos. Varias realizaciones se dirigen a variantes de polipéptido NtHMA aislado que comprenden por lo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, y 99% de identidad de secuencia para la SEQ ID NO:49, o fragmentos de la SEQ ID NO:49.

[0053] II. Composiciones y Métodos relacionados para reducir Expresión de Gen NtHMA y/o Actividad de Transportador mediada por NtHMA

[0054] Las composiciones antagonistas adecuadas que pueden regular por descenso la expresión y/o la actividad de las variantes NtHMA y NtHMA incluyen polinucleótidos específicos a secuencia que pueden interferir con la trascripción de uno o más genes NtHMA endógenos; los polinucleótidos específicos a secuencia que pueden interferir con la traducción de los transcriptos de ARN NtHMA (por ejemplo, dsARNs, siARNs, ribozimas); los polipéptidos específicos a secuencia que pueden interferir con la estabilidad de la proteína de NtHMA, la actividad enzimática de NtHMA, y/o la actividad de unión de NtHMA con respecto a sustratos y/o proteínas reguladoras; anticuerpos que exhiben especificidad para NtHMA; y compuestos de molécula pequeña que pueden interferir con la estabilidad de la proteína de NtHMA, la actividad enzimática de NtHMA, y/o la actividad de unión de NtHMA. Un antagonista efectivo puede reducir el transporte de metal pesado (por ejemplo, Cd) en las estructuras de lámina de la hoja al por lo

menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o 95%.

[0055] A. Definiciones

[0056] A través de esta descripción y las reivindicaciones adjuntas, los términos "uno" y "el" funcionan como referentes singulares y plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, una referencia a "un polinucleótido ARNi" incluye una pluralidad de tales Polinucleótido ARNi, y una referencia a "la planta" incluye la referencia a una o más de tales plantas.

[0057] El término "orientación" se refiere a un orden particular en la ubicación de un polinucleótido con relación a la posición de un polinucleótido de referencia. Un ADN lineal tiene dos posibles orientaciones: la dirección 5'-a-3' y la dirección 3'-a-5'. Por ejemplo, si una secuencia de referencia se posiciona en la dirección 5'-a-3', y sí una segunda secuencia se posiciona en la dirección 5'-a-3' dentro la misma molécula/ hebra de polinucleótido, entonces la secuencia de referencia y la segunda secuencia se orienta en la misma dirección, o tienen la misma orientación. Típicamente, una secuencia promotora y un gen de interés bajo la regulación del promotor dado se posicionan en la misma orientación. Sin embargo, con respecto a la secuencia de referencia posicionada en la dirección 5'-a-3', sí se posiciona una segunda secuencia en la dirección 3'-a-5' dentro la misma molécula/hebra de polinucleótido, entonces la secuencia de referencia y la segunda secuencia se orienta en la dirección anticodificante, o tienen orientación anticodificante. Dos secuencias que tienen orientación anticodificantes con respecto una a la otra se pueden describir alternativamente por tener la misma orientación, sí la secuencia de referencia (dirección 5'-a-3') y la secuencia

complementaria inversa de la secuencia de referencia (secuencia de referencia posicionada en 5'-a-3') se posicionan dentro la misma molécula/hebra de polinucleótido.

[0058] El término "Vector de expresión ARNi NtHMA" se refiere a un vehículo de ácido nucleico que comprende una combinación de componentes de ADN para permitir el transporte y la expresión de las construcciones ARNi NtHMA. Los vectores de expresión adecuados incluye episomas capaces de replicación extra-cromosómica tal como plásmidos de ADN bicatenarios, circulares; plásmidos de ADN bicatenarios linealizados; y otros vectores de expresión funcionalmente equivalentes de cualquier origen. Un vector de expresión ARNi NtHMA adecuado comprende por lo menos un promotor posicionado en la dirección 5' y ligado operablemente a una construcción ARNi NtHMA, como se define adelante.

[0059] El término "Construcción de ARNi NtHMA" se refiere a un fragmento de ADN recombinante, bicatenario que codifica "Polinucleótido ARNi NtHMA" que tiene actividad de interferencia de ARN. Una construcción de ARNi NtHMA comprende una "hebra de plantilla" de par base con una "hebra de codificación o codificante" complementaria. Una construcción ARNi NtHMA dada se puede insertar en un vector de expresión ARNi NtHMA en dos orientaciones posibles, ya sea en la misma orientación (o codificante) o en la orientación inversa (o anti-codificante) con respecto a la orientación de un promotor posicionado dentro un vector de expresión ARNi NtHMA.

[0060] El término "Polinucleótido ARNi NtHMA" pueden estar dirigidos al ARN NtHMA para degradación enzimática, que involucra la formación de fragmentos más pequeños de polinucleótido ARNi NtHMA ("siARNs") que se pueden unir a

múltiples secuencias complementarias dentro del ARN NtHMA objetivo. Se pueden reducir niveles de uno o más genes de NtHMA mediante actividad de interferencia de ARN de los polinucleótido ARNi NtHMA.

[0061] El término "hebra de plantilla" se refiere a la hebra que comprende la secuencia que complementa aquella de la "hebra de codificación o codificante" de un Dúplex de ADN, tal como Fragmento genómico NtHMA,cADN NtHMA, o Construcción de ARNi NtHMA, o cualquier Fragmento de ADN que comprende una secuencia de ácido nucleico que se pueden transcribir mediante polimerasa de ARN. Durante la transcripción, la polimerasa de ARN puede translocarse a lo largo de la hebra de plantilla en la dirección 3'-a-5' durante síntesis de ARN naciente.

[0062] Los términos "hebra codificante" o "hebra decodificación" se refiere a la hebra que comprende una secuencia que complementa aquella de la hebra de plantilla en un dúplex de ADN. Por ejemplo, la secuencia de la hebra codificante ("secuencia codificante") para el clon genómico NtHMA identificado se designa como la SEQ ID NO:1. Por ejemplo, la secuencia codificante para cADN NtHMA, identificada como el clon P6663, se designa como la SEQ ID NO:3. Por ejemplo, la secuencia codificante para cADN NtHMA, identificada como el clon P6643, se designa como la SEQ ID NO:46. Por ejemplo, sí la hebra codificante comprende una secuencia hipotética 5'-TAATCCGGT-3', entonces la secuencia correspondiente sustancialmente idéntica dentro de un objetivo mAARN es 5'-UAAUCCGGU-31.

[0063] El término "secuencia complementaria inversa" se refiere a la secuencia que complementa la "secuencia codificante" de interés (por ejemplo, secuencia

exón) posicionada dentro la misma hebra, en la misma orientación con respecto a la secuencia codificante. Por ejemplo, sí una hebra comprende una secuencia hipotética 51- TAATCCGGT-3', entonces la secuencia complementaria inversa 5'-ACCGGATTA-S1 se puede ligar operablemente a la secuencia codificante, separada por una secuencia separadora.

[0064] Los términos "Transcripto de ARN NtHMA" o "ARN NtHMA". En el contexto de la Interferencia de ARN, se refiere a moléculas de acido polirribonucleico producidas dentro una célula de planta anfitriona de interés, que resulta de la transcripción de genes endógenos de la familia HMA, que incluyen el gen de NtHMA aislado (SEQ ID NO:1). Así, estos términos incluye cualquier Especie de ARN o variantes de ARN producidas como productos transcripcionales de genes relacionados con HMA que puede ser distintos del gen de NtHMA aislado (SEQ ID NO:1) pero que tiene suficiente similitud a niveles estructurales y/o funcionales que se clasifican dentro la misma familia. Por ejemplo, sí una célula de planta anfitriona seleccionada para modificación genética de acuerdo con el método descrito es tabaco, entonces los transcripto de ARN NtHMAs objetivo incluye: (1) pre-mARN y mARN producidos de la transcripción del gen NtHMA aislado (SEQ ID NO:1); (2) pre-mARN y mARN producidos de la transcripción de cualquier genes que tiene por lo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, y 99% de identidad de secuencia con la secuencia del gen NtHMA aislado (SEQ ID NO:1) (es decir otros genes distintos sustancialmente idénticos al gen NtHMA identificado y que codifican las isoformas relacionadas de los transportadores HMA); y (3) pre-mARN y mARN producidos a partir de la transcripción de alelos del gen NtHMA (SEQ ID NO:1). Los transcripto de ARN NtHMA incluye Variantes ARN producidas como un resultado de reacciones de corte y empalme de ARN alternativas de ARN heteronucleares ("hnARNA") de un

gen NtHMA, Variantes mARN que resulta que resulta de tales reacciones de corte y empalme de ARN alternativas, y cualquier variantes ARN intermedia.

[0065] Los términos "homología" o "identidad" o "similitud" se refieren al grado de similitud de secuencia entre dos polipéptido o entre dos moléculas de ácido nucleico comparadas por alineación de secuencia. El grado de homología entre dos secuencias de ácido nucleico descritas que se comparan es una función del número de nucleótidos idénticos, o emparejados, en posiciones comparables. El porcentaje de identidad se puede determinar mediante inspección visual y cálculo matemático. Alternativamente, el porcentaje de identidad de dos secuencias de ácido nucleico se pueden determinar al comparar la información de secuencia utilizando el programa de computador GAP, versión 6.0 descripto por Devereux et al. (Nucl. Acids Res. 12:387, 1984) y disponible del Grupo de Computador de Genética de la Universidad de Wisconsin (UWGCG). Los parámetros preestablecidos típicos para el programa GAP incluye: (1) una matriz de comparación unitaria (que contiene un valor de 1 para identidades y 0 para non-identidades) para nucleótidos, y la matriz de comparación ponderada de Gribskov y Burgess, Nucl. Acids Res. 14:6745, 1986, como se describió por Schwartz y Dayhoff, eds., Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358, 1979; (2) una penalidad de 3.0 para cada espacio y una penalidad de 0.10 adicional para cada símbolo en cada espacio; y (3) ninguna penalidad para espacios finales. Se pueden utilizar alternativamente varios programas conocidos por los expertos en la técnica de comparación de secuencias.

[0066] El término "dirección 5'" se refiere una dirección/posición relativa con respecto un elemento de referencia a lo largo de una secuencia de polinucleótido

lineal, que indica una posición/ dirección hacia el externo 5' de la secuencia de polinucleótido."Dirección 5'" se puede utilizar intercambiablemente con "5' de un elemento de referencia".

[0067] El término "ligado operablemente" se refiere a la unión de distintos elementos ADN, fragmentos, o secuencias para producir una unidad transcripcional funcional o un vector de expresión funcional.

[0068] El término "promotor" se refiere un elemento /secuencia de ácido nucleico, posicionada típicamente en la dirección 5' y ligada operablemente a un fragmento de ADN bicatenario, tal como una construcción de ARNi NtHMA. Por ejemplo, un promotor adecuado permite la activación transcripcional de una construcción ARNi NtHMA al incorporar el complejo transcripcional, que incluyen la polimerasa de ARN y varios factores, para inicial la síntesis de ARN."Promotores" se pueden derivar completamente de regiones próximas a un gen natural de interés, o se puede componer de diferentes elementos derivado de diferentes promotores naturales y/o segmentos de ADN sintéticos. Los promotores adecuados incluyen promotores específicos de tejido reconocidos por factores específicos de tejidos presentes en diferentes tejidos o tipos celulares (por ejemplo, promotores específicos de raíz, promotores específicos de brotes, promotores específicos de xilemas), o presente durante diferentes etapas del desarrollo, o presente en respuestas a diferentes condiciones ambientales. Los promotores adecuados incluyen promotores constitutivos que se pueden activar en la mayoría de tipos celulares sin requerir inductores específicos. ejemplos de promotores adecuados para controlar la producción de polipéptido ARNi NtHMA incluye el virus mosaico de la coliflor 35S (CaMV/35S), SSU, OCS, lib4, usp, STLS1, B33, promotores nos o ubiquitin- o faseolin. Los expertos en la técnica son capaces de generar

múltiples variaciones de promotores recombinantes, como se describe un número de referencias, tal como Okamuro and Goldberg, Biochemistry of Plants, Vol. 15:pp1-82 (1989).

[0069] Los promotores específicos de tejido son elementos de control transcripcionales que solo son activos en células particulares o tejidos en momentos específicos durante el desarrollo de la planta, tal como en tejidos vegetativos o tejidos reproductivos. La expresión específica de tejido se puede ventajosa, por ejemplo, cuando se prefiere la expresión de polinucleótido en ciertos tejidos. ejemplos promotores específicos de tejidos bajo control de desarrollo incluye promotores que pueden iniciar la transcripción solo (o principalmente solos) en ciertos tejidos, tal como tejidos vegetativos, por ejemplo, raíces u hojas, o tejidos reproductivos, tal como frutos, óvulos, semillas, polen, pistilos, flores, o cualquier tejido embriónico. Los Promotores específicos de tejido reproductivo puede ser, por ejemplo, específicos de antera, específicos de óvulos, específicos de embriones, específicos de endospermas, específicos de integumentos, semillas y específicos de recubrimiento de semilla, específicos de polen, específicos de pétalos, específicos de sépalos, o sus combinaciones.

[0070] Los promotores específicos de hoja adecuados incluyen piruvato, promotor dicinasa ortofosfato (PPDK) de la planta C4 (maíz), promotor cab-m1Ca^{+2} del maíz, el promotor del gen relacionado con Arabidopsis taliana myb (Atmyb5), promotores de carboxilato bifosfato ribulosa (RBCS) (por ejemplo, genes RBCS 1, RBCS2 y RBCS3 de tomate expresado en hojas y plántulas que crecen a la luz, RBCS1 y RBCS2 expresados en frutos de tomate en desarrollo, y/o promotor carboxilasa bisfosfato ribulosa expresado casi exclusivamente en células mesofilas en laminas foliares y vainas de las hojas a altos niveles).

[0071] Los promotores específicos de senescencia adecuados incluye un promotor de tomate activo durante la madurez de la fruta,, senescencia y abscisión de las hojas, un promotor de maíz de gen que codifica una proteasa cisteína. Se pueden utiliza promotores específicos de antera adecuados. Tales promotores se conocen en la técnica o se pueden descubrir por técnicas conocidas; ver, por ejemplo, Bhalla and Singh (1999) Molecular control of male fertility in Brassica, Proc. 10th Annual Rapeseed Congress, Canberra, Australia; van Tunen et al. (1990) Pollen- and anther-specific chi promoters from petunia: tandem promoter regulation of the chiA gene. Plant Cell 2:393-40; Jeon et al. (1999) Isolation and characterization of an anther-specific gene, RA8, from rice (Oryza sativa L). Plant Molecular Biology 39:35-44; y Twell et al. (1993) Activation and developmental regulation of an Arabidopsis anther-specific promoter in microspores and pollen of Nicotiana tabacum. Sex. Planta Reprod. 6:217-224.

[0072] Se pueden seleccionar promotores preferidos de raíz adecuados conocidos por los expertos en la técnica. Ver, por ejemplo, Hire et al. (1992) Plant Mol. Biol. 20(2):207- 218 (soybean root-specific glutamine synthetase gene); Keller and Baumgartner (1991) Planta Cell 3(10):1051-1061 (root-specific control element in the GRP 1.8 gene of French bean); Sanger et al. (1990) Plant Mol. Biol. 14(3):433-443 (root- specific promoter of the mannopine synthase (MAS) gene of Agrobacterium tumefaciens); and Miao et al. (1991) Planta Cell 3(1):11-22 (full-length cADN clone encoding cytosolic glutamine synthetase (GS), which is expressed in roots and root nodules of soybean). Ver también Bogusz et al. (1990) Plant Cell 2(7):633-641, en donde se describen dos promotores específicos de raíz aislados de genes de hemoglobina de *Parasponia andersonii* no leguminosa que fijador de nitrógeno y Trema tomentosa no leguminosa que no fija nitrógeno.

[0073] Los promotores preferidos de semilla adecuados incluyen promotores específicos de semilla (aquellos promotores activos durante el desarrollo de la semillas tal como promotores de proteínas de almacenamiento de semillas) y promotores de germinación de semilla (aquellos promotores activos durante la germinación de la semillas). Ver, por ejemplo, Thompson et al. (1989) BioEssays 10: 108, incorporada aquí como referencia. Tales promotores preferidos de semilla incluye, pero no se limitan a, Cim1 (mensaje inducido por citocinina); cZ19B1 (maíz 19 kDa zeína); milps (sintosa mio-inositol-1 -fosfato); mZE40-2, también conocido como Zm-40 (Patente Estadounidense No. 6,403,862); nuclc (Patente Estadounidense No. 6,407,315); y celA (sintasa celulosa) (ver WO 00/11177). La gama-zeína es un promotor específico de endospermas. Glob-1 es un promotor específico de embrión. Para dicotiledóneas, promotor especifico de semilla incluye, pero no se limitan a, judía. β.-faseolina, napina,.β.-conglicinina, lecitina de soya, cruciferina, y sus similares. Para monocotiledoneas, promotor especifico de semilla incluye, pero no se limitan a, un promotor de zeína de maíz 15 kDa, un promotor de zeína 22 kDa,un promotor de zeína 27 kDa, un promotor de g-zeína, un promotor de γ.- zeína 27 kD. (tales como promotor gzw64, ver Acceso Genbank #S78780), un promotor ceroso, un promotor encogido 1, un promotor encogido 2, un promotor de globulina 1 (ver Acceso Genbank # L22344), un promotor ltp2 (Kalla, et al., Plant Journal 6:849-860 (1994); Patente Estadounidense No. 5,525,716), promotor cim1 (ver Patente Estadounidense No. 6,225,529) promotores de maíz end1 y end2 (Ver Patente Estadounidense No. 6,528,704 y solicitud 10/310,191, presentada en Dic. 4, 2002); un promotor nud (Patente Estadounidense No. 6,407,315); un promotor Zm40 (Patente Estadounidense No. 6,403,862); eep1 y eep2; led (Solicitud de Patente Estadounidense Serie. No. 09/718,754); un promotor tioredoxinH (Solicitud de Patente Provisional

Estadounidense 60/514,123); promotor mlip15 (Patente Estadounidense No. 6,479,734); promotor PCNA2; y el promotor encogido 2. (Shaw et al., Planta Phys 98:1214-1216, 1992; Zhong Chen et al., PNAS USA 100:3525-3530, 2003).

[0074] Ejemplos de promotores inducibles incluye promotores sensibles al ataque de patógenos, condiciones anaeróbicas, temperatura elevada, luz, sequia, frio, temperatura, o alta concentración de sal. Los promotores inducibles de patógeno incluye aquellos de proteínas relacionadas con patogenia (proteínas PR), que se incluyen luego de la infección por un patógeno (por ejemplo, proteínas PR, proteínas SAR, beta-1,3- glucanasa, citinasa). Ver, por ejemplo, Redolfi et al. (1983) Neth. J. Planta Pathol. 89:245-254; Uknes et al. (1992) Planta Cell 4:645-656; y Van Loon (1985) Planta Mol. Virol. 4:111-116. Ver también la solicitud titulada"Inducible Maiz Promotors", Solicitud de Patente Estadounidense Serie. No. 09/257,583, presentada en Feb. 25, 1999.

[0075] En adición a los promotores de planta, se pueden derivar otros promotores adecuados de origen bacteriano (por ejemplo, el promotor de sintasa octopina, el promotor de sintasa nopalina y otros promotores derivados de plásmidos Ti), o se puede derivar de promotores víricos (por ejemplo, promotores 35S y 19S ARN del virus mosaico de la coliflor (CaMV), promotores constitutivos del virus del mosaico del tabaco, virus mosaico de la coliflor (CaMV) 19S y promotores 35S, o promotores del virus mosaico del escrofularia 35S).

[0076] El término "mejorador" se refiere una molécula de ácido nucleico, o una secuencia de ácido nucleico, que puede reclutar proteínas reguladoras transcripcionales tal como activador transcripcionales, para mejorar la activación transcripcional al incrementar la actividad del promotor. Los mejoradores

adecuados se pueden derivar de regiones próximas a un promotor natural de interés (fuentes homologas) o se pueden derivar de un contexto no natural (fuentes heterólogas) y se pueden ligar operablemente a cualquier promotor de interés dentro vectores de expresión ARNi NtHMA para mejorar la actividad y/o la especificad de tejido de un promotor. Algunos mejoradores pueden operar cualquier orientación con respecto a la orientación de una unidad de transcripción. Por ejemplo, los mejoradores se puede posicionar en la dirección 5' o en la dirección tres prima de una unidad transcripcional que comprende un promotor y una construcción de ARNi NtHMA. Las persona expertas en la técnica son capaces de ligar operablemente mejoradores y promotores para optimizar los niveles de transcripción de las construcciones ARNi NtHMA.

[0077] B. Vector de expresión ARNi que comprende Construcciones de ARNi NtHMA que codifica polinucleótidos ARNi NtHMA

[0078] La interferencia de ARN ("ARNi") o ARN silenciante es un proceso evolutivamente conservado mediante el cual los mARN específicos se pueden dirigir a degradación enzimática. Un ARN bicatenario (dsRNA) se debe introducir o producir por una célula (por ejemplo, virus dsARN, o Polinucleótidos ARNi NtHMA) para iniciar la ruta ARNi. del dsARN se pueden convertir en dúplex siARN múltiples de 21-23 bp de longitud ("siARN") por ARNsas III, que son endonucleasas especificas del dsRNA ("Granulador"). El siARN se puede reconocer exteriormente mediante complejos de silenciamiento inducidos por ARN ("RISC") que promueven la separación del siARN a través de proceso dependientes de ATP. La separación de la hebra anticodificante del siARN guía el RISC activado al mARN objetivado (por ejemplo, variantes de ARN NtHMA) que comprenden una secuencia complementaria a la hebra anticodificante siARN. El

mARN objetivado y la hebra anticodificante pueden formar una hélice con forma de A, y la ranura principal de la hélice con forma de A se pueden reconocer por el RISC activado. El mARN objetivo se puede separado por el RISC activado en un único sitio definido por el sitio de unión del extremo 5' de la hebra siARN. El RISC activado se puede reciclar para catalizar otro evento de separación.

[0079] La FIG. 2A ilustra la construcción de un vector de expresión ARNi NtHMA de ejemplo. En la FIG. 2A,"S" I denota la etapa I y" S II" denota la etapa II de los procesos de construcción. Varias realizaciones se dirigen a vector de expresión de ARNi NtHMA que comprende Construcciones de ARNi NtHMA que codifican polinucleótidos de ARNi NtHMA que exhiben actividad de interferencia ARN al reducir el nivel de expresión de mARN NtHMA, pre-mARN de NtHMA, y variantes ARN NtHMA relacionadas. Los vectores de expresión comprenden un promotor posicionado en la dirección 5' y ligado operablemente a una construcción ARNi NtHMA, como se define adelante adicionalmente. Los vectores de expresión ARNi NtHMA comprenden un promotor de núcleo mínimo adecuado, una construcción de ARNi NtHMA de interés, una región reguladora (5') en la dirección 5', una región reguladora (3') en la dirección tres prima, que incluye la terminación de transcripción y señales poliadenilación, y otras secuencias conocidas por los expertos en la técnica, tal como varios marcadores de selección.

[0080] Los polinucleótidos NtHMA se pueden producir en varias formas, que incluyen estructuras similares a horquilla bicatenaria ("dsARNi"). El dsARNi NtHMA se pueden convertir enzimáticamente a siARN NtHMA bicatenario. Una de las hebras del dúplex siARN NtHMA puede hibridar a una secuencia complementaria dentro del mARN NtHMA objetivo y variante de ARN NtHMA relacionadas. Los dúplex siARN/mARN se reconocen por el RISC que pueden

dividir los ARN NtHMA en múltiples sitios en una forma dependiente de la secuencia, que resulta en la degradación del mARN NtHMA objetivo y variantes ARN NtHMA relacionado.

[0081] La FIG. 2B ilustra la formación de un dúplex de ARN bicatenario hipotético formado (como estructura "vástago- bucle-vástago") como un producto transcripto de una construcción ARNi NtHMA de ejemplo. En la FIG. 2B, se nuestra una construcción 10n del ARNi NtHMA hipotética, que comprende 3 fragmento de ADN bicatenario, tal como los fragmentos 1-3. La flecha I denota la formación de la construcción ARNi, la flecha II la transcripción, y la flecha III es la formación de dsARN. La fragmento 1 se posiciona en la dirección 5' y se liga operablemente al fragmento 2, que se posiciona en la dirección 5' y se ligar operablemente al fragmento 3, para que la hebras de ADN /secuencias 4, 6, y 8 se ligan en tándem para formar la hebra 11, como se muestra. Alternativamente, una construcción de ARNi NtHMA comprende "una secuencia codificante" 5, que se posiciona en la dirección 5' y se ligar operablemente a "una secuencia separadora" 7, que se posiciona en la dirección 5' y se ligar operablemente a "una secuencia complementaria inversa" 9. Las hebras /secuencias 5, 7, y 9 se pueden ligar en tándem para formar la hebra/secuencia 12. Alternativamente, una construcción de ARNi NtHMA comprende "una secuencia codificante" 8, que se posiciona en la dirección 5' y se liga operablemente a "una secuencia separadora" 6, que se posiciona en la dirección 5' y se ligar operablemente a "una secuencia complementaria inversa" 4. Las hebras/secuencias 8, 6, y 4 se pueden ligar en tándem para formar la hebra/secuencia 11. Hebra 12 es complementaria a la hebra 11. La hebra 11 es una hebra de plantilla que se puede transcribir en el polinucleótido ARNi NtHMA 13. El polinucleótido ARNi NtHMA 13 forma una estructura de horquilla ("vástago-bucle-vástago"), en la que el vástago 16 es una

región de complementariedad que resulta de interacciones de base par intramolecular del polinucleótido ARNi NtHMA 15 y el bucle 17 representa una región de no complementariedad codificada por una secuencia separadora, tal como las hebras/secuencias 6 o 7.

[0082] Cualquier polinucleótido de ARN NtHMA de interés se puede producir al seleccionar una composición de secuencia adecuada, tamaño de bucle, y longitud de vástago para producir el dúplex de horquilla NtHMA. Un rango adecuado para diseñar longitudes de vástago de un dúplex de horquilla, incluye longitudes de vástagos de 20-30 nucleótidos, 30-50 nucleótidos, 50-100 nucleótidos, 100-150 nucleótidos, 150-200 nucleótidos, 200-300 nucleótidos, 300-400 nucleótidos, 400-500 nucleótidos, 500-600 nucleótidos, y 600-700 nucleótidos. Un rango adecuado para diseñar longitudes de bucles de un dúplex de horquilla, incluye longitudes de bucle de 4-25 nucleótidos, 25-50 nucleótidos, o más si la longitud del vástago del dúplex de horquilla es sustancial. En cierto contexto, las estructuras de horquilla con regiones duplexadas mayores de 21 nucleótidos puede promover el silenciamiento dirigido al siARN efectivo, independiente de la secuencia de bucle y la longitud

[0083] Construcciones ARNi NtHMA de ejemplo para regular por descenso el nivel de expresión de el gen NtHMA (SEQ ID NO:1) y otros genes relacionados NtHMA incluyen lo siguiente:

[0084] Varias realizaciones se dirigen a vectores de expresión ARNi NtHMA que comprenden una construcción ARNi NtHMA que comprende uno o más de: intrón 1 (SEQ ID NO:4), exón 1 (SEQ ID NO:5), intrón 2 (SEQ ID NO:6), exón 2 (SEQ ID NO:7), intrón 3 (SEQ ID NO:8), exón 3 (SEQ ID NO:9), intrón 4 (SEQ ID NO:10),

exón 4 (SEQ ID NO:11), intrón 5 (SEQ ID NO:12), exón 5 (SEQ ID NO:13), intrón 6 (SEQ ID NO:14), exón 6 (SEQ ID NO:15), intrón 7 (SEQ ID NO:16), exón 7 (SEQ ID NO:17), intrón 8 (SEQ ID NO:18), exón 8 (SEQ ID NO:19), intrón 9 (SEQ ID NO:20), exón 9 (SEQ ID NO:21), intrón 10 (SEQ ID NO:22), exón 10 (SEQ ID NO:23), intrón 11 (SEQ ID NO:24, exón 11 (SEQ ID NO:25), y intrón 12 (SEQ ID NO:26), fragmentos de los mismos, y variantes de los mismos.

[0085] Varias realizaciones se dirigen a vectores de expresión ARNi NtHMA que comprenden: una construcción ARNi NtHMA que tiene por lo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, y 99% de identidad de secuencia a una secuencia seleccionada del grupo que consiste de: exón 1 (SEQ ID NO:5), un fragmento de exón 1 (SEQ ID NO:5), exón 2 (SEQ ID NO:7), un fragmento de exón 2 (SEQ ID NO:7), exón 3 (SEQ ID NO:9), un fragmento de exón 3 (SEQ ID NO:9), exón 4 (SEQ ID NO:11), un fragmento de exón 4 (SEQ ID NO: 11), exón 5 (SEQ ID NO: 13), un fragmento de exón 5 (SEQ ID NO:13), exón 6 (SEQ ID NO:15), un fragmento de exón 6 (SEQ ID NO:15), exón 7 (SEQ ID NO:17), un fragmento de exón 7 (SEQ ID NO:17), exón 8 (SEQ ID NO:19), un fragmento de exón 8 (SEQ ID NO:19), exón 9 (SEQ ID NO:21), un fragmento de exón 9 (SEQ ID NO:21), exón 10 (SEQ ID NO:23), un fragmento de exón 10 (SEQ ID NO:23), exón 11 (SEQ ID NO:25), y un fragmento de exón 11 (SEQ ID NO:25).

[0086] Varias realizaciones se dirigen a vectores de expresión ARNi NtHMA que comprenden: una construcción ARNi NtHMA que codifica polinucleótidos de ARNi NtHMA capaces de autohibridarse para formar una estructura de horquilla, en la que la construcción ARNi comprende (a) una primera secuencia que tiene por lo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, y 99% de identidad de secuencia para la SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:47; (b) una segunda secuencia que

codifica un elemento separador del polinucleótido ARNi NtHMA que forma un bucle de la estructura de horquilla; y (c) una tercera secuencia que comprende una secuencia complementaria inversa de la primera secuencia, posicionada en la misma orientación como la primera secuencia, en donde la segunda secuencia se posiciona entre la primera secuencia y la tercera secuencia, y la segunda secuencia se liga operablemente a la primera secuencia y a la tercera secuencia.

[0087] Varias realizaciones se dirigen a vectores de expresión ARNi NtHMA que comprenden: una construcción ARNi NtHMA que codifica polinucleótidos de ARNi NtHMA capaces de autohibridarse para formar una estructura de horquilla, en la que la construcción ARNi comprende (a) una primera secuencia que tiene por lo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, y 99% de identidad de secuencia para la SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:47; (b) una segunda secuencia que codifica un elemento separador del polinucleótido ARNi NtHMA que forma un bucle de la estructura de horquilla; y (c) una tercera secuencia que comprende una secuencia complementaria inversa de la primera secuencia (SEQ ID NO:46 o SEQ ID NO:48), posicionada en la misma orientación como la primera secuencia, en donde la segunda secuencia se posiciona entre la primera secuencia y la tercera secuencia, y la segunda secuencia se liga operablemente a la primera secuencia y a la tercera secuencia.

[0088] Varias realizaciones se dirigen a vectores de expresión ARNi NtHMA que comprenden: una construcción ARNi NtHMA que comprende una primera secuencia que tiene "similitud sustancial," o que tiene por lo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, y 99% de identidad de secuencia para la SEQ ID NO:3, o porciones de la SEQ ID NO:3. Varias realizaciones se dirigen a vectores de expresión ARNi NtHMA que comprenden una construcción ARNi

NtHMA que comprende una primera secuencia que tiene "similitud sustancial," o que tiene por lo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, y 99% de identidad de secuencia para la SEQ ID NO:47, o porciones de la SEQ ID NO:47.

[0089] Varias realizaciones se dirigen a vectores de expresión ARNi NtHMA que comprenden: una construcción ARNi NtHMA que comprende una segunda secuencia que tiene "similitud sustancial," o que tiene por lo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, y 99% de identidad de secuencia a una secuencia seleccionada del grupo que consiste de: intrón 1 (SEQ ID NO:4), un fragmento de intrón 1 (SEQ ID NO:4), intrón 2 (SEQ ID NO:6), un fragmento de intrón 2 (SEQ ID NO:6), intrón 3 (SEQ ID NO:8), un fragmento de intrón 3 (SEQ ID NO:8), intrón 4 (SEQ ID NO: 10), un fragmento de intrón 4 (SEQ ID NO:10), intrón 5 (SEQ ID NO:12), un fragmento de intrón 5 (SEQ ID NO:12), intrón 6 (SEQ ID NO:14), un fragmento de intrón 6 (SEQ ID NO:14), intrón 7 (SEQ ID NO:16), un fragmento de intrón 7 (SEQ ID NO:16), intrón 8 (SEQ ID NO:18), un fragmento de intrón 8 (SEQ ID NO:18), intrón 9 (SEQ ID NO:20), un fragmento de intrón 9 (SEQ ID NO:20), intrón 10 (SEQ ID NO:22), un fragmento de intrón 10 (SEQ ID NO:22), intrón 11 (SEQ ID NO:24), un fragmento de intrón 11 (SEQ ID NO:24), intrón 12 (SEQ ID NO:26), y un fragmento de intrón 12 (SEQ ID NO:26). Alternativamente, la segunda secuencia de la construcción ARNi NtHMA se puede generar aleatoriamente sin utilizar una secuencia de intrón derivada del gen NtHMA (SEQ ID NO:1).

[0090] Varias realizaciones se dirigen a vectores de expresión ARNi NtHMA que comprenden: una construcción ARNi NtHMA que comprende una tercera secuencia que tiene "similitud sustancial," o que tiene por lo menos 70%, 75%,

80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, y 99% de identidad de secuencia para la SEQ ID NO:46, o porciones de la SEQ ID NO:46. Varias realizaciones se dirigen a vectores de expresión ARNi NtHMA que comprenden una construcción ARNi NtHMA que comprende una tercera secuencia que tiene "similitud sustancial," o que tiene por lo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, y 99% de identidad de secuencia para la SEQ ID NO:48, o porciones de la SEQ ID NO:48.

[0091] Varias realizaciones se dirigen a vectores de expresión ARNi NtHMA que comprenden: una construcción ARNi NtHMA que comprende una tercera secuencia que tiene "similitud sustancial," o que tiene por lo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, y 99% de identidad de secuencia a una secuencia complementaria inversa seleccionado del grupo que consiste de: SEQ ID NO:27 (exón 1), un fragmento de la SEQ ID NO:27 (exón 1), SEQ ID NO:28 (exón 2), un fragmento de la SEQ ID NO:28 (exón 2), SEQ ID NO:29 (exón 3), un fragmento de la SEQ ID NO:29 (exón 3), SEQ ID NO:30 (exón 4), un fragmento de la SEQ ID NO:30 (exón 4), SEQ ID NO:31 (exón 5), un fragmento de la SEQ ID NO:31 (exón 5), SEQ ID NO:32 (exón 6), un fragmento de la SEQ ID NO:32 (exón 6), SEQ ID NO:33 (exón 7), un fragmento de la SEQ ID NO:33 (exón 7), SEQ ID NO:34 (exón 8), un fragmento de la SEQ ID NO:34 (exón 8), SEQ ID NO:35 (exón 9), un fragmento de la SEQ ID NO:35 (exón 9), SEQ ID NO:36 (exón 10), un fragmento de la SEQ ID NO:36 (exón 10), SEQ ID NO:37 (exón 11), y un fragmento de la SEQ ID NO:37 (exón 11).

[0092] Varias realizaciones se dirigen a vectores de expresión ARNi NtHMA que comprenden una construcción ARNi NtHMA que comprende: la SEQ ID NO:38 ("secuencia codificante/fragmento"), la segunda secuencia comprende la SEQ ID

NO:39 ("secuencia separadora/fragmento") y la tercera secuencia comprende la SEQ ID NO:40 ("secuencia anticodificante/fragmento").

[0093] Varias realizaciones se dirigen a vectores de expresión ARNi NtHMA que comprenden una construcción ARNi NtHMA que comprende: la SEQ ID NO:42 ("secuencia codificante/fragmento"), la segunda secuencia comprende la SEQ ID NO:43 ("secuencia separadora/fragmento"), y la tercera secuencia comprende la SEQ ID NO:44 ("secuencia anticodificante/fragmento").

[0094] Alternativamente, se pueden utilizar las secuencias descritas para construir varios polinucleótidos NtHMA que no forman estructuras de horquilla. Por ejemplo, un ARN bicatenario largo NtHMA se puede formar al (1) transcribir una primera hebra del cADN NtHMA al ligar operablemente a un primer promotor, y (2) transcribir la secuencia complementaria inversa de la primera hebra del fragmento cADN NtHMA al ligar operablemente a un segundo promotor. Cada hebra del polinucleótido NtHMA se puede transcribir del mismo vector de expresión, o de diferentes vectores de expresión. El dúplex ARN NtHMA que tiene actividad de interferencia de ARN se puede convertir enzimáticamente a los siARN para reducir los niveles de ARN NtHMA.

[0095] C. Vectores de Expresión para Reducir la Expresión Génica NtHMA mediante
Co- supresión.

[0096] Se proporcionan varias composiciones y métodos para reducir los niveles de expresión endógenos para miembros de la familia del gen NtHMA al promover la co-supresión de la expresión génica de NtHMA. El fenómeno de co- supresión

ocurre como un resultado de introducir múltiple copias de un transgen en un anfitrión de célula de planta. La integración de múltiples copias de un transgen puede resultar en la expresión reducida del transgen y el gen endógeno objetivo. El grado de cosupresión es dependiente del grado de identidad de secuencia entre el transgen y el gen endógeno objetivo. El silenciamiento del gen endógeno y el transgen puede ocurrir mediante metilación extensiva de los locus silenciados (es decir, el promotor endógeno y el gen endógeno de interés) que pueden precluir la transcripción. Alternativamente, en algunos casos, la co-supresión del gen endógeno y el transgen puede ocurrir mediante silenciamiento génico post transcripcional ("PTGS"), en los que se pueden producir transcriptos pero los índices mejorados de degradación precluyen la acumulación de los transcriptos. El mecanismo de co- supresión mediante PTGS se considera que se parece a la interferencia de ARN, en que ARN parece ser un iniciador importante y un objetivo en estos procesos, y se puede mediar por lo menos en parte mediante la misma maquinaria molecular, posiblemente a través De degradación guiada por ARN del mARN.

[0097] La cosupresión de los miembros de la familia del gen NtHMA se pueden alcanzar al integral múltiples copias del cADN NtHMA o fragmento del mismo, como transgenes, en el genoma de una planta de interés. La planta anfitrión se puede transformar con un vector de expresión que comprende un promotor ligado operablemente al cADN NtHMA o fragmento del mismo. Varias realizaciones se dirigen a vector de expresión para promover la co-supresión de genes endógenos de la Familia NtHMA que comprende: un promotor ligado operablemente al cADN NtHMA identificado como el clon P6663 (SEQ ID NO:3) o un fragmento del mismo, o cADN NtHMA identificado como el clon P6643 (SEQ ID NO:47) o un fragmento del mismo. Varias realizaciones se dirigen a vectores de expresión para promover

180

la cosupresión de genes endógenos de la familia NtHMA que comprende: un promotor ligado operablemente al cADN NtHMA, o un fragmento de los mismos, que tiene por lo menos aproximadamente 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:47.

[0098] Varias realizaciones se dirigen a métodos para reducir el nivel de expresión de genes endógenos de la familia NtHMA al integrar múltiples copias del cADN NtHMA o un fragmento del mismo en un genoma de planta, que comprende: transformar un anfitrión de célula de planta con un vector de expresión que comprende un promotor ligado operablemente a la SEQ ID NO:3, o un fragmento del mismo; o SEQ ID NO:47, o un fragmento del mismo. Varias realizaciones se dirigen a métodos para reducir el nivel de expresión de genes endógenos de la familia NtHMA al integrar múltiples copias del cADN NtHMA, o un fragmento del mismo, en un genoma de planta, que comprende: transformar un anfitrión de célula de planta con un vector de expresión que comprende un promotor ligado operablemente al cADN NtHMA, o un fragmento del mismo, que tiene por lo menos aproximadamente 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:47.

[0099] D. Vectores de Expresión para Reducir la Expresión Génica de NtHMA mediante la Inhibición de la Transducción por Agente Anticodificante

[0100] Se proporcionan varias composiciones y métodos para reducir el nivel de expresión endógeno de la familia del gen NtHMA al inhibir la transducción del mARN NtHMA. Una célula de planta anfitriona se pueden transformar con un vector de expresión que comprende: un promotor ligado operablemente al cADN NtHMA o un fragmento del mismo, posicionado en una orientación anticodificante

con respecto al promotor para permitir la expresión de polinucleótidos ARN que tiene una secuencia complementaria a una porción de mARN NtHMA. Varios vector de expresión para inhibir la traducción de mARN HMA comprenden: un promotor ligado operablemente al cADN NtHMA identificado como el clon P6663 (SEQ ID NO:3) o un fragmento del mismo; o cADN NtHMA identificado como el clon P6643 (SEQ ID NO:47) o un fragmento del mismo, en el que cADN NtHMA, o el fragmento del mismo, se posiciona en la orientación anticodificante con respecto al promotor. Varios vector de expresión para inhibir la traducción del mARN HMA comprenden: un promotor ligado operablemente a un cADN NtHMA, o un fragmento del mismo, que tiene por lo menos aproximadamente 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:47, en el que cADN NtHMA, o el fragmento del mismo, se posiciona en una orientación anticodificante con respecto al promotor. Las longitudes de polinucleótidos ARN NtHMA anticodificantes pueden variar, incluyendo 15-20 nucleótidos, 20-30 nucleótidos, 30-50 nucleótidos, 50-75 nucleótidos, 75-100 nucleótidos, 100-150 nucleótidos, 150-200 nucleótidos, y 200-300 nucleótidos.

[0101] Varias realizaciones se dirigen a métodos para reducir el nivel de la expresión de genes endógenos de la familia NtHMA al inhibir la traducción del mARN NtHMA, que comprende: transformar un anfitrión de célula de planta con un vector de expresión que comprende un promotor ligado operablemente al cADN NtHMA identificado como el clon P6663 (SEQ ID NO:3) o un fragmento del mismo; o cADN NtHMA identificado como el clon P6643 (SEQ ID NO:47) o un fragmento del mismo, en el que cADN NtHMA, o el fragmento del mismo, se posiciona en una orientación anticodificante con respecto al promotor. Varias realizaciones se dirigen a métodos para reducir el nivel de la expresión de genes endógenos de la

182

familia NtHMA al inhibir la traducción mARN NtHMA, que comprende: transformar un anfitrión de célula de planta con un vector de expresión que comprende un promotor ligado operablemente a un cADN NtHMA, o un fragmento del mismo, que tiene por lo menos aproximadamente 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:47, en el que cADN NtHMA, o el fragmento del mismo, se posiciona en una orientación anticodificante con respecto al promotor.

[0102] E. Otras Composiciones y Métodos para Reducir la Expresión Génica del NtHMA.

[0103] Los métodos para obtener variantes conservadoras y más variantes divergentes de los polinucleótido NtHMA y polipéptido se conocen por las personas expertas en la técnica. Cualquier planta de interés se puede modificar genéticamente mediante varios métodos conocidos para inducir mutagenia, que incluyen mutagenia dirigida al sitio, mutagenia dirigida a oligonucleótidos, mutagenia inducida químicamente, mutagenia inducida irradiación , y otros métodos equivalentes. Por ejemplo, se describe la mutagenia dirigida al sitio en, por ejemplo, Smith (1985) "In vitro mutagenesis," Ann. Rev. Genet. 19:423-462, y referencias citadas allí, tal como Botstein & Shortle (1985) "Strategies and Applications of in vitro Mutagenesis," Science 229:1193-1201; y en Carter (1986) "Site-directed mutagenesis," Biochem. J. 237:1-7. La mutagenia dirigida a oligonucleótidos se describe en, por ejemplo, Zoller & Smith (1982) "Oligonucleotide-directed Mutagenesis using M13-derived Vectors: an Efficient and General Procedure for the Production of Point mutations in any DNA Fragment," Nucleic Acids Res. 10:6487-6500. La mutagenia que utiliza bases modificada se describen en, por ejemplo, Kunkel (1985) "Rapid and Efficient Site-specific

Mutagenesis without Phenotypic Selection," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488-492, y en Taylor et al. (1985) "The Rapid Generation of Oligonucleotide-directed Mutations at High Frequency using Phosphorothioate-modified DNA," Nucl. Acids Res. 13: 8765-8787. La mutagenia que utiliza ADN dúplex espaciado se describe en, por ejemplo, Kramer et al. (1984) "The Gapped duplex ADN Approach to Oligonucleotide-directed Mutation Construction," Nucl. Acids Res. 12: 9441-9460). La mutagenia de emparejamiento incorrecto de punto se describe en, por ejemplo, Kramer et al. (1984) "The Gapped Duplex ADN Approach to Oligonucleotide-directed Mutation Construction," Nucl. Acids Res. 12: 9441-9460). La mutagenia de ruptura de doble hebra se describe en, por ejemplo, Kramer et al. (1984) "Point Mismatch Repair," Cell 38:879-887). La mutagenia de ruptura bicatenaria se describe en, por ejemplo, Mandecki (1986) "Oligonucleotide-directed Double-strand Break Repair in Plasmids of Escherichia coli: A Method for Site-specific Mutagenesis," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:7177-7181, y en Arnold (1993) "Protein Engineering for Unusual Environments," Current Opinion in Biotechnology 4:450-455). La mutagenia que utiliza cepas de anfitrión de reparación deficiente se describen en, por ejemplo, Carter et al. (1985) "Improved Oligonucleotide Site-directed Mutagenesis using M13 Vectors," Nucl. Acids Res. 13: 4431-4443. La mutagenia mediante síntesis génica total se describe en, por ejemplo, Nambiar et al. (1984) "Total Synthesis and Cloning of a Gene Coding for the Ribonuclease S Protein," Science 223: 1299-1301. La mezcla de ADN se describe en, por ejemplo, Stemmer (1994) "Rapid Evolution of a Protein in vitro by DNA Shuffling," Nature 370:389- 391, y en Stemmer (1994) "DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: In Vitro Recombination for Molecular Evolution," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10747-10751.

[0104] Alternativamente, los genes de NtHMA se pueden dirigir para inactivación al introducir transposones (y elementos IS) en los genomas de las plantas de interés. Estos elementos genéticos móviles se pueden introducir mediante fertilización cruzada sexual y los mutantes de inserción se pueden seleccionar para perdida en actividad NtHMA, tal como transporte Cd reducido. El gen NtHMA interrumpido en una planta pariente se puede introducir en otras plantas al cruzar la planta pariente con la planta no sujeta a mutagenia inducida por transposón mediante, por ejemplo, fertilización cruzada sexual. Cualquier técnica de cultivo estándar conocidas por los expertos en la técnica se pueden utilizar. En una realización, uno o más genes relacionados con NtHMA- se pueden inactivar mediante la inserción de uno o más transposones. Las mutaciones puede resultar en interrupción homocigota de uno o más genes de NtHMA, en interrupción heterocigoto de uno o más genes de NtHMA, o una combinación de ambas interrupciones homocigotas y heterocigotos sí interrumpe más de un gen NtHMA. Los elementos transponibles adecuado se pueden seleccionar de dos amplias clases, designadas como clases I y clases II. Los elementos transponibles de la clase I adecuados incluyen retrotransposones, retroposones, y elementos similares a SINE. Tales métodos son conocidos por expertos en la técnica como se describe en Kumar and Bennetzen (1999), Plant Retrotransposons in Annual Review of Genetics 33:479.

[0105] Alternativamente, los genes NtHMA se pueden dirigir para inactivación mediante un método denominado como detección de Lesiones Locales Inducidas en genomas ("TILLING"), que combina mutaciones de punto de alta densidad con detección sensible rápida de mutaciones. Típicamente, las semillas de las plantas se exponen a mutágenos, tal como etilmetanesulfonato (EMS) o alquilatos guanina EMS, que conduce típicamente a emparejamiento erróneo. Los agentes

adecuados y métodos son conocidos por los expertos en la técnica como se describe en McCallum et al., (2000), "Targeting Induced Local Lesions IN Genomics (TILLING) for Plant Functional Genomics," Plant Physiology 123:439-442; McCallum et al., (2000) "Targeted screening for induced mutations," Nature Biotechnology 18:455-457; y Colbert et al.,

[0106] Alternativamente, los genes NtHMA se pueden dirigir para inactivación al introducir ribozimas derivadas de un numero de ARN circular pequeño que son capaces de auto división y replicación en plantas.. Estos ARN se pueden replicar ya sea solos (ARN viroide) o con un virus auxiliar (ARN satélite). ejemplos de ARN adecuados incluye aquellos derivados de viroide de mancha del sol del aguacate y ARN satélite derivado del virus de la mancha anular del tabaco, virus del veteado transitorio de la alfalfa, virus del moteado aterciopelado del tabaco, virus moteado del solanum nodiflorum, y virus moteado del trébol subterráneo. Se conocen varias ribozimas especificas de ARN objetivo por los expertos en la técnica como se describe en Haseloff et al. (1988) Nature, 334:585-591.

[0107] III. Plantas Transgénicas, Estirpes Celulares, y Polinucleótidos ARNi NtHMA que Comprenden Semillas y Métodos Correlacionados

[0108] Varias realizaciones se dirigen a plantas transgénicas modificadas genéticamente para reducir el nivel de expresión del gen NtHMA mediante varios métodos que se pueden utilizar para silenciar las expresión del gen NtHMA, y por lo tanto, producir plantas transgénicas en las que la expresión del nivel de los Transportadores NtHMA se pueden reducir dentro de tejidos de planta de interés. Los índices de patrones de distribución y transporte de metal pesado del trasporte de metal pesado, en particular, transporte de cadmio, se pueden alterar en plantas

transgénicas producidas de acuerdo con las composiciones y métodos descrito. La planta adecuada para modificación genética incluye monocotiledóneas y dicotiledóneas.

[0109] Varias realizaciones se dirigen a plantas de tabaco transgénicas modificadas genéticamente para reducir el nivel de expresión de NtHMA en gen mediante varios métodos, conocidos por personas expertas en la técnica, que se pueden utilizar para regular por descenso la expresión de gen NtHMA, y por lo cual, producir plantas de tabaco transgénicas en las que el nivel de expresión de los transportadores NtHMA se puede reducir dentro de los tejidos de plantas de interés. Varios vectores de expresión se han proporcionado para producir estirpes transgénicas de tabaco de cualquier variedad que exhibe niveles de expresión de gen NtHMA reducidos. Las composiciones y métodos descritos se pueden aplicar a cualesquier especies de plantas de interés, que incluyen plantas del género *Nicotiana*, varias especies de *Nicotiana*, que incluyen *N. rustica* y *N. tabacum* (por ejemplo, LA B21, LN KY171, TI 1406, Basma, Galpao, Perique, Beinhart 1000-1, y Petico). Otras especies incluyen *N. acaulis*, *N. acuminata*, *N. acuminata var. multiflora*, *N. africana*, *N. alata*, *N. amplexicaulis*, *N. arentsii*, *N. attenuata*, *N. benavidesii*, *N. benthamiana*, *N. bigelovii*, *N. bonariensis*, *N. cavicola*, *N. clevelandii*, *N. cordifolia*, *N. corymbosa*, *N. debneyi*, *N. excelsior*, *N. forgetiana*, *N. fragrans*, *N. glauca*, *N. glutinosa*, *N. goodspeedii*, *N. gossei*, *N. hybrid*, *N. ingulba*, *N. kawakamii*, *N. knightiana*, *N. langsdorffii*, *N. linearis*, *N. longiflora*, *N. maritima*, *N. megalosiphon*, *N. miersii*, *N. noctiflora*, *N. nudicaulis*, *N. obtusifolia*, *N. occidentalis*, *N. occidentalis subsp. hesperis*, *N. otophora*, *N. paniculata*, *N. pauciflora*, *N. petunioides*, *N. plumbaginifolia*, *N. quadrivalvis*, *N. raimondii*, *N. repanda*, *N. rosulata*, *N. rosulata subsp. ingulba*, *N. rotundifolia*, *N. setchellii*, *N. simulans*, *N. solanifolia*, *N. spegazzinii*, *N. stocktonii*, *N. suaveolens*, *N. sylvestris*,

187

N. thyrsiflora, *N. tomentosa*, *N. tomentosiformis*, *N. trigonophylla*, *N. umbratica*, *N. undulata*, *N. velutina*, *N. wigandioides*, y *N. x sanderae*. Las plantas adecuadas para la transformación incluyen cualesquier tejidos de planta capaces de transformación mediante varios métodos para transformar plantas conocidos por personas expertas en la técnica, que incluyen electroporación , bombardeo de microproyectil, y transferencia como se describe, por ejemplo, en la Patente Estadounidense . No. 4,459,355 que describe un método para transformar plantas susceptibles, que incluyen dicotiledóneas, con una cepa de *Agrobacterium* que contiene un plásmido Ti; Patente Estadounidense No. 4,795,855 que describe la transformación de plantas leñosas con un vector de *Agrobacterium*; Patente Estadounidense No. 4,940,838 que describe un vector de *Agrobacterium* binario; Patente Estadounidense No. 4,945,050; y Patente Estadounidense No. 5,015,530.

[0110] Varias realizaciones se dirigen a plantas de tabaco transgénicas modificadas genéticamente para expresar exógenamente una construcción de ARNi que codifica polinucleótidos de ARNi NtHMA que facilitan la degradación de transcriptos de ARN NtHMA, y consecuentemente, que reducen el número de transcriptos de ARN disponibles para la traducción en transportadores NtHMA. Varias realizaciones se dirigen a plantas transgénicas que comprenden un vector de expresión que posibilita la expresión de polinucleótidos NtHMA producida de acuerdo con los métodos descritos. Varias realizaciones se dirigen a estirpes celulares derivadas de plantas transgénicas producidas de acuerdo con los métodos descritos. Varias realizaciones se dirigen a semillas transgénicas derivadas de plantas transgénicas producidas de acuerdo con los métodos descritos.

[0111] Varias realizaciones se dirigen con métodos para reducir los niveles de expresión de gen NtHMA en plantas, el método comprende reducir el nivel de expresión de un gen NtHMA, que se puede lograr mediante varios métodos conocidos por personas expertas en la técnica. Como ejemplos, esta especificación describe: (1) método de interferencia de ARN para reducir nivel en fase estacionaria de variantes de ARN NtHMA endógenas disponibles para traducción mediante expresión de los polinucleótidos de ARNi NtHMA; (2) método de cosupresión para reducir la trascripción de genes NtHMA al integrar múltiples copias de NtHMA cADN o fragmentos de los mismos, como transgenes, en un genoma de planta; (3) método anticodificante para reducir la traducción de NtHMA mediante la expresión de polinucleótidos anticodificantes que pueden objetivar el ARN NtHMA; y (4) varios métodos para inducir mutagenia.

[0112] Varias realizaciones se dirigen a plantas de tabaco transgénicas modificadas genéticamente para reducir el nivel de expresión de NtHMA en gen mediante varios métodos, conocidos por personas expertas en la técnica, y modificadas adicionalmente ya sea para reducir la expresión de un segundo gen endógeno de interés (es decir, no relacionados con NtHMA) o para mejorar la expresión de un gen exógeno de interés (es decir, no relacionado con NtHMA). Por ejemplo, puede ser deseable la regulación descendente de un segundo gen endógeno de interés que codifica una enzima involucrada en la biosíntesis de alcaloides. En otras situaciones, la mejora en el nivel de expresión de un trasgen que codifica una proteína recombinante de interés, tal como una hormona humana para uso terapéutico, puede ser deseable. Las personas expertas en la técnica son capaces de producir varias plantas transgénicas que se pueden modificar, por ejemplo, para expresar exógenamente polinucleótidos de ARNi NtHMA y por lo menos un producto de gen recombinante de interés, tal como un factor de

crecimiento humano recombinante o polinucleótidos de ARNi que pueden objetivar un segundo gen de interés no relacionado con la familia NtHMA.

[0113] Producir plantas transgénicas de acuerdo con los métodos descritos proporciona un número de ventajas. Las plantas transgénicas, que incluyen plantas de tabaco transgénicas, se pueden hacer crecer en suelos que contienen concentraciones de Cd variables, o en suelos que contienen menos concentraciones de Cd deseables. Estas plantas transgénicas y semillas derivadas pueden proporcionar más opciones para cultivarlas en un rango más amplio de ambientes de suelo, que pueden incrementar la cantidad de suelos cultivables disponibles para profesionales (por ejemplo, agricultores). Adicionalmente, estas plantas transgénicas, que exhiben contenido de Cd reducido, comparadas con contrapartes no transgénicas se pueden consumir directamente como productos comestibles. El consumo de porciones comestibles de estas plantas transgénicas puede ser una opción más saludable comparada con el consumo de contrapartes no transgénicas. Las plantas adecuadas que se pueden modificar genéticamente de acuerdo con los métodos descritos, incluyen plantas cultivables para uso agrícola, que incluyen arroz, maíz, calabaza, soya, lechuga, papas, remolachas, hierbas, trigo, cebada, zanahorias, etc. El % reducción de Cd en estas plantas transgénicas, que incluyen la lámina de la hoja porción , puede ser aproximadamente por lo menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, y 99%, cuando se compara con contrapartes no transgénicas. El contenido de Cd de estas plantas transgénicas, que incluyen la lámina de la porción hoja, es un valor de un rango de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 0.05 ppm, de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 0.1 ppm, de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 0.5 ppm, de

aproximadamente 0.01 a aproximadamente 1.0 ppm, y de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 5 ppm.

[0114] IV. Productos Consumibles que Incorporan Hojas de Tabaco Genéticamente Modificadas para Contenido de Cd Reducido

[0115] Varias realizaciones proporcionan plantas transgénicas en la que los nivel de expresión de los miembros de la familia del gen NtHMA se reducen sustancialmente para reducir o impedir el transporte Cd en la lámina de la hoja. La lámina de la hoja derivadas de plantas de tabaco transgénica, producidas de acuerdo con los métodos descritos, se pueden incorporar en varios productos consumibles que contienen Cd a un nivel sustancialmente por debajo de aquel de los productos consumibles hechos al incorporar hojas de tabaco derivadas de plantas del mismo genotipo que se hacen crecer bajo condiciones idénticas, pero no modificadas genéticamente con respecto a los niveles de expresión reducidos de miembros de la familia del gen NtHMA ("contrapartes no transgénicas ").

[0116] En algunas realizaciones, estas plantas transgénicas que exhiben contenido de Cd reducido comparado con contrapartes no transgénicas se pueden incorporar en productos consumibles, y productos de tabaco no fumables, tal como cigarros, cigarrillos, (es decir, no combustibles). Los artículos para fumar y los productos de tabaco no fumables producidos al incorporar hojas de tabaco derivadas de planta de tabaco genéticamente modificadas para contener niveles reducidos de Cd de acuerdo con el método descrito, pueden proporcional opciones más saludables comparados con las contrapartes no transgénicas.

[0117] Los productos de tabaco no fumables que incorporan platas de tabaco modificadas genéticamente de acuerdo con el método descrito se pueden fabricar en cualquier formato adecuado para el confort en una cavidad oral del consumidor. Los productos de tabaco fumables contienen tabaco en cualquier forma, que incluye partículas secas, trozos, gránulos, polvos, o una suspensión (es decir, extracto de tabaco), depositado en, mesclado en, rodeado por, o combinado de otra forma con otros ingredientes en cualquier formato, tal como hojuelas, películas, etiquetas, espumas, o glóbulos. Los productos de tabaco no fumables se pueden envolver con un material,, que puede se comestible (es decir, desintegrable oralmente) o no comestible. Los contenidos líquidos de los productos de tabaco no fumables se pueden encerrar en cualquier forma, tal como glóbulos, para precluir la interacción con una envoltura soluble en agua. La envoltura puede tener una forma tal como una bolsa para encerrar parcial o completamente composiciones que incorporan tabaco, o para funcionar como un adhesivo para sostener una pluralidad de lengüetas, glóbulos u hojuelas de tabaco. Una envoltura también puede encerrar una composición de tabaco moldeable que constituye la forma de una boquilla de consumidor. Una envoltura desintegrable oralmente puede cerrar tabaco no fumable, por ejemplo, como tabaco soluble o rapé seco, y se puede formar en termoformado continuo o equipo de forma horizontal /carga/sello u otro equipo de empaque adecuado que utiliza películas comestibles (que puede o no contener tabaco). Los materiales de ejemplo para construir una envoltura incluyen una composición de películas que comprenden HPMC, CMC, pectina, alginatos, pululan, y polímero formadores de películas comestibles, viables comercialmente. Otros materiales de envoltura pueden incluir capsulas pre-formadas producidas de gelatina, HPMC, almidón/carragenina, y otros materiales disponibles comercialmente. Tales materiales de envoltura pueden incluir tabaco como un ingrediente. Las envolturas

que no se desintegran oralmente pueden estar compuestas de telas tejidas o no tejidas, de papel recubierto o no recubierto, o de películas plásticas porosas perforadas o de otra forma. La envolturas pueden incorporar agentes saborizantes y/o colorantes. Los productos no fumables se pueden ensamblar con una envoltura que utiliza cualquier método conocido por los expertos en la técnica de empaque comercial, que incluye métodos tal como empaque de burbuja y empaque de barra, en el que un empaque pequeño se pueden formar mediante un maquina de empaque de forma vertical /carga/sello.

[0118] El % de reducción Cd en estos artículos fumables y productos no fumables, producidos al incorporar hojas de tabaco derivadas de plantas de tabaco modificadas genéticamente para contener niveles Cd reducidos, es de un valor de por lo menos aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, y 100%, cuando se compara con productos consumibles derivados de contrapartes no transgénicas. En algunas realizaciones, el contenido Cd de estos artículos fumables y productos no fumables, producidos al incorporar hojas de tabaco derivadas de plantas de tabaco modificada genéticamente para contener niveles reducidos de Cd, es de un valor de un rango de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 0.05 ppm, de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 0.1 ppm, de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 0.5 ppm, de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 1.0 ppm, y de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 5 ppm.

[0119] El grado de acumulación Cd en plantas se pueden variar substancialmente dependiendo de varios parámetros atribuidos a la complejidad del genotipo y el ambiente de crecimiento. Por ejemplo, concentraciones Cd en hojas de tabaco

que crecen en campo pueden ser extremadamente variables dependiendo de factores tales como el agro-clima, parámetros de suelo, y cultivos. Adicionalmente, los patrones de distribución Cd relativos dentro de diferentes porciones de una planta de tabaco pueden variar de acuerdo con las especies, el órgano/tejido, y las condiciones de crecimiento (es decir, crecimiento en campo vs. Crecimiento hidropónico). Otro medio, las concentraciones Cd medidas en hojas de tabaco que crecen en campo (que incluyen venas y vena central) pueden estar en el rango de aproximadamente 0.5 a 5 ppm (partes por millones, o ug/g de peso seco de hojas de tabaco). Sin embargo, muchos niveles de Cd publicados típicamente no definen la etapa de madurez del tabaco, la variedad del tabaco, o las porciones de hoja particular (es decir, remoción de posición del tallo de la hojas) cosechadas para análisis. En algunas variedades, las hojas menores pueden acumular mayores niveles de Cd que las hojas medias y superiores. En el nivel intracelular, se puede encontrar Cd en varios componentes celulares de una célula de planta, que incluyen una pared celular, citoplasma, cloroplastos, núcleo, y vacuolas.

[0120] Adicionalmente, el contenido Cd medidos en hojas de tabaco puede variar sustancialmente dependiendo de los niveles de Cd en el ambiente del suelo en donde crecen las plantas de tabaco. Las hojas de tabaco crecen en áreas contaminadas de Cd pueden acumular Cd de aproximadamente 35 ppm o más, comparado las hojas de las contraparte genéticamente idénticas que crecen en áreas no contaminadas, que pueden acumular Cd en un rango de aproximadamente 0.4 a aproximadamente 8 ppm. Las vacuolas dentro de las hojas de las plantas crecen en áreas contaminadas con Cd y pueden acumular muy alta concentración de Cd. Métodos para modificar las composiciones descritas a ser adecuadas para una especie de planta dada de interés se conocen por los expertos en la técnica.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

Clonación y Mapeo de Exón de un Clon Genómico NtHMA de *Nicotiana* de Longitud Completa

[0121] Dos clones genómicos parciales que representan porciones diferentes de un gen NtHMA endógeno se identifican independientemente, denominados como "CHO_OF96xf01.ab1" y "CHO_OF261xo09c1.ab1." Con base en la información de secuencia obtenida de los clones genómicos parciales, un clon genómico de longitud completa (_HO-18-2) y 4 cADN NtHMA de longitud completa se identifican posteriormente, incluyendo el clon P6663 (SEQ ID NO:3) y clon P6643 (SEQ ID NO:47). Se mapean las subregiones del exón e intrón del clon genómico de longitud completa (JHO-18-2) (17,921 bp). Como se muestra en la figura 1, el gen NtHMA endógeno, de longitud completa clonado de *Nicotiana* comprende 11 exones que consisten de 3392 nucleótidos en total.

EJEMPLO 2

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

[0122] La Tabla 1 proporciona una lista de posiciones de nucleótido mapeadas para cada exón dentro del clon genómico NtHMA aislado (SEQ ID NO: 1).

Tabla 1

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

El clon genómcio parcial CHO_OF96xf01.ab1 incluye una parte de intrón 4, exón 4, intrón 5, exón 5, intrón 6, y una parte de exón 6, como se muestra en la figura 1, y se lista bajo la Tabla 1. El clon genómico parcial CHO_OF261xo09c1 incluye una parte de intrón 7, exón 7, intrón 8, exón 8, y una parte de exón 9, como se muestra en la figura 1. Para producir plantas transgénicas que puedan producir establemente polinucleótidos de ARNi NtHMA recombinantes de interés que puedan facilitar la degradación de transcriptos endógenos de ARN que codifican polipéptidos NtHMA, dos conjuntos de vectores de expresión ARN NtHMAi, el vector de expresión ARNi PB1121 -NtHMA (660-915) como se describe adicionalmente adelante, y el vector de expresión ARNi PB1121 -NtHMA (1382-1584) ARNi como se describe adicionalmente en el Ejemplo 3.

[0123] La figura 2 ilustra una estrategia de subclonación de ejemplo para construir un vector de expresión ARN NtHMAi que permite la expresión constitutiva de los polinucleótidos de ARNi NtHMA de interés. Con base en el mapeo de exón y análisis de secuencia de clon genómico CHO_OF96xf01.ab1, se designan construcciones de ARNi.

196

[0124] La figura 3A muestra una secuencia de ARNi de ejemplo, NtHMA (660-915), para producir polinucleótidos de ARNi NtHMA de interés. En la figura 3A, la construcción ARN NtHMAi ARNi (SEQ ID NO: 41) comprende un fragmento codificante (272 bp) (SEQ ID NO:38) compuesto de exón 4 (272 bp), que se posiciona en dirección 5' y se liga operablemente a un fragmento separador (80 bp) (SEQ ID NO:39) compuesto de intrón 5, que se posiciona en dirección 5' y ligado operablemente a un fragmento complementario inverso (272 bp) (SEQ ID NO:40) compuesto de exón 4 posicionado en orientación anticodificante. Las construcciones de ARNi que codifican polinucleótidos de ARNi NtHMA de interés se insertan en el vector de clonación PBKCMV, y se colocan en dirección 3' y se ligan operablemente a un promotor de citomegalovirus (CMV). Los sitios Xbal y HindIII se incorporan en los extremos 5' y 3' del fragmento codificante NtHMA 352bp, que incluye el fragmento de intrón 80bp al utilizar cebadores PCR modificados para incorporar estos sitios de rigurosidad de enzima (PMG783F: ATTCTAGACTGCTGCTATGTCATCACTGG [SEQ ID NO: 50] y PMG783R: ATAAGCTTAGCCTGAAGAATTGAGCAAA [SEQ ID NO: 51]). Similarmente, los sitios Spel y Sacl se incorporan en los extremos 5' y 3' del fragmento complementario inverso NtHMA correspondiente al utilizar cebadores PCR (PMG 785F: ATGAGCTCTGGTTATGTAGGCTACTGCTGCT [SEQ ID NO: 52] y PMG 786R: ATACTAGTATTTGTAGTGCCAGCCCAGA [SEQ ID NO: 53]) para producir el plásmido NtHMAi PBKCMV-ARN. Los vectores de expresión NtHMAi PBI121-ARN se construyen al (a) escindir la β-glucuronidasa ORF del vector de expresión binario ("pBI121" de CLONTECH), y (b) sustituir la construcción ARNi NtHMA, escindida del plásmido NtHMAi PBKCMV-ARN, en los sitios Xbal/Sacl del plásmido PB1121 en lugar de la β- glucuronidasa removida ORF. Los vectores de expresión NtHMAi PB1121 -ARN comprenden: (i) el fragmento codificante bp Xbal-

HindIII NtHMA que incluye (ii) fragmento de intrón 80bp, ligado operablemente al (iii) fragmento complementario inverso 272bp SpeII-SacI NtHMA.

EJEMPLO 3

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

[0125] La figura 4A muestra una secuencia de ARNi de ejemplo, NtHMA (1382-1584), para producir polinucleótidos de ARNi NtHMA de interés. Con base en mapeo de exón y análisis de secuencia de clon genómico CHO_OF261xo09c1, una construcción ARNi (SEQ ID NO: 41) se destina que incluye un fragmento codificante (191 bp) (SEQ ID NO:42) que comprende las secuencias de exón 7, que se posiciona en dirección 5' y se liga operablemente a un fragmento de ADN separador (139 bp) (SEQ ID NO:43) que comprende las secuencias de intrón 8, que se posiciona en dirección 5' y ligado operablemente a un fragmento complementario inverso (196 bp) (SEQ ID NO:44) que comprende las secuencias de exón 7 posicionado en orientación anticodificante. Estas construcciones de ARNi que codifican polinucleótidos de ARNi NtHMA de interés se insertan en el vector de clonación PBKCMV, y se colocan en dirección 3' y se ligan operablemente a un promotor de citomegalovirus (CMV). Los sitios XbaI y HindIII se incorporan en los extremos 5' y 3' del fragmento codificante NtHMA 330 bp, que incluye el fragmento de intrón 139 bp al utilizar cebadores PCR modificados para incorporar estos sitios de rigurosidad de enzima (PMG754F: ATTCTAGATGAGAGCAAGTCAGGTCATCC [SEQ ID NO: 54] y PMG754R: ATAAGCTTTTCAAACATCCACCGCATTA [SEQ ID NO: 55]). Similarmente, los sitios PstI y SacI se incorporan en los extremos 5' y 3' del fragmento complementario inverso NhHMA correspondiente al utilizar cebadores PCR

PMG757F: ATGAGCTCGCATTGAGAGCAAGTCAGGTC [SEQ ID NO: 56] y PMG757R: ATCTGCAGCCTGTGGTACATCCAGCTCTT [SEQ ID NO: 57]) para producir el vector de expresión NtHMAi PBKCMV-ARN.

[0126] Los vectores de expresión NtHMAi PB1121 -ARN se construyen al (a) escindir la β-glucuronidasa ORF del vector de expresión binario ("pBI121" de CLONTECH), y (b) sustituir la construcción ARNi NtHMA, escindida del plásmido NtHMA PBKCMV-ARN, en los sitios XbaI/SacI del plásmido PBI121 en lugar de la β-glucuronidasa ORF removida. Los vectores de expresión NtHMAi PBI121-ARN comprenden: (i) fragmento codificante NtHMA 330 bp XbaI-HindIII que incluye (ii) fragmento de intrón 139 bp, ligado operablemente al (iii) fragmento de complementariedad inversa NtHMA 196 bp SpeII-SacI. Los vectores de expresión NtHMAi PBI121-ARN, tales como aquellos descritos en los Ejemplos 2 y 3, se pueden introducir en cualquier célula de planta anfitriona de interés mediante varios métodos conocidos por personas expertas en la técnica.

EJEMPLO 4

Transformación de Variedades de Tabaco Burley (TN90), Flue-cured (K326), y Dark (VA359) con Vectores de Expresión ARNi NtHMA

[0127] Las semillas de tabaco de tres diferentes variedades de, Burley (TN90), Flue- cured (K326), y Dark (VA359), se esterilizan y germinan en una caja de petri que contiene medio basal MS complementado con 5 ml/L de mezcla conservante de planta (PPM). Las plántulas, en aproximadamente 7 a 10 días post-germinación, se seleccionan para transformación con varios vectores de expresión ARNi NtHMA. Una colonia individual de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 se inocula en un medio LB líquido que contiene 50 mg l^{-1} de canamicina (mono

sulfato de canamicina), y se incuban durante 48 h a 28° C con agitación recíproca (150 ciclos min^{-1}). Las células bacterianas cultivadas se recolectan mediante centrifugación (6000 *xg*, 10 min), y se suspenden a una densidad final de 0.4-0.7 OD_{600}, con 20 ml de medio MS líquido que contiene $20g^{-1}$ de sacarosa. Los explantes de plántulas de 7-10 días se sumergen en una suspensión bacteriana durante 5 mins, y se transfieren a papeles de filtro estériles. Cincuenta explantes se colocan en alícuotas de 40 ml demedio agar REG (medio basal MS complementado con 0.1 mg l^{-1} NAA y 1 mg l^{-1} de BAP) en 100 mm X 20 mm placas petri. Los explantes se cocultivan con *Agrobacterium* a 25° C. Después de 3 días de cocultivo, los explantes se lavan y se transfieren a medio RCPK (medio REG con 100 mg^{-1} de canamicina, 500 mg l^{-1} de carbenicilina, y 5ml de PPM) para selecciona transformantes. Los explantes se subcultivan cada 2 semanas. Después de 8-12 semanas de crecimiento bajo condiciones selectivas, las plantas sobrevivientes, que representan los transformantes que han integrado la construcción de expresión de NtHMAi ARN en sus genomas, se transfieren a un medio de enraizamiento (medio basal MS complementado con 100 mg l^{-1} de Canamicina). Las plantas arraigadas se transfieren a macetas para promover crecimiento adicional.

EJEMPLO 5

Reducción de Cd en la Lámina de la Hoja de Transgénicos de Primera Generación Modificados Genéticamente para Expresar Polinucleótidos de ARNi NtHMA

[0128] Para determinar el efecto de la expresión de polinucleótido ARNi NtHMA en el transporte de Cd de la raíz a las porciones aéreas de las plantas transgénicas, los niveles de Cd se determinan para varias estirpes transgénicas que se han

modificado genéticamente para expresar ya sea los polinucleótidos de ARNi NtHMA (660-915) o (1382-1584).

[0129] Aproximadamente 40 plantas transgénicas independientes, que representan tres variedades de tabaco, se transforman con varios vectores de expresión NtHMAi PB1121 -ARN. Inicialmente, los transformantes se hacen crecer en bandejas flotantes que contienen medio Hoaglands durante 4 semanas. Las plantas positivas a PCR para NPT II se seleccionan y se siembran en potes de 10" con un sistema hidropónico que contiene medio Hoaglands que contiene 5 µM de $CdCl_2$. Después de 4-8 semanas, dos muestras de hojas medias se consechan y se secan por congelamiento para análisis de metal, o se congelan en nitrógeno líquido para análisis de expresión de gen. Aproximadamente 500 mg de tabaco se pesa y se digiere en 10 ml de HNO_3 concentrado mediante el sistema de digestión 5 del sistema de reacción, acelerado por microondas (CEM corporation, Mathews, NC). Las concentraciones de metal pesado se analizan utilizando espectrofotometría de masa de plasma acoplado inductivamente ("ICP-MS," Agilent 7500A; Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Como un control de tabaco no transgénico, se prepara una muestra que consiste de hojas de tabaco Virginia, certificada pulidas, CTA-VTL-2, bajo condiciones comparables (Dyboczynski *et al.*, 1997).

[0130] Las figuras 3B-3D muestran la reducción de Cd en la lámina de la hoja de estirpes transgénicas de primera generación múltiples (T0), que representan tres variedades, que se han modificado genéticamente para expresar polinucleótidos de ARNi NtHMA (660-915). En cada gráfica, la unidad del eje y es µg/mg de tejido.

[0131] Las figuras 4B-4D muestran la reducción de Cd en la lámina de la hoja de estirpes transgénicas de primera generación múltiples (T0), que representan tres variedades, que se han modificado genéticamente para expresar polinucleótidos de ARNi NtHMA (1382-1584). En cada gráfica, la unidad del eje y es µg/mg de tejido.

EJEMPLO 6

Reducción en transcriptos de ARN NtHMA en Hoja de Tabaco Transgénica mediante la Expresión de Polinucleótidos de ARNi NtHMA

[0132] Para determinar el efecto de expresión de polinucleótido ARNi NtHMA en los niveles de estado estacionario de transcriptos de ARN NtHMA endógenos, el cambio relativo en transcriptos de ARN NtHMA se mide al aislar el ARN celular total de la lámina de de las porciones de hoja de varias estirpes transgénicas, que representan tres variedades de tabaco.

[0133] El ARN total se aísla de hojas medias de las plantas T0 utilizando Reactivo TRI ® (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Para remover las impurezas de ADN, el ARN purificado se trata con DNasa libre de RNasa (ADN libre TURBO, Ambion, Austin TX). Para sintetizar la primera hebra del cADN, aproximadamente 10 µgramos de ARN total se transcribe en forma inversa utilizando el Equipo de Archivo de cADN de Alta Capacidad (Applied Biosystems, Foster City, CA). Para medir el nivel de los transcriptos de NtHMA en las muestras, un RT-PCR de etapa 2 cuantitativo se realiza de acuerdo con la química basada en sonda TaqMan MGB. La mezcla RT contiene 4 µM de mezcla de dNTP, 1X cebadores aleatorios, Amortiguador 1X RT, 10 g de cADN, 50 U de transcriptasa inversa MultiScribe (Applied Biosystems), 2 U de inhibidor de RNasa Superase-In (Ambion), y agua

libre de nucleasa. La mezcla de PCR contiene 1X Mezcla de Taqman Universal PCR Master (Applied Biosystems, Foster City, CA), 400 nM de cebador delantero, 400 nM de cebador inverso, 250 nM de sonda TaqMan MGB, 2 ng de cADN, y agua libre de nucleasa. El RT-PCR se realiza utilizando un sistema ABI 7500 Real-Time (Applied Biosystems, Foster City, CA) y bajo condiciones de amplificación: 50° C durante 2 min.; 95 ° C durante 10 min., 40 ciclos de 95° C durante 15 seg y 60° C durante 1 min. Para normalizar los niveles de trascripto NtHMA del ARN medidos, la Deshidrogenasa Gliceraldehído-3-Fosfato (G3PDH) se selecciona como un trascripto de ARN de control endógeno, cuyo nivel de expresión no es sensible a la actividad de interferencia de ARN específica de secuencia de los polinucleótidos ARNi NtHMA bajo análisis. El cambio de pliegue en el nivel del transcripto NtHMA ARN causado por la expresión de polinucleótido- NtHMA-ARNi se calcula al determinar la relación de (a) / (b), en la que (a) representa el valor normalizado del nivel trascrito NtHMA ARN determinado para muestras derivadas de plantas transgénicas transformadas con un vector de expresión ARNi NtHMA, y (b) representa el valor normalizado del nivel de transcrito de ARN NtHMA determinado de muestras derivadas de plantas transgénicas transformadas con un vector de expresión deficiente en la construcción de ARNi ARN NtHMAi.

[0134] Las figuras 5A-C muestran niveles de transcriptos de ARN NtHMA normalizados en varias estirpes transgénicas de primera generación (T0) que se han modificado genéticamente para expresar polinucleótidos de ARNi NtHMA de interés, según se determina por análisis PCR en tiempo real cuantitativo de lámina de los extractos de hoja. La figura 5A muestra que para las estirps transgénicas k326 derivadas independientemente múltiples, los niveles de transcripto de ARN se reducen mediante la actividad de interferencia de ARN de polinucleótidos de ARNi NtHMA (660-915). La figura 5B muestra que para estirpes transgénicas

TN90 derivadas independientemente, múltiples, los niveles de transcripto de ARN se reducen mediante la actividad de interferencia de ARN de polinucleótidos de ARNi NtHMA (660-915). La figura 5C muestra que para estirpes VA359 derivadas independientemente múltiples, los niveles de transcripto de ARN se reducen mediante la actividad de interferencia de ARN de polinucleótidos de ARNi NtHMA (660-915). La reducción en niveles de transcripto de ARN NtHMA es consistente con la reducción en el contenido de Cd medido en hojas medias para las mismas estirpes transgénicas probadas. El "PBM 21" representa un vector de expresión deficiente en la construcción de ARNi que codifica polinucleótidos de ARNi NtHMA (660-915).

EJEMPLO 7

Distribución de Cd y Zn en Estirpes Transgénicas Genéticamente Modificadas para Expresar Polinucleótidos de ARNi NtHMA

[0135] Para determinar el efecto de expresión del polinucleótido de ARNi NtHMA (660-915) en la distribución de Cd y Zn dentro de la lámina de la hoja y la raíz, se analiza el contenido de metal de plantas transgénicas de tres variedades. Cinco estirpes transgénicas de cada variedad, es decir, Flue-cured (K326), Burley (TN90), y Dark (VA359), se seleccionan por exhibir contenido de Cd en el rango más bajo en la lámina de la hoja. Las hojas medias y raíces de estas plantas transgénicas y plantas de control se cosechan para análisis de metal mediante ICP_MS. Durante 8 semanas, todas las plantas se hacen crecer en medio Hoaglands complementado con 5 µM de $CdCl_2$ antes de cosechar.

[0136] La Tabla 2 lista los niveles de Cd y Zn medidos en la lámina de la hoja y la raíz de varias estirpes transgénicas, que representan tres variedades de tabaco,

como se proporciona adelante. En la Tabla 2, la distribución de Cd entre la lámina de la hoja y the raíz se modifica sustancialmente por la expresión de polinucleótidos de ARNi NtHMA (660-915) para todas las tres variedades, Flue-cured (K326), Burley (TN90), y Dark (VA359). Para las estirpes transgénicas K326, el % de reducción de Cd varía de 97.16 - 98.54 % cuando se compara con los niveles de Cd observados en plantas de Control K326. Para las estirpes transgénicas TN90, el % de reducción de Cd varía de 85.12 - 90.96 % cuando se compara con los niveles de Cd observados en el Control TN90. Para las estirpes transgénicas VA359, el % de reducción de Cd varía de 93.24 - 99.07% cuando se compara con los niveles de Cd observados en el Control VA359. la estirpe celular VA359 NtHMA-11 exhibe el nivel de Cd más bajo (1.62 µg/g) y el % reducción de Cd más alto (99.07%), cuando se compara contra dos estirpes de control deficientes en transgen ARN NtHMAi ("VA359 PBI121") que exhiben niveles de Cd en 158.3 - 205.96 µg/g. El análisis de raíz comparable de las estirpes transgénicas muestra, que una cantidad sustancial de Cd se puede acumular en la raíz, resultando en incremento de veces en niveles de Cd en raíz que varían de 6.90 - 15.38, con relación a los niveles de Cd observados en los controles respectivos.

[0137] En contraste a la reducción de Cd significativa en la lámina de la hoja de las estirpes transgénicas, el contenido de Zn de la lámina de la hoja no se reduce sustancialmente, aunque alguna reducción se observa en la mayoría de estirpes transgénicas, originada por la expresión de polinucleótidos de ARNi NtHMA (660-915). El contenido de Zn dentro de la raíz (última columna de la Tabla 3) incrementado en todas las estirpes transgénicas, resultando en un incremento de 4-6 veces en las estirpes transgénicas de las variedades K326 y VA359, y un incremento de 3-5 veces en la variedad TN90.

[0138] La figura 6 muestra la distribución de Cd y Zn entre la lámina de la hoja y la raíz de varias estirpes transgénicas de primera generación que se han modificado genéticamente para expresar polinucleótidos de ARNi NtHMA de interés, como se presenta en la Tabla 2. En cada gráfica de la a figura 6, la unidad del eje y es µg/mg de tejido.

Tabla 2

Variedad Transgénica	Hoja		Raíz	
	Cd µg/g	Zn µg/g	Cd µg/g	Zn µg/g
K326 06T458	7.09	22.2	703	201
K326 06T459	4.97	24.1	696	225
K326 06T473	3.7	34	929	215
K326 06T480	3.93	38.6	989	224
K326 06T482	2.55	36.3	520	126
K326 Control	174.7	36.3	64.3	35.7
TN90 06T428	26.3	48.6	626	184
TN90 06T430	16.08	37.2	684	213
TN90 06T444	15.98	28.1	738	234
TN90 06T445	20.72	32.6	618	186
TN90 06T455	17.87	24.4	582	157
TN90 PBI121	181.2	35.5	62.6	44.3
TN90 Control	172.4	32.3	72.9	46.6
VA359 06T493	7.59	23.1	543	148
VA359 06T498	1.62	26.2	706	175
VA359 06T506	5.72	28.8	351	109
VA359 06T542	7.03	27.1	738	136
VA359 06T543	11.78	29.3	547	106
VA359 PBI121	206	47.5	35.3	27.6
VA359 Control	158.5	32.6	37.6	26.2

EJEMPLO 8

Distribución Cd en Varios Tejidos de Estirpes Transgénicas Modificadas Genéticamente para Expresar polinucleótidos de ARNi NtHMA

[0139] Para determinar el efecto de la expresión de polinucleótido de ARNi NtHMA (1382-1584) en la distribución de Cd dentro de varios tejidos (es decir, la corteza, lámina, médula, y raíz), se analiza el contenido de metal de varias estirpes transgénicas que representan dos variedad , Burley (TN90) y Flue-cured (K326),. Las plantas transgénicas completamente maduras y plantas de control se cosechan para análisis de metal mediante ICP_MS. Durante 8 semanas, todas las plantas se hacen crecer en 5 µM de $CdCl_2$ en medio Hoaglands antes de cosecha.

[0140] La Tabla 3 lista el contenido de Cd en os tejidos de corteza, lámina, médula, y raíz de varias estirpes transgénicas, como se proporciona adelante. En la Tabla3, los niveles de Cd se reducen sustancialmente en los tejidos de corteza, lámina, y médula de todas las estirpes transgénicas probadas cuando se compara aquellas de las plantas de control. El "Control" representa plantas no transgénicas. El "PB1121" representa plantas transgénicas transformadas con un vector de expresión deficiente en construcción ARNi ARNi NtHMAi. El grado de reducción de Cd en la corteza, médula, y lámina de la hoja de las estirpes transgénicas K326 es significativamente mayor que aquel observado en las estirpes transgénicas TN90. La expresión de polinucleótidos ARNi (1382-1584) en plantas transgénicas K326 resulta en una reducción de 9-11 veces de Cd en la corteza, una reducción de 6-13 veces de Cd en la médula, y una reducción de 31-32 veces de Cd en la lámina de la hoja. La expresión de polinucleótidos de ARNi (1382-1584) en las plantas transgénicas TN90 resulta en una reducción de 4-7 veces de Cd en la corteza, una reducción de 5-8 veces de Cd en la médula, y una reducción de 6-20 veces de Cd

en la lámina de hoja. En contraste, se observan más incrementos modestos en el contenido de Cd (5-6 veces) en la raíz de estas estirpes transgénicas cuando se comparan con aquellos de las plantas de control.

[0141] La figura 7 muestra la distribución de Cd entre la corteza ("B"), lámina de la hoja ("L"), médula ("P"), y la raíz ("R") de varias estirpes transgénicas de primera generación que se han modificado genéticamente para expresar polinucleótidos de ARNi NtHMA de interés, como se presenta en la Tabla 3. En cada gráfica de la figura 7, la unidad del eje y es µg/mg de tejido.

Tabla 3

Variedad de semilla transgénica	Cd en corteza	Cd en lámina	Cd en médula	Cd en raíz
TN90 06T619	7.36	31.1	4.67	557
TN90 06T658	3.76	8.89	2.89	727
TN90 Control	30.9	151	25.3	115
TN90 PBI121	23.1	201	20	124
K326 06T682	2.02	4.32	1.97	1020
K326 06T696	2.53	4.48	4.25	1030
K326 Control	19.5	133	25.3	145
K326 PBI121	25.5	143	26.2	253

Ejemplo 9

Reducción de Cd en lámina de hoja de estirpes transgénicas de segunda generación modificadas genéticamente para expresar polinucleótidos ARNi NHtMA.

208

Para determinar el efecto de la expresión de polinucleótidos ARNi NHtMA (660-915) en contenido Cd en lámina de hoja, el contenido de metal de dos estirpes transgénicas (TI) de la variedad VA359 se hacen crecer en suelo que contiene concentraciones de Cd variables durante cuatro semanas. Dos estirpes transgénicas, 06T498 y 06T506, seleccionadas como positivas de canamicina se detectan por PCR. Varias macetas de 10" llenas con mezcla de arena: tierra se saturan con 0, 0.1, 0.5, o 5µM $CdCl_2$. Se hacen crecer tres plantas por tratamiento por estirpes transgénicas durante cuatro semanas al agregar medio de Hoaglands a un platillo. Se observa el número total de hoja, índice de área de hojas, peso de hojas, peso de espiga, y peso de raíz. Dos muestras de raíces y hojas medias se secan por congelamiento y se someten a análisis de metal pesado.

[0143] La figura 8 muestra la distribución de Cd entre la lámina de hoja ("L") y la raíz ("R") de varias estirpes transgénicas (T1) de segunda generación que se han modificado genéticamente para expresar los polinucleótidos ARNi NHtMA de interés. En cada gráfica de la figura 8, la unidad del eje Y es µg/mg de tejido. A partir de la figura 8 se puede ver que el contenido de Cd de las plantas transgénicas fue consistentemente menor que aquel que las plantas de control en todas las concentraciones de Cd probadas (0, 0.1, 0.5, y 5 µM). Se observa una reducción en el contenido de Cd de lámina de hoja (2-4.7 veces) en varias estirpes transgénicas probadas. El nivel de Cd para la estirpe 06T498 fue de solo ~20% de plantas de control en 5µM $CdCl_2$. Se observa un incremento en el contenido de Cd de raíz (4-16 veces) en varias estirpes transgénicas probadas. Se observa el mayor contenido de Cd de raíz (un incremento de 16 veces) para la estirpe 06T498 en 5 µM $CdCl_2$. Así, el contenido de metal pesado reducido en lámina de hoja/brotes en estirpes transgénicas, que expresan el nucleótido ARNi NHtMA (660-915), sugiere que una tras locación de una cantidad de materiales pesados

de la raíz a la lámina de las hojas/brotes se puede interrumpir mediante interferencia de ARNi. Los resultados son consistentes con la reducción de Cd observada en la lámina de la hoja de las estirpes transgénicas de primera generación, y que las estirpes transgénicas de segunda generación también demuestran (A) niveles de Cd reducidos en lámina de hoja, y (B) Cd incrementado en las raíces. Las estirpes transgénicas no demuestran diferencias fenotípicas en la apariencia general, crecimiento y desarrollo con relación aquel de las plantas de control.

Ejemplo 10

Polinucleótido NtHMA

[0144] Un polinucleótido NtHMA contendrá generalmente enlaces fosfodiéster, aunque en algunos casos, se incluyen análogos de acido nucleico que pueden tener estructuras alternas, que comprenden, por ejemplo, fosforamidato, fosforotioato, fosforoditioato, o enlaces O-metilfosforoamidita (ver Eckstein, Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, Oxford University Press); y estructuras de ácidos nucleicos de péptidos y enlaces. Otros análogos de ácidos nucleicos incluyen aquellos con estructuras positivas; no iónicas, y estructuras no ribosa, que incluyen aquellas descritas en la patente estadounidense No. 5,235,033 y 5,034,506, y capítulos 6 y 7, ASC Symposium Series 580, Carbohydrate Modifications in Antisense Research, Sanghui & Cook, eds. También se incluyen ácidos nucleicos que incluyen uno o más azúcares carbocíclicos dentro de una definición de ácidos nucleicos. Se pueden hacer modificaciones dentro de la estructura de ribosa-fosfato por una variedad de razones, por ejemplo para incrementar la estabilidad de la vida útil de tales moléculas en ambientes fisiológicas o como sondas en un biochip. Se pueden

210.

hacer mezclas de ácidos nucleicos de ocurrencia natural y análogos; alternativamente, se pueden hacer mezclas de diferentes análogos ácidos nucleicos, y mezclas de ácidos nucleicos de ocurrencia natural y análogos.

[0145] Una variedad de referencias descritas tal como análogos de ácidos nucleicos, que incluyen, por ejemplo, fosforamidato (Beaucage et al., Tetrahedron 49(10): 1925 (1993) y referencias allí; Letsinger, J. Org. Chem. 35:3800 (1970); Sprinzl et al., Eur. J. Biochem. 81:579 (1977); Letsinger et al., Nucl. Acids Res. 14:3487 (1986); Sawai et al, Chem. Lett. 805 (1984), Letsinger et al., J. Am. Chem. Soc. 110:4470 (1988); and Pauwels et al., Chemica Scripta 26:141 91986)), phosphorothioate (Mag et al., Nucleic Acids Res. 19:1437 (1991); and U.S. Pat. No. 5,644,048), phosphorodithioate (Briu et al., J. Am. Chem. Soc. 111: 2321 (1989), enlaces O- metifoforoamidita (ver Eckstein, Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, Oxford University Press), enlaces y estructura de ácidos nucleicos de péptidos (ver Egholm, J. Am. Chem. Soc. 114:1895 (1992); Meier et al., Chem. Int. Ed. Engl. 31:1008 (1992); Nielsen, Nature, 365:566 (1993); Carlsson et al., Nature 380:207 (1996), todas las cuales se incorporan como referencia). Otros análogos de ácidos nucleicos incluyen aquellos con estructuras positivas (Denpcy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:6097 (1995); estructuras no iónicas (patentes estadounidenses Nos. 5,386,023, 5,637,684, 5,602,240, 5,216,141 y 4,469,863; Kiedrowshi et al., Angew. Chem. Intl. Ed. English 30:423 (1991); Letsinger et a/., J. Am. Chem. Soc. 110:4470 (1988); Letsinger et a/., Nucleoside s Nucleotide 13:1597 (1994); Chapters 2 and 3, ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research", Ed. Y. S. Sanghui and P. Dan Cook; Mesmaeker et al., Bioorganic & Medicinal Chem. Lett. 4:395 (1994); Jeffs et al., J. Biomolecular NMR 34:17 (1994); Tetrahedron Lett. 37:743 (1996)) y estructura no-ribosa, que incluyen aquellas descritas en las

patentes estadounidenses Nos. 5,235,033 y 5,034,506, y capítulos 6 y 7, ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research", Ed. Y. S. Sanghui and P. Dan Cook. También se incluyen ácidos nucleicos que contiene uno o más azúcares carbocíclicos dentro de una definición de ácidos nucleicos (ver Jenkins et al, Chem. Soc. Rev. (1995) pp 169-176). Se describen varios análogos de ácidos nucleicos en Rawls, C & E News Jun. 2, 1997 pagina 35. Estas referencias se incorporan expresamente aquí como referencia.

[0146] Otros análogos incluyen ácidos nucleicos de péptidos (PNA) que son análogos de ácidos nucleicos de péptidos. Estas estructuras son sustancialmente no iónicas bajo condiciones neutras, en contraste a la estructura de fosfodiéster altamente cargada de ácidos nucleicos de ocurrencia natural. Esto resulta en dos ventajas. Primero, la estructura PNA exhibe cinéticas de hibridación mejoradas. El PNA tiene mayores cargas en la temperatura de fusión (Tm) para pares base perfectamente emparejados versus incorrectamente emparejados. El ADN y típicamente el ARN exhiben una caída de 2-4° C en T_m para un emparejamiento incorrecto interno. Con la estructura PNA no iónica, la estructura es más cercana a 7-9 °C. De manera similar, debido a su naturaleza no iónica la hibridación de las bases adjuntas a estas estructuras es relativamente insensible a la concentración de sal. Adicionalmente, el PNA no se degrada mediante enzimas celulares, y puede así ser más estable.

[0147] Entre el uso de los polinucleótidos NtHMA descritos, y combinaciones o fragmentos de los mismos, está el uso de los fragmentos como sondas o cebadores o en el desarrollo de moléculas ARNi tales fragmentos comprenden generalmente por lo menos aproximadamente 17 nucleótidos contiguos de una secuencia de ADN. En otras realizaciones, un fragmento de ADN comprende por

lo menos 30, o por lo menos 60 nucleótidos contiguos de una secuencia de ADN. Los parámetros básicos que afectan la elección de las condiciones de hibridación y guía para concebir condiciones adecuadas se establecen en Sambrook et al., 1989 y se describieron en detalle anteriormente. Utilizando el conocimiento del código genético en combinación con la secuencias de amino ácidos establecidas anteriormente, se pueden preparar conjuntos de oligonucleótidos degenerados. Tales oligonucleótidos son útiles como cebadores, por ejemplo, en reacciones de cadena de polimerasa (PCR), con lo cual se amplifican y se aíslan fragmentos de ADN. En ciertas realizaciones, los cebadores degenerados se pueden utilizar como sondas para colecciones genéticas no humanas. Tales colecciones incluirían pero no se limitan a colecciones de cADN, colecciones genómicas, y aun EST electrónicos (etiqueta de secuencia express) o colecciones de ADN. Las secuencias homologas identificadas por este método se utilizarían luego como sondas para identificar homólogos no humanos de la secuencia NtHMA identificada aquí.

[0148] La invención también incluye polinucleótidos y oligonucleótidos que hibridan bajo condiciones de rigurosidad reducida, condiciones de rigurosidad típicamente moderadas, y comúnmente condiciones altamente restringidas (también denominada aquí como "alta rigurosidad"), a un polinucleótido NtHMA descrito aquí. Los parámetros básicos que afectan la elección de las condiciones de hibridación y guía para concebir condiciones adecuadas se establecen por Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., chapters 9 and 11 ; and Current Protocols in Molecular Biology, 1995, F. M. Ausubel et a/., eds., John Wiley & Sons, Inc., secciones 2.10 y 6.3-6.4, incorporado aquí como referencia), y se pueden determinar fácilmente por

aquellos medianamente versados en la técnica basado en, por ejemplo, la longitud y/o la base de la composición del polinucleótido. Una forma de alcanzar condiciones moderadamente rigurosas involucran el uso de una solución de prelavado que contienen 5xSSC, 0.5% SDS, 1.0 mM EDTA (pH 8.0), amortiguador de hibridación de aproximadamente 50% de formamida, 6xSSC, y una temperatura de hibridación de aproximadamente 55° C (u otras soluciones de hibridación similares, tal como una que contiene aproximadamente 50% de formamida, con una temperatura de hibridación de aproximadamente 42° C), y condiciones de lavado de aproximadamente 60° C, en 0.5 xSSC, 0.1% SDS. Generalmente, se definen condiciones altamente rigurosas como condiciones de hibridación como se hizo anteriormente, pero lavando aproximadamente a 68° C, 0.2xSSC, 0.1 % SDS. Se puede utilizar SSPE (1x SSPE es 0.15M NaCl, 10 mM NaH_2PO_4, y 1.25 mM de EDTA, pH 7.4) para SSC (1x SSC es 0.15M NaCl y 15 mM de citrato de sodio) en la hibridación y amortiguadores de lavado; se desarrollan lavados durante 15 minutos después que se completa la hibridación. Se debe entender que la temperatura de lavado y la concentración de sal del lavado se pueden ajustar según sea necesario para lograr un grado de rigurosidad al aplicar los principios básicos que rigen las reacciones de hibridación y la estabilidad del dúplex, como es conocido por los expertos en la técnica y se describe adicionalmente adelante (véase, por ejemplo, Sambrook et al., 1989). Cuando se hibrida un acido nucleico con un polinucleótido objetivo de secuencia desconocida asume que la longitud del hibrido es aquella del acido nucleico de hibridación. Cuando se hibridan secuencias de ácidos nucleicos conocidas, la longitud hibrida se puede determinar al alinear las secuencias de ácidos nucleicos e identificar la región o regiones de complementariedad de secuencia optima. La temperatura de hibridación para híbridos anticipados en no menos de 50 pares base de longitud y debe ser 5 a 10° C menos que la temperatura de fusión (T_m) del

hibrido, en donde T_m se determina de acuerdo con las siguientes ecuaciones. Para híbridos menores de 18 pares base de longitud, T_m (°C)=2(# de A + T bases)+4 (# de G+C bases). Para híbridos de más de 18 pares de longitud, T_m (°C)=81.5+16.6 (log10 [Na+])+0.41 (% G+C)-(600/N), en donde N es el numero de bases en el hibrido, y ([Na+]) es la concentración de iones de sodio en el amortiguador de hibridación ([Na+] durante 1x SSC=0.165M). típicamente, cada uno de tales ácidos nucleicos hibridantes tiene una longitud de por lo menos 25% (comúnmente por lo menos 50%, 60%, o 70% y más comúnmente por lo menos 80%) de longitud de un polinucleótido de la descripción al que este hibrida y tiene por lo menos 60% de identidad de secuencia (por ejemplo, por lo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97.5%, o por lo menos 99%) con un polinucleótido de la descripción al que este hibrida.

Ejemplo 11

Polipéptido NtHMA

[0149] Un polipéptido de la descripción se puede preparar o cultivar células anfitrionas recombinantes o transformadas bajo condiciones de cultivo adecuadas para expresar un polipéptido de la descripción. El polipéptido expresado resultante puede ser purificado luego a partir de tal cultivo utilizando procesos de purificación conocidos. La purificación del polipéptido también puede incluir una columna de afinidad que contiene agentes que ligaran al polipéptido; una o más etapas de columna sobre tales resinas de afinidad como concanavalin A-agarosa, heparin-toyopearl® o Cibacrom azul 3GA Separose®; una o más etapas que utilizan cromatografía de hidrointeracción utilizando tales resinas como fenil éter, butil éter o propil éter; o cromatografías de inmunoafinidad; alternativamente el polipéptido de la descripción también se puede expresar en un formato que facilitara la

purificación. Por ejemplo, se puede expresar como un polipéptido de fusión, tal como aquellos de unión maltosa (MBP), glutationa-5-transferasa (GST) o tiroxin. Los equipos para expresión y purificación de tales polipéptidos de fusión están conocidos comercialmente de New England BioLab (Beverly, Mass.), Pharmacia (Piscataway, N. J.), e InVitrogen, respectivamente. El polipéptido también se puede etiquetar con un epítopo y purificar posteriormente al utilizar un anticuerpo específico dirigido a tal epítopo. Finalmente, se puede emplear una o más etapas de cromatografía liquida de alto desempeño de fase inversa (RP-HPLC) que emplean medio RP-HPLC hidrófobo, por ejemplo, se dice que tiene grupos metilo pendientes u otros grupos alifáticos, para purificar adicionalmente el polipéptido. Algunas o todas las etapas de purificación anteriores, en varias combinaciones, también se pueden emplear para proporcionar un polipéptido recombinante sustancialmente homogéneo. El polipéptido purificado así es sustancialmente libre de otros polipéptidos de mamíferos y se define de acuerdo con la invención como un "polipéptido sustancialmente purificado"; tales polipéptidos purificados incluyen NtHMA, fragmento, variante, y similares. La expresión, aislamiento, y purificación de los polipéptidos, y fragmentos de la descripción se pueden lograr mediante cualquier técnica adecuada, que incluye pero no se limita a los métodos descritos aquí.

[0150] También es posible utilizar una columna de afinidad tal como un anticuerpo monoclonal generado contra polipéptidos de la descripción, para purificar por afinidad polipéptidos expresados. Estos polipéptidos se pueden remover de cualquier columna de afinidad utilizando técnicas convencionales, en un amortiguador de elusión alto en sal y luego dializar en un amortiguador bajo en sal para uso o al cambiar el pH de otros componentes dependiendo de la matriz de afinidad utilizada, o se pueden remover competitivamente utilizando el sustrato de

ocurrencia natural del grupo funcional de afinidad, tal como un polipéptido derivado de la descripción.

[0151] Un polipéptido de la descripción también se puede producir mediante síntesis química convencional conocida. Los métodos para construir los polipéptidos de la descripción o fragmentos de los mismos mediante medios sintéticos se conocen por los expertos en la técnica. Las secuencias de polipéptidos construidas sintéticamente, por virtud de compartir características estructurales y/o conformacionales primarias, secundarias o terciarias con un polipéptido natural que puede poseer propiedades biológicas en común con ellos, que incluyen actividad biológica.

Ejemplo 12

Anticuerpos anti-NtHMA

[0152] Se proporcionan aquí, En otra realización los anticuerpos que son inmunoreactivos con los polipéptidos de la descripción. Los polipéptidos NtHMA fragmentos, variantes, polipéptidos de fusión, y similares, como se establece aquí, se establece como "inmunógenos" en la producción de anticuerpos inmunoreactivos allí. Tales anticuerpos se unen a los polipéptidos a través de sitios de unión antígenos del anticuerpo. Específicamente los anticuerpos de uníos son aquellos que reconocerán específicamente y se unirán a los polipéptidos de la familia NtHMA, análogos y variantes, pero no con otras moléculas. En una realización los anticuerpos son específicos para polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos NtHMA de la descripción como se establece en la SEQ ID NO: 2 y no tienen reactividad cruzada con otros polipéptidos.

217

[0153] Más específicamente los polipéptidos, fragmentos, variantes, polipéptidos de fusión, contienen determinantes antigénicos o epítopos que provocan la formación de anticuerpos. Estos determinantes antigénicos o epítopos pueden ser lineales o conformacionales (discontinuos). Los epítopos lineales están compuestos de una única sección de aminoácidos del polipéptido, aunque los epítopos conformacionales o discontinuos están compuestos de secciones de aminoácidos de diferentes regiones de la cadena de polipéptidos que se colocan en proximidad cercana luego del plegamiento del polipéptido. Los epítopos se pueden identificar mediante cualquiera de los métodos conocidos en la técnica. Adicionalmente, los epítopos de los polipéptidos de la descripción se pueden utilizar como reactivos de investigación, en ensayos, y purificar anticuerpos de unión específicos a partir de sustancias tales como suero policlonal o sobrenadante de hibridomas cultivados. Tales epítopos o variantes de los mismos se pueden producir utilizando técnicas conocidas en el arte tal como síntesis de fase solida, división química o enzimática de un polipéptido, o utilizando tecnología de un ADN recombinante.

[0154] Ambos anticuerpos policlonales inmunoclonales de los polipéptidos de la descripción se pueden preparar mediante técnicas convencionales, ver, por ejemplo, anticuerpos monoclonales, hibridomas: A New Dimension in Biological Analyses, Kennet et al. (eds.), Plenum Press, New York (1980); and Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Land (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1988); Kohler and Milstein, (U.S. Pat. No. 4, 376,110); the human B- cell hybridoma technique (Kosbor et al., Immunology Today 4:72, 1983; y Cole et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2026, 1983); and the EBV-hybridoma technique (Cole et al., 1985, Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Las estirpes de células de hibridoma q que

producen anticuerpos monoclonales específicos para los polipéptidos de la descripción también se contemplan aquí. Tales hibridomas se pueden producir e identificar mediante técnicas convencionales. Para la producción de anticuerpos, se pueden inmunizar varios animales anfitriones mediante inyección con un polipéptido NtHMA, fragmento, variante, o mutantes de estos. Tales animales pueden incluir, pero no se limitan a conejos, ratones, y ratas, por mencionar unos pocos. Se pueden utilizar varios adyuvantes para incrementar la respuesta inmunológica. Dependiendo de las especies de anfitriones, tales adyuvantes incluyen, pero no se limitan a, adyuvante de Freund's (completo e incompleto), geles minerales tal como hidróxido de aluminio, sustancias de superficie activa, tal como lisolecitina, poliones plurónicos, polianiones péptidos, emulsiones de aceite, hemocianina de lapa ojo de cerradura, bimitrofenol, y potencialmente adyuvantes humanos útiles tal como BCG (bacille Calmette-Guerin) y Corynebacterium parvum. Los anticuerpos monoclonales se pueden recuperar mediante técnicas convencionales. Los anticuerpos monoclonales pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina IgG, IgM, IgE, IgA, IgD, y cualquier subclase de las mismas.

[0155] Los anticuerpos de la descripción también se pueden utilizar en ensayos para detectar la presencia de polipéptidos o para alimentos de la descripción, ya sea in vitro o in vivo. Los anticuerpos también se pueden emplear en la purificación de polipéptidos o fragmentos de la descripción mediante cromatografía de inmunoafinidad.

Ejemplo 13

ARNs bicatenario

[0156] En una realización, la descripción proporciona moléculas de acido ribonucleico bicatenarias (ds ARN) para inhibir la expresión del gen NtHMA en una célula (por ejemplo, una célula de plantas), en donde el dsARN comprende una hebra anticodificante que comprende una región de complementariedad que es complementaria a por lo menos una parte de un mARN formado en la expresión del gen NtHMA, y en donde la región de complementariedad es menor de 30 nucleótidos de longitud y en donde dicho dsARN logra el contacto con una célula que expresa dicho gen NtHMA, inhibe la expresión de dicho gen NtHMA por lo menos en 20%. El dsARN comprende dos hebras de ARN que son suficientemente complementarias para hibridar para formar una estructura dúplex. Una hebra de dsARN (la hebra anticodificante) comprende una región de complementariedad que es sustancialmente complementaria, y críticamente completamente complementaria, a una secuencia objetivo, derivada de la secuencia de un mARN formado durante la expresión del gen NtHMA, la otra hebra (la hebra codificante) comprende una región que es complementaria a la hebra anticodificante, de tal manera que las dos hebras hibridan y forman una estructura de dúplex cuando se combinan bajo condiciones adecuadas. La estructura dúplex está entre aproximadamente 15 y 30 (por ejemplo, entre aproximadamente 18 y 25), típicamente entre aproximadamente 19 y 24 (por ejemplo, entre 21 y 23) pares base de longitud. De manera similar, la región de complementariedad para la secuencia objetivo está entre 15 y 30 (por ejemplo, entre aproximadamente 18 y 25), típicamente entre aproximadamente 19 y 24 (por ejemplo, entre 21 y 23) pares base de longitud. El dsARN de la descripción puede comprender adicionalmente uno o más nucleótidos monocatenarios sobresalientes. El dsARN se puede sintetizar por métodos estándar conocidos en la técnica como se discute adicionalmente adelante, por ejemplo, mediante el uso de un sintetizador de ADN automatizado, tal como están disponibles

comercialmente, de, por ejemplo, Biosearch, Applied Biosystems, Inc. En otro aspecto, se puede utilizar un vector de expresión para expresar una molécula ARNi in vivo.

[0157] El dsARN de la descripción puede contener uno o más emparejamientos incorrectos con la secuencia objetivo. Una realización, el dsARN de la descripción contiene más de tres emparejamientos incorrectos. Si la hebra anticodificante del dsARN contiene emparejamientos incorrectos con una secuencia objetivo, es típico que el área de emparejamiento incorrecto no se ubique en el centro de la región de complementariedad. Si la hebra anticodificante del dsARN contiene emparejamientos incorrectos con la secuencia objetivo, es típico que el emparejamiento incorrecto se restringa a 5 nucleótidos de cualquier extremo, por ejemplo 5, 4, 3, 2, o 1 nucleótido de cualquiera extremo 5' o 3' de la región de complementariedad. Por ejemplo, para una hebra dsARN de 23 nucleótidos que es complementaria del gen NtHMA, el dsARN preferiblemente no contiene ningún emparejamiento erróneo dentro de los 13 nucleótidos centrales. Los métodos descritos dentro de la descripción se pueden utilizar para determinar si un dsARN que contiene un emparejamiento erróneo con una secuencia objetivo es efectivo en inhibir la expresión de un gen NtHMA.

[0158] En una realización, por lo menos un extremo del dsARN tiene un nucleótido monocatenario sobresaliente de 1 a 4 (por lo menos 1 o 2 nucleótidos). El dsARN tiene por lo menos un nucleótido que sobresale que tiene propiedades inhibidoras. El dsARN también puede tener un extremo romo, típicamente ubicado en el extremo 5' de la hebra anticodificante.

[0159] En otra realización, el dsARN se modifica químicamente para mejorar la estabilidad. Los ácidos nucleicos de la descripción se pueden sintetizar y/o modificar por métodos bien establecidos en la técnica, tal como aquellos descritos en "Current protocols in nucleic acid chemistry", Beaucage, S. L. et al. (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y., EEUU, que se incorpora aquí como referencia. Las modificaciones químicas pueden incluir, pero no se limitan a modificaciones 2', introducción de bases no naturales, adhesión covalente a un ligando, y reemplazo de enlaces fosfato con enlaces tiofosfato. En esta realización la integridad de la estructura de dúplex se fortalece mediante por lo menos uno, y típicamente 2, enlaces químicos. Los enlaces químicos se pueden lograr mediante cualquiera de una cantidad de técnica bien conocidas, por ejemplo al introducir enlaces de hidrogeno covalentes, iónicos; interacciones hidrófobas, interacciones van der Waals o de apilado; por medio de coordinación de ión de metal, o a través del uso de análogos de purina.

[0160] En aun otra realización, los nucleótidos en uno o ambas de las dos hebras se pueden modificar para evitar o inhibir la activación de enzimas celulares, tal como, por ejemplo, sin limitación, ciertas nucleasas. Las técnicas para inhibir la activación de las enzimas celulares se conocen en la técnica que incluye, pero no se limita a, modificaciones 2'-amino, modificaciones 2'-fluoro, modificaciones 2'-alquilo, modificaciones de estructura no cargada, modificaciones morfolino, modificaciones 2'-O-metilo, y fosforamidato (véase, por ejemplo, Wagner, Nat. Med. (1995) 1:1116- 8). Así, por lo menos un grupo 2'-hidroxilo de los nucleótidos de un dsARN se reemplazan mediante un grupo químico. También, por lo menos un nucleótido se puede modificar para formar un nucleótido asegurado. Tal nucleótido asegurado contiene un puente de etileno o metileno que conecto el 2'-oxigeno de ribosa con el 4'-carbono de ribosa. Los oligonucleótidos que contienen

el nucleótido asegurado se describen en Koshkin, A. A., et al., Tetrahedron (1998), 54: 3607-3630) and Obika, S. et al., Tetrahedron Lett. (1998), 39: 5401- 5404). La introducción de un nucleótido asegurado en un oligonucleótido mejora la afinidad para las secuencias de complementariedad e incrementa la temperatura de fusión varios grados (Braasch, D. A. and D. R. Corey, Chem. Biol. (2001), 8:1-7).

[0161] Conjugar un ligando con dsARN debe mejorar su absorción celular. En ciertos casos, un ligando hidrófobo se conjuga con el dsARN para facilitar la permeación directa de la membrana celular. Alternativamente, un ligando conjugado con el dsARN es un sustrato para la endositosis mediada por receptor. Estos métodos son utilizados para facilitar la permeación celular de los oligonucleótidos anticodificantes. En ciertas sustancias, la conjugación de un ligando catiónico a oligonucleótidos resulta frecuente mente en resistencia mejorada a nucleatos. Ejemplos representativos de ligandos catiónicos son propil amonio y dimetilpropilamonio. De manera interesante, los oligonucleótidos anticodificantes se reportan por retener su alta afinidad de unión al mARN cuando se dispersa el ligando catiónico a través de los ligo nucleótidos. Véase M. Manoharan Antisense & Nucleic Acid Drug Development 2002, 12, 103 y referencias allí.

Ejemplo 15

Métodos Para Identificar Agentes Moduladores NtHMA

[0162] La descripción proporciona métodos para identificar agentes que pueden modular la actividad y/o el nivel de expresión NtHMA. Candidatos ("un agente de prueba") que se puede detectar para identificar la actividad moduladora NtHMA especifica incluyen moléculas pequeñas, químicos, pepdomiméticos, anticuerpos,

223

péptidos, polinucleótidos (por ejemplo, ARNi, siAR, moléculas ribozima o anticodificantes), y agentes desarrollados mediante diseño basado en computador. La modulación del NtHMA incluye un incremento o reducción en la actividad o expresión. Por ejemplo, un método para detectar candidatos que pueden modular la actividad y/o expresión del NtHMA, comprende: poner en contacto una muestra que contiene un polinucleótido o polipéptido NtHMA con un agente de prueba bajo condiciones que permitan al agente de prueba y al polipéptido NtHMA o polinucleótido interactuar, y medir la expresión y/o actividad del polipéptido NtHMA en la presencia o ausencia del agente de prueba.

[0163] En una realización, una célula que contiene un polinucleótido NtHMA se pone en contacto con un agente de prueba bajo condiciones de tal manera que la célula y el agente de prueba se les permita interactuar. Tales condiciones incluyen típicamente condiciones de cultivo o células normales consistentes con el tipo de célula particular que se utiliza, conocida en la técnica. Puede ser deseable permitir en el agente de prueba y la célula interactuar bajo condiciones con temperatura incrementada o en la presencia de reactivos que facilitan la captación del agente de prueba por la célula. Un control se trata de manera similar pero en la ausencia del agente de prueba. Alternativamente la actividad del NtHMA o la expresión se puede medir antes de entrar en contacto con el agente de prueba (por ejemplo, el estándar o medición de control) y luego seguir en contacto de nuevo con el agente de prueba. Las células tratadas se comparan luego con el control y una diferencia en la expresión o actividad en el NtHMA comparado con el control es indicador de un agente que modula la expresión o actividad del NtHMA.

[0164] Cuando se mide la expresión NtHMA, detecta la cantidad de mARN que codifica un polipéptido NtHMA en la célula se puede cuantificar mediante, por

ejemplo PCR o Northern blot. Cuando se mide un cambio en la cantidad de polipéptidos NtHMA en la muestra, la detección NtHMA mediante el uso de un anticuerpo NtHMA se puede utilizar para cuantificar la cantidad de polipéptido de NtHMA en la célula utilizando técnicas conocidas. Alternativamente la actividad biológica (por ejemplo, transporte de metal pesado) se puede medir antes y después del contacto con el agente de prueba.

[0165] Se apreciará que, aunque se han descrito realizaciones especificas de la invención aquí con propósito de ilustración, se pueden hacer varias modificaciones sin apartarse del espíritu y alcance de la invención. De acuerdo con lo anterior, la invención no se limita excepto por las reivindicaciones adjuntas. A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos tienen significados estándar como se entiende comúnmente por los expertos en la técnica. Aunque no todos los ejemplos, dispositivos y materiales se han descrito con particularidad, materiales y métodos alternos, que pueden ser similares o equivalentes a aquellos descritos aquí, se pueden aplicar para elaborar las composiciones descritas y para practicar los métodos descritos.

[0166] Cualquier publicación citada o descrita aquí proporciona información relevante descrita antes de la fecha de presentación de la actual solicitud. Las declaraciones hechas aquí no constituyen una admisión de que los inventores no tienen derecho a preceder tales descripciones.

JLS

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido aislado seleccionado del grupo que consiste de:

un polinucleótido que comprende o consiste de una secuencia que tiene por lo menos 70% de identidad de secuencia para la SEQ ID NO:1, y que codifica un transportador NtHMA que tiene actividad ATPasa tipo P1 B;

un polinucleótido que comprende o consiste de una secuencia que tiene por lo menos 70% de identidad de secuencia para la SEQ ID NO: 3;

un polinucleótido que comprende o consiste de una secuencia que tiene por lo menos 70% de identidad de secuencia para la SEQ ID NO: 47;

un polinucleótido que comprende o consiste de una secuencia que codifica un polipéptido que tiene por lo menos 70% de identidad de secuencia para la SEQ ID NO:2, en donde el polipéptido es un transportador NtHMA que tiene actividad ATPasa tipo P1 B; y

un polinucleótido que comprende o consiste de una secuencia que codifica un polipéptido que tiene por lo menos 70% de identidad de secuencia para la SEQ ID NO: 49, en donde el polipéptido es un transportador NtHMA que tiene actividad ATPasa tipo P1 B.

2. Un vector de expresión que comprende el polinucleótido aislado de la reivindicación 1.

726.

3. Una planta transgénica hecha mediante un proceso que comprende introducir el polinucleótido aislado de la reivindicación 1 o el vector de expresión de la reivindicación 2.

4. Una estirpe celular hecha mediante un proceso que comprende introducir el polinucleótido aislado de la reivindicación 1 o el vector de expresión de la reivindicación 2.

5. Un producto de tabaco consumible que incorpora hojas cosechadas de la planta transgénica de la reivindicación 3.

6. Una construcción ARNi NtHMA capaz de inhibir la expresión de un ARN mensajero NtHMA al que esta corresponde, la construcción comprende o consiste de:

una primera secuencia que tiene por lo menos 70% de identidad de secuencia a una porción de la SEQ ID NO:3 o 47;

una segunda secuencia; y

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

en donde la segunda secuencia se posiciona entre la primera secuencia y la tercera secuencia, y la segunda secuencia se liga operablemente a la primera secuencia y a la tercera secuencia.

7. La construcción ARNi NtHMA de la reivindicación 6, en donde:

(a) la primera secuencia tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia a una secuencia seleccionada de una o más del grupo que consiste de: exón 1 (SEQ ID NO:5), un fragmento de exón 1 (SEQ ID NO:5), exón 2 (SEQ ID NO:7), un fragmento de exón 2 (SEQ ID NO:7), exón 3 (SEQ ID NO:9), un fragmento de exón 3 (SEQ ID NO:9), exón 4 (SEQ ID NO:11), un fragmento de exón 4 (SEQ ID NO:11), exón 5 (SEQ ID NO:13), un fragmento de exón 5 (SEQ ID NO: 13), exón 6 (SEQ ID NO: 15), un fragmento de exón 6 (SEQ ID NO:15), exón 7 (SEQ ID NO: 17), un fragmento de exón 7 (SEQ ID NO: 17), exón 8 (SEQ ID NO: 19), un fragmento de exón 8 (SEQ ID NO: 19), exón 9 (SEQ ID NO:21), un fragmento de exón 9 (SEQ ID NO:21), exón 10 (SEQ ID NO:23), un fragmento de exón 10 (SEQ ID NO:23), exón 11 (SEQ ID NO:25), y un fragmento de exón 11 (SEQ ID NO:25);

(b) la segunda secuencia tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia a una secuencia seleccionada de una o más del grupo que consiste de: intrón 1 (SEQ ID NO:4), un fragmento de intrón 1 (SEQ ID NO:4), intrón 2 (SEQ ID NO:6), un fragmento de intrón 2 (SEQ ID NO:6), intrón 3 (SEQ ID NO:8), un fragmento de intrón 3 (SEQ ID NO:8), intrón 4 (SEQ ID NO: 10), un fragmento de intrón 4 (SEQ ID NO: 10), intrón 5 (SEQ ID NO:12), un fragmento de intrón 5 (SEQ ID NO:12), intrón 6 (SEQ ID NO:14), un fragmento de intrón 6 (SEQ ID NO:14), intrón 7 (SEQ ID NO:16), un fragmento de intrón 7 (SEQ ID NO:16), intrón 8 (SEQ ID NO:18), un fragmento de intrón 8 (SEQ ID NO: 18), intrón 9 (SEQ ID NO:20), un

fragmento de intrón 9 (SEQ ID NO:20), intrón 10 (SEQ ID NO:22), un fragmento de intrón 10 (SEQ ID NO:22), intrón 11 (SEQ ID NO:24), un fragmento de intrón 11 (SEQ ID NO:24), intrón 12 (SEQ ID NO:26), y un fragmento de intrón 12 (SEQ ID NO:26);

(c) la tercera secuencia tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia a una secuencia seleccionada de una o más del grupo que consiste de: SEQ ID NO:27, un fragmento de la SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, un fragmento de la SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, un fragmento de la SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, un fragmento de la SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, un fragmento de la SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, un fragmento de la SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, un fragmento de la SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, un fragmento de la SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, un fragmento de la SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, un fragmento de la SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, y un fragmento de la SEQ ID NO:37;

(d) la primera secuencia comprende la SEQ ID NO:38, la segunda secuencia comprende la SEQ ID NO:39, y la tercera secuencia comprende la SEQ ID NO:40;

(e) la primera secuencia comprende la SEQ ID NO:42, la segunda secuencia comprende la SEQ ID NO:43, y la tercera secuencia comprende la SEQ ID NO:44; o

(f) uno o dos o tres de (a), (b), (c), (d) y (e).

8. La construcción ARNi NtHMA de la reivindicación 6, en donde la primera y la segunda secuencia cada una tiene una longitud seleccionada del grupo que consiste de 20-30 nucleótidos, 30-50 nucleótidos, 50-100 nucleótidos, 100-150 nucleótidos, 150-200 nucleótidos, 200-300 nucleótidos, 300-400 nucleótidos, 400-500 nucleótidos, 500- 600 nucleótidos, y 600-700 nucleótidos.

9. Una planta transgénica que comprende el ARNi de cualquiera de las reivindicaciones 6 - 8 que tiene niveles de Cd reducidos en por lo menos una parte de la planta comparada con la parte en una contraparte no transgénica.

10. Un producto de tabaco consumible que incorpora hojas cosechadas de la planta transgénica de la reivindicación 9.

11. El producto de la reivindicación 10, en donde un % de reducción de Cd es un valor de por lo menos aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99%.

12. El producto de la reivindicación 10 o reivindicación 11, en donde el contenido de Cd es un valor que varía de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 0.05 ppm, de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 0.1 ppm, de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 0.5 ppm, de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 1.0 ppm, o de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 5 ppm.

13. Un método para reducir niveles de Cd en por lo menos una parte de una planta, que comprende: reducir niveles de un mARN NtHMA en la planta al provocar la expresión de una construcción de ARNi.

14. El método de la reivindicación 13, en donde la construcción ARNi comprende:

una primera secuencia que tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia a una porción de la SEQ ID NO:3 o 47;

una segunda secuencia; y

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

en donde la segunda secuencia se posiciona entre la primera secuencia y la tercera secuencia, y la segunda secuencia se liga operablemente a la primera secuencia y a la tercera secuencia.

15. El método de la reivindicación 13 o reivindicación 14, en donde luego de la expresión de la construcción ARNi, la parte de la planta tiene un contenido de Cd reducido en por lo menos aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99%.

231

16. El método de cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en donde luego de la expresión de la construcción ARNi, la parte de la planta tiene un contenido de Cd que varía de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 0.05 ppm, de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 0.1 ppm, de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 0.5 ppm, de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 1.0 ppm, o de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 5 ppm.

17. Un polipéptido purificado sustancialmente que tiene por lo menos 70% de identidad de secuencia, o por lo menos 95% de identidad de secuencia, con la SEQ ID NO:2 o 49, en donde el polipéptido es un transportador NtHMA que tiene actividad ATPasa tipo P1 B.

18. Un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido como se define en las reivindicaciones 17, tal como un polipéptido que comprende o consiste de la SEQ ID NO:2 o 49.

PLANTAS TRANSGÉNICAS MODIFICADAS PARA REDUCIR TRANSPORTE DE CADMIO, PRODUCTOS DERIVADOS, Y MÉTODOS RELACIONADOS

RESUMEN

La invención se dirige en parte a plantas transgénicas, que incluyen plantas de tabaco transgénicas y semillas derivadas, modificadas genéticamente para impedir el trasporte de Cadmio (Cd) del sistema de raíz a las porciones aéreas de plantas transgénicas al reducir los niveles de expresión de los transportadores relacionados con HMA. La invención incluye plantas de tabaco transgénicas modificadas genéticamente para expresar establemente una construcción de ARNi que codifica polinucleótidos de ARNi que posibilitan la degradación de variantes ARN NtHMA endógenas. La expresión reducida de transportadores NtHMA en plantas transgénicas resulta en contenido sustancialmente reducido de Cadmio (Cd) en la lámina de hoja. Varios productos consumibles que son sustancialmente libres o reducidos sustancialmente en el contenido de Cd se pueden producir al incorporar hojas derivadas de plantas de tabaco transgénicas modificadas para reducir la expresión de transportadores NtHMA.

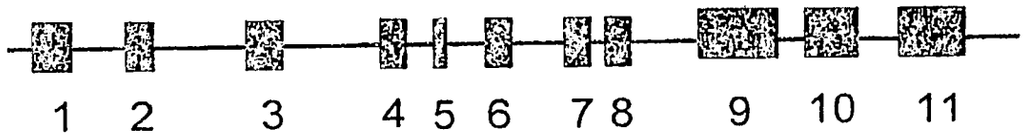


FIG.1

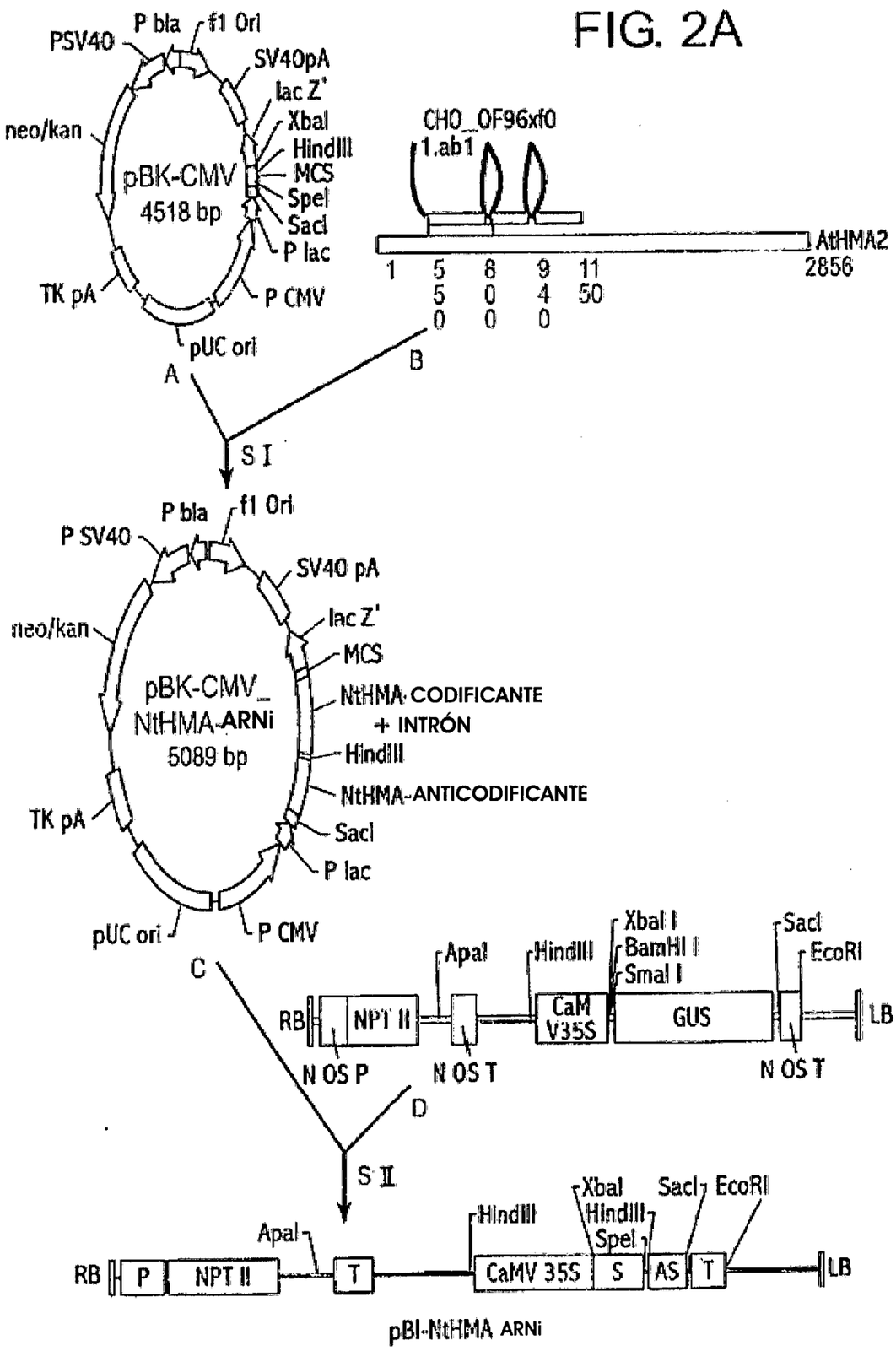


FIG. 2A

pBI-NtHMA ARNi

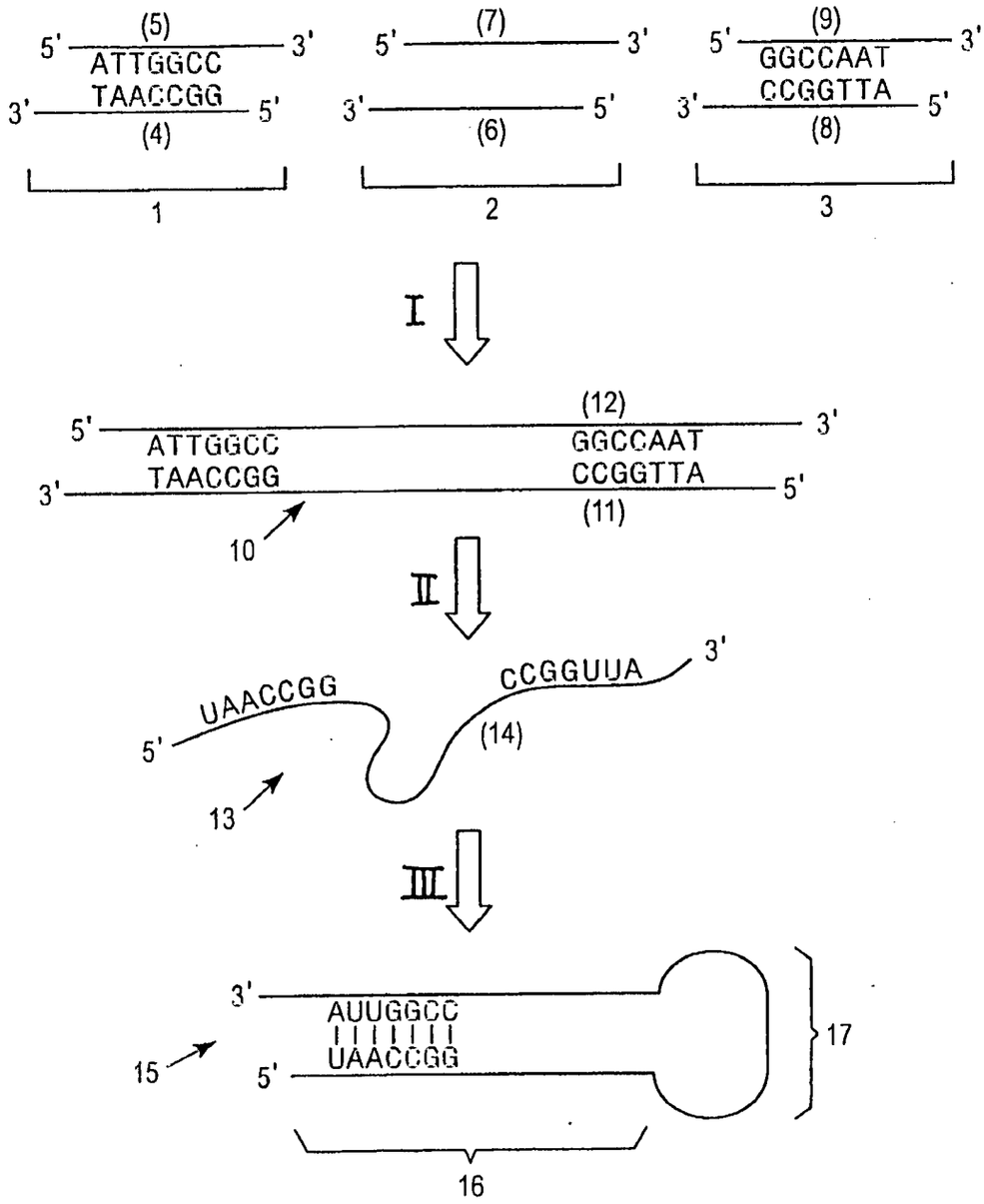

(5)
5'
ATTGGCC
3'
TAACCGG
5'
(4)
1
(7)
5'
3'
(6)
2
(9)
5'
GGCCAAT
3'
CCGGTTA
5'
(8)
3
I
(12)
5'
ATTGGCC
GGCCAAT
3'
TAACCGG
CCGGTTA
5'
(11)
10
II
3'
UAACCGG
CCGGUUA
5'
(14)
13
III
3'
AUUGGCC
UAACCGG
5'
15
17
16

FIG. 2B

SEQ ID NO:38

5'-ATTTGTAGTGCCAGCCCAGACCGTTGAATCTATTTGCTTAGAAAC
TGGAAACGACTCGCCTGTCAGTGTTTTCTCGTCCACGTCACATTCCC
CTTCCATTACAACTCCATCAATAGGTATAGTTTCACCAGCTTTAACAG
CAAGAATGCTATTCAACTTGACTTCATCAACATTTACGACTTCTCCAC
TTTCAGCTAAAACTGCTGTTGGAGGGACTATATTGACCAGTGATGAC
ATAGCAGCAGTAGCCTACATAACCA-3'

SEQ ID NO:39

5'-AGCCTGAAGAATTGAGCAAATAACATTAACAAACAATACTTGAAG
TTTCAGCACTAAATAAATGAAGCATGAAGGAATACTACACTACCATTT
AGA-3'

SEQ ID NO:40

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

FIG. 3A

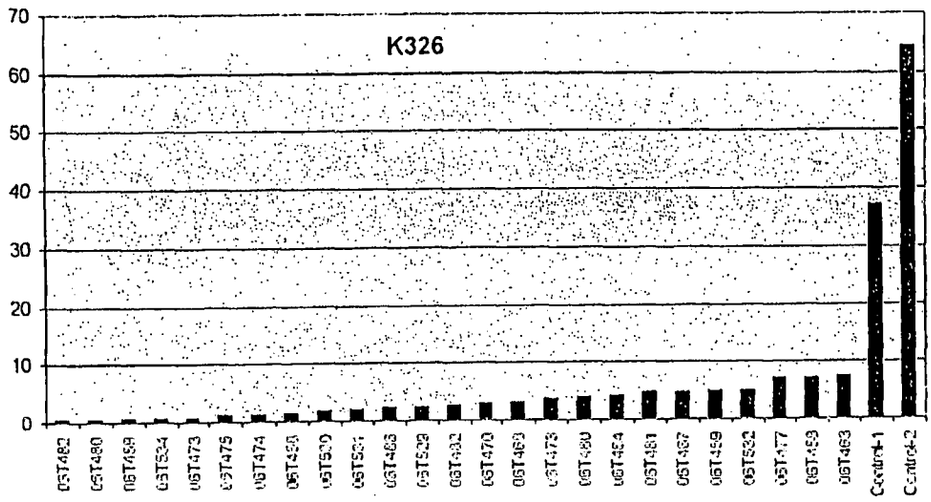

K326
70
60
50
40
30
20
10
0
Control-1
Control-2

FIG. 3B

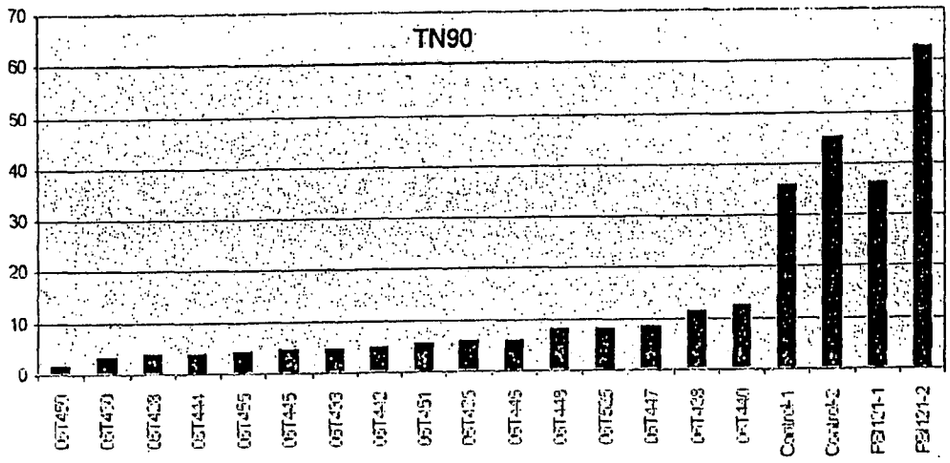

TN90
70
60
50
40
30
20
10
0
Control-1
Control-2
FB121-1
FB121-2

FIG. 3C

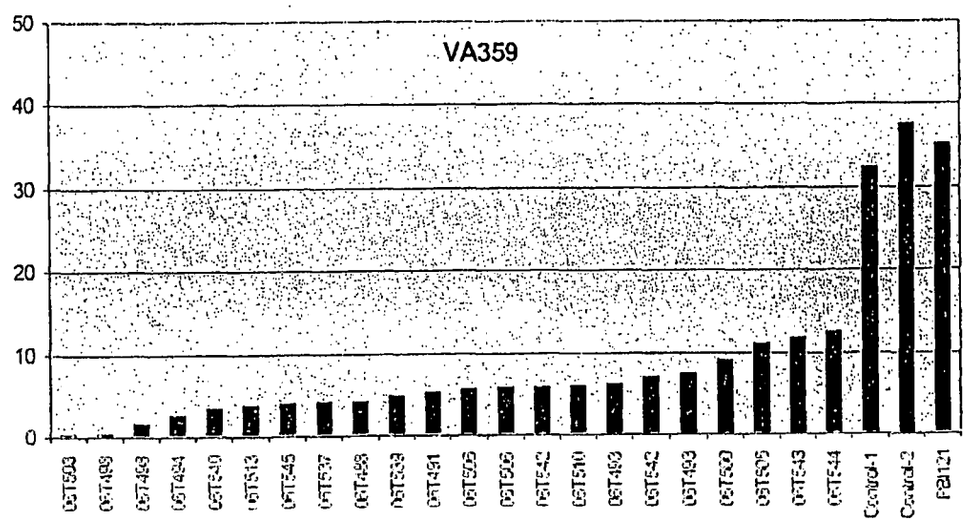


FIG. 3D

SEQ ID NO:42

5'-TGAGAGCAAGTCAGGTCATCCGATGGCAGCCGCTCTGGTGGAC
TATGCACAATCAAATTCCGTTGAGCCAAAGCCTGATAGAGTTGAGCA
GTTTCAAAATTTTCCTGGTGAAGGGATATTTGGAAGAATTGATGGAAT
GGAAATCTATGTCGGGAATAGGAAAATTTCTTCAAGAGCTGGATGTA
CCACAGG-3'

SEQ ID NO:43

5'-TAAATGGTTGAATCATTTCTTATGCTCATAGTAGAGATAAAACATC
AGAGTTATAATTATAAGTATATGATTTCTCCAGTTAATTTTGCTGTTAG
ATTTTCTTTGACCTGTTTAGCACTAATGCGGTGGATGTTTGAA-3'

SEQ ID NO:44

5'-CCTGTGGTACATCCAGCTCTTGAAGAAATTTTCCTATTCCCGACA
TAGATTTCCATTCCATCAATTCTTCCAAATATCCCTTCACCAGGAAAA
TTTTGAAACTGCTCAACTCTATCAGGCTTTGGCTCAACGGAATTTGAT
TGTGCATAGTCCACCAGAGCGGCTGCCATCGGATGACCTGACTTGC
TCTCAATGC-3'

FIG. 4A

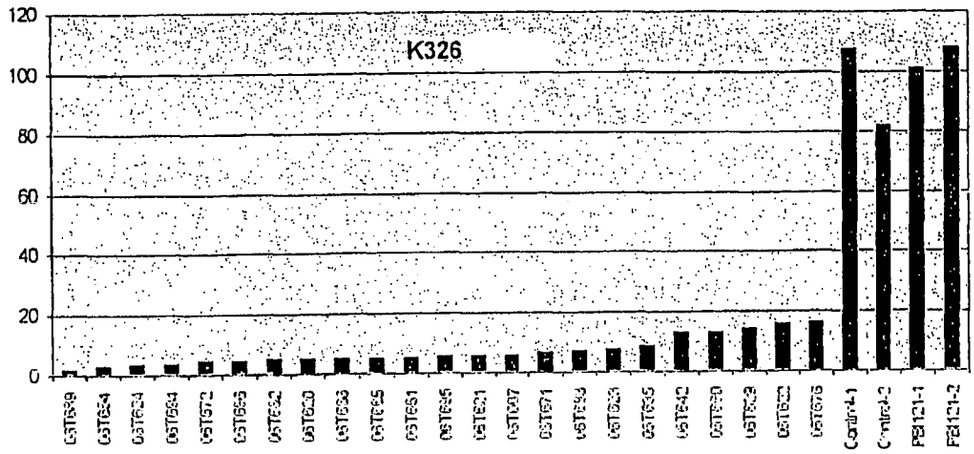

K326
120
100
80
60
40
20
0
Control-1
Control-2
PB121-1
PB121-2

FIG. 4B

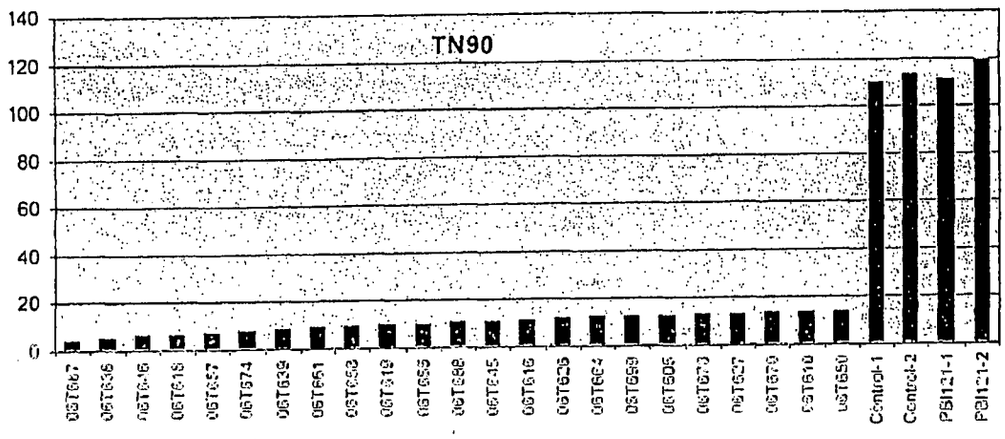

TN90
140
120
100
80
60
40
20
0
Control-1
Control-2
PB121-1
PB121-2

FIG. 4C

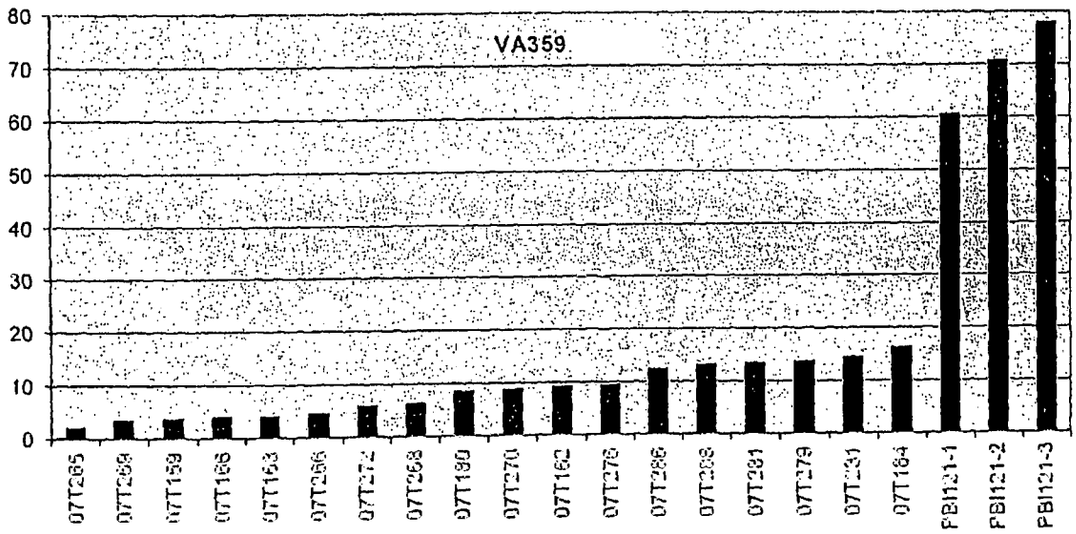

VA359
80
70
60
50
40
30
20
10
0
07T265
07T269
07T159
07T166
07T163
07T256
07T272
07T268
07T190
07T270
07T162
07T278
07T286
07T288
07T281
07T279
07T231
07T164
PBI121-1
PBI121-2
PBI121-3

FIG. 4D

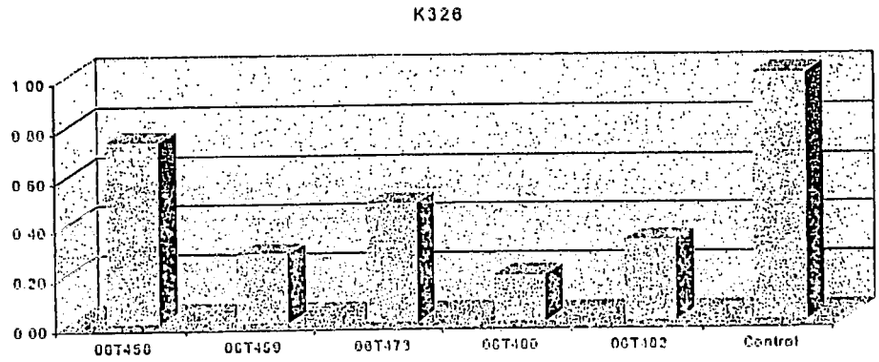


FIG. 5A

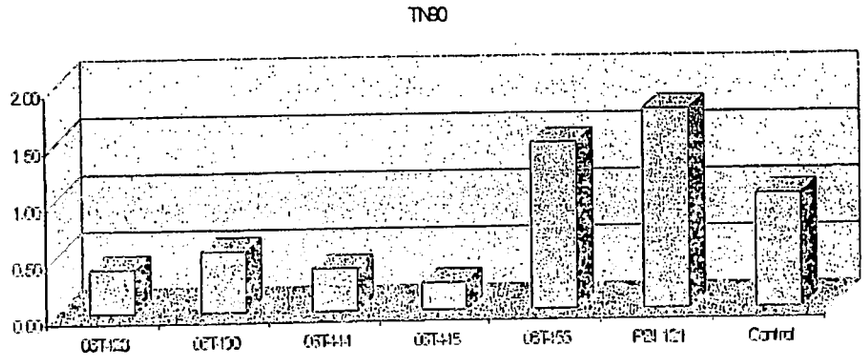


FIG. 5B

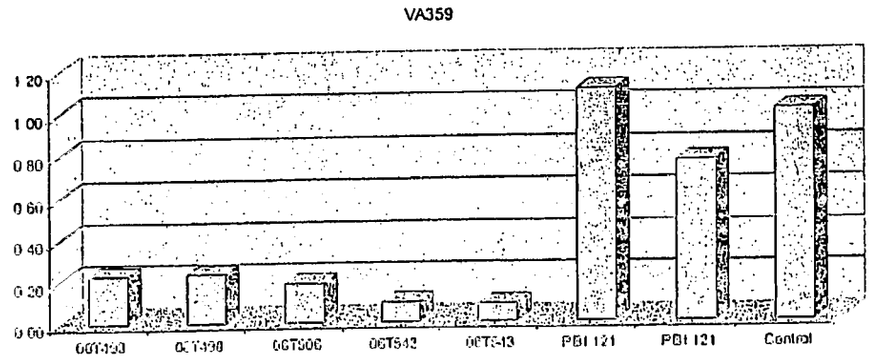


FIG. 5C

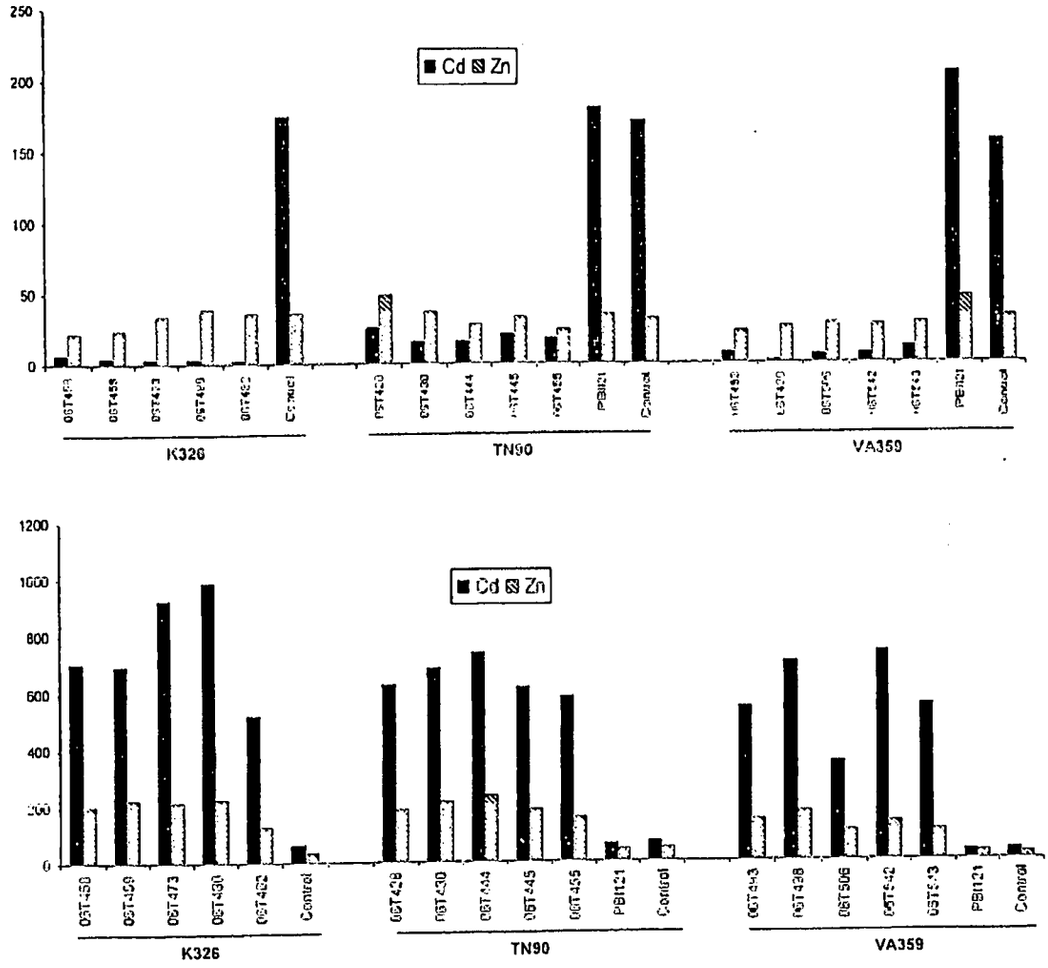

Cd Zn
250
200
150
100
50
0
Control
K326
TN90
VA359
Cd Zn
1200
1000
800
600
400
0
Control
K326
TN90
VA359

FIG. 6

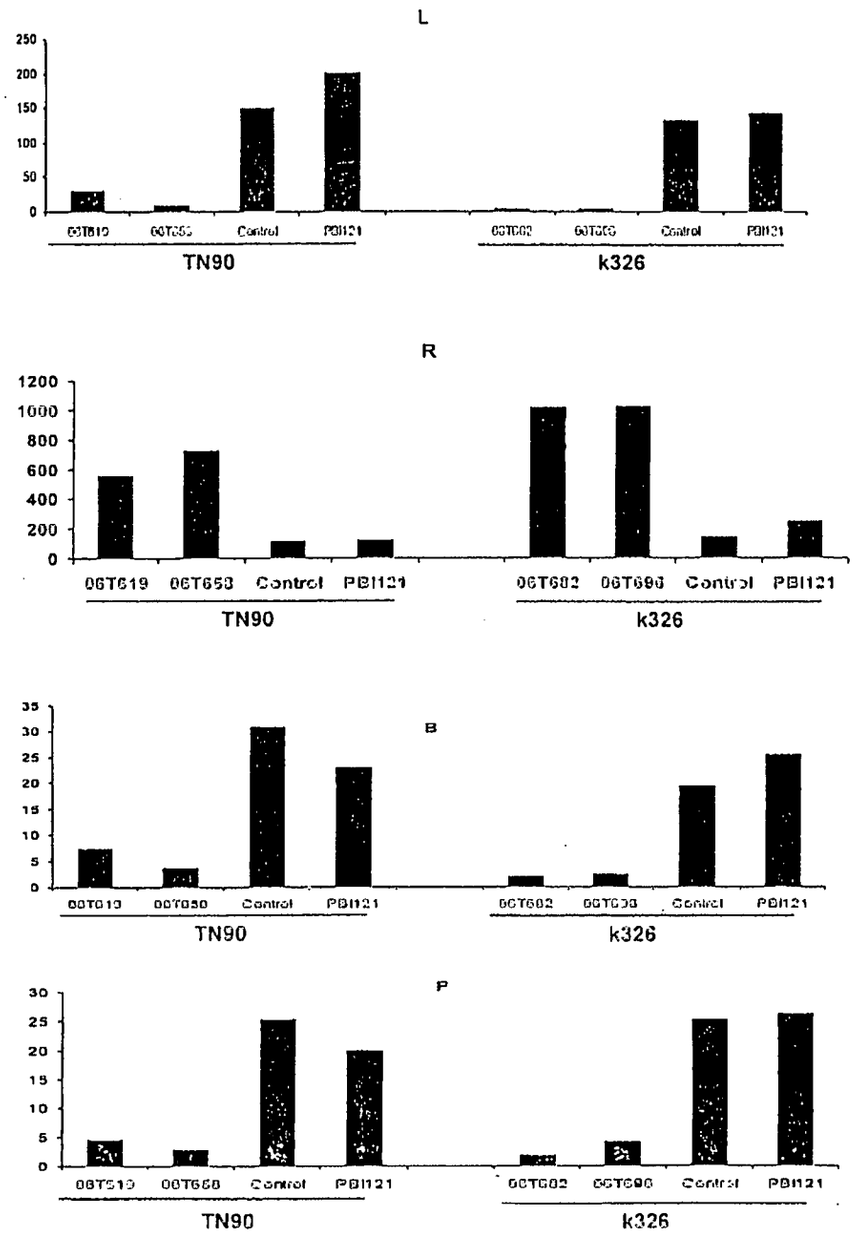

L
250
200
150
100
50
0
06T619
06T653
Control
PBI121
06T602
06T696
Control
PBI121
TN90
k326
R
1200
1000
800
600
400
200
0
06T619
06T653
Control
PBI121
06T602
06T696
Control
PBI121
TN90
k326
B
35
30
25
20
15
10
5
0
06T619
06T653
Control
PBI121
06T602
06T696
Control
PBI121
TN90
k326
P
30
25
20
15
10
5
0
06T619
06T653
Control
PBI121
06T602
06T696
Control
PBI121
TN90
k326

FIG. 7

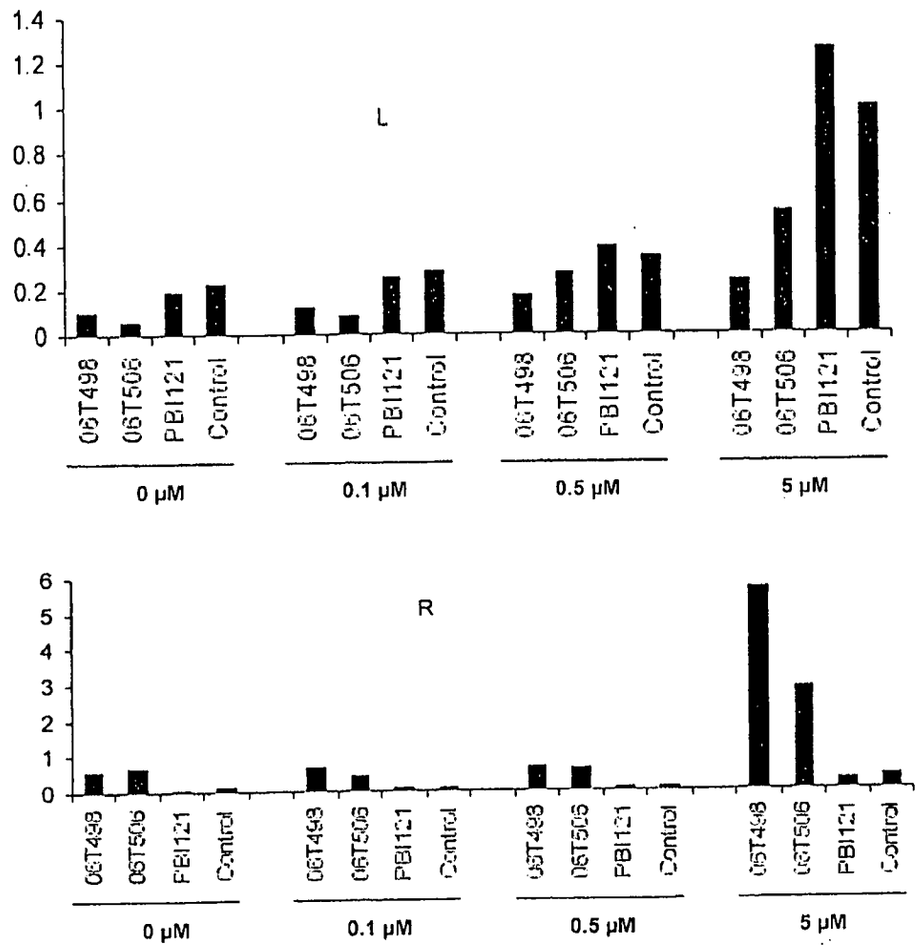

L
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
06T498
06T506
PBI121
Control
0 µM
0.1 µM
0.5 µM
5 µM
R
6
5
4
3
2
1
0

FIG. 8

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Philip Morris Products S.A.

<120> Plantas Transgénicas Modificadas para Reducir el Transporte de Cadmio, Productos Derivados, y Métodos Relacionados

<130> P/61020.W001/MAR

<150> US 60/996,982
<151> 2007-12-13

<160> 57

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 17921
<212> ADN
<213> Nicotiana tabacum

<400> 1

gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt 60

aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta 120

tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc 180

gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gccttttttac ggttcctggc 240

cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt tcctgcgtta tcccctgatt ctgtggataa 300

ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgccgc agccgaacga ccgagcgcag 360

cgagtcagtg agcgaggaag cggaagagcg cccaatacgc aaaccgcctc tccccgcgcg 420

ttggccgatt cattaatgca gctggcacga caggtttccc gactggaaag cgggcagtga 480

gcgcaacgca attaatgtga gttagctcac tcattaggca ccccaggctt tacactttat 540

gcttccggct cgtatgttgt gtggaattgt gagcggataa caatttcaca caggaaacag 600

ctatgaccat gattacgcca agctatttag gtgacgcgtt agaatactca agctatgcat 660

caagcttggt accgagctcg gatccactag taacggccgc cagtgtgctg gaattcgccc 720

ttatcacctc tttccaaaac aaaagtatat ccaatatatt ccagaactag aaattccttt 780

ttcatctatt atcttctcct cctccttaga gaaggagaaa aatggtggaa agtgaaaaaa 840

tgaatgaaac aaagaagttg agcaagagct attttgatgt tttgggaatt tgctgtactt 900

cagaagttgt tctagttgaa aaaattctca agaatcttga aggggttaaa gaggtttcag 960

taattgtcac aacaaagact gtcattgtta ttcatgattc tcttctcatt tctccgcaac 1020

aaattggtaa gaaagatagt tacacacctt tattactctc tcagttctat tttttacgtg 1080

atactatttt cttttttaata tgttctgaaa agaacgttac cttttttatat attgatgtaa 1140

tttcacttta aacttcatat tttttttctt aaatagtatt gttttatagt cataaaaata 1200

ttattataag tctttcttaa gttttgtggc ttgttaaata aattcacata aaatgaaata 1260

aagcggtagg agtaccattc ttcatctttt cttaattaac tgacatttcc tttcttttt 1320

gtaagtttat atatattaag taaagtgatt tttctcttaa gaaatcgcca aaaaaaaaaa 1380

ggaaagagaa gagaagagac aagaaggggg agacaaatgg aatcagaaac ggttttgatt 1440

tgttcaagtg atatttggtg gtagttgttt caagcactgt tctttctgtt tgttggcatt 1500
tgctagaatt aagtgtatat attaatttgg gaaaatcttt aaagtggtta tttttagttt 1560
tattagattg agtaaccaag acggaaaaaa catgaactat ttttcttttg aaatttctag 1620
tcaagaacat gcataaaaat tctcttttaa aacgactctc ataaaaattc atgtggtcga 1680
gtttacgcag cacatggacc catagtctcc gcctaactaa gtattttaag tatgtatttt 1740
ctaaaattca tctaatattt tctgttggcg cacatgctcc acaaaagatg aattgtgcat 1800
ttgtttgaat attgagttat tactcaaagg aatatggatc aattccactt ttttttcttt 1860
ttctttaata ttgtacccat atcttaaaaa ttctagctcc gcctccgact tgcccatcgt 1920
atccgcccca gccctcagtg ggatagagta ggtgaggagt atagtttata aatgtttttt 1980
ctctaacaat taggttttgg aataaattct gagattcaat ggtctatttg aaacctgtaa 2040
ttactactcc ctccgtttca tattagatga ttactttcct ttttagtcta ttccaaaaca 2100
aataacacat ttctaaattt ggaaataatt caattttaaa atctttcatt ttacccattt 2160
accttaatga atgtttttat agccacacaa atgtcatgac cccacaaatt ttttacccct 2220
taaactttta agaccacaaa ttttaaaagt ttcttctttt ttcttaaact atatgccaag 2280
taaaactaac tcatcttgaa acggaggagt actataagaa tagttatata tgatttggcc 2340
ccacaaatta cataattgtg gcaagaaatc caagtttcta gttgttgata atttagtgat 2400
ggaggcgatc tctgttgaac cgttagagaa aatattttga ctcatgtcgc tttgcatcta 2460
ctgtgttgaa gagtagttgc taggaactaa caaagtaatt gtagtttcct tgttttttt 2520
ttttcctttc ttgatgaatt actgtacttt attttcccat ttttttaacg tctgttactt 2580
atggtcagtt ttcaagtgtg aaaaattagc cagaaagaat aattcaacaa acttaacctt 2640
ttcttttctt cattcttgcg atctttccta aatatattta gtagagtctc ttttctactt 2700
cagtcttatt gcatttcttg cacacctaac agtagtggta cataaattgg acctagctaa 2760
caaaaggtaa ctcttatctg caagtttaat tggtacagta acatgaaact tgttataatc 2820
ttttaaattg cagccgataa tatatgtatg ttttacattg gttgtgtgta tataatgtaa 2880
attctttaca gcatgtttga ctaacctgca aaaattagtt tttttttttt caaaagtatt 2940
tttggtgaga agcagtttgt gtttggctaa gtaatttgaa aaatacttct gagcaacaat 3000
tagtgtttgt ccaagctttt aaaaactgct tttaattgta tttttgtcaa aagagctttt 3060
taaaaaagta ttttttagag agaaactact tttttctgct tctccaaaat tgtttctgct 3120
tctcctcaaa aacacttttt ttccttctaa aagcttgtac aaacacttca actaaaaaaa 3180
atatattagc acttatatta tccttataat tattgaagtt accatctatc ttttgtggat 3240
gtagttaaag cattgaatca agcaagatta gaagcaagca taagagtgaa aggagagaaa 3300
aactaccaaa agaaatggcc aagtccattt gcaattggca gtgaaatatt gcttggactc 3360
tcatctttga agtacttttt tgcacctttc caatggttag cacttgcagc tgttgcagtt 3420
gggattcctc caattatttt tagaggtgtg gctgccgtgc gaaacctcac tcttgacatc 3480

gacattcttg ttttaatagc aggtactttg cttttccttt tctttctttt taacttttttg 3540
aaaagcaaaa agagatactc ccttttgtcc caatttatat ggcggtattt aattaaacaa 3600
aaaaatctaa gaaaaatatg aatactttaa aaatttatgg tttgaaataa atcttaggca 3660
tctaaataca aggttaaaat aataatttta aagttaaaaa attcaagaaa gaaaggaaga 3720
cttctaaaat ttgtggcaag aaataaatct tagagatttg tgttataaat catctcacta 3780
aggctaaaat aataatttta aagttaaatt acttttaatt atgaaaaggt gatagatttt 3840
tgggaaaaga tagaaaagaa aactgtgcta tataaattga gacagagaga gtaatttacc 3900
ataagagtat ttgaagttga tttggttata gaattaacat gtgctcctac tttagctttg 3960
tgattgaaat ttggctattg ctttaatttc ttagctaatt ggatgcttct aatgtgatgc 4020
ttgaatcctt attcttgata atgctttgtg attcattatt tcattaaaaa gcatgcacca 4080
tagggcatgc aattaaatat tgtatttaag aatgcacttt taactaaccc acaagattgg 4140
agtgggaggg atgattcttg ggtgttagat gctaatattg gaccacccta gtgactttaa 4200
ataacgaaag catgaaaaac aattattgga tgcttgatat actttatgtt ataatatttt 4260
caggtgacct agaactacac aaataaactt ctttttccat attggaatag gatgatttag 4320
atttcaagat ggaattagtg attctatcac agattatctt ttatttaatg atatcaaata 4380
tgaaaagaga aaaaaaaaag gtgtctagga aatagtcaga aagatagtat gacatatatt 4440
attgatacaa attaatcagc tcaacacaaa ggctagcata tatttaacaa atagttatag 4500
acttgtagtg ttgtaccttt agttaagaga ctaaacacta ccaaaaggtt gcgatggagc 4560
agtaggtact cctctattgt catccaggcg ccttgatata aattaattag atcccaaaac 4620
gaggatcaga taccaaataa aaaacaaaaa gaaactatct ttagtgtttg ttgatttaca 4680
tggcgtagaa aaataaagga caatataata aaaaccttgg aatatcagtt aagatgcctt 4740
aatttcaaat cagtggagta tattccgact tccgtattaa tttcgctcta atcaagtctt 4800
ttaaaagatt aaataatgaa aagtttttat agtcacgaaa acattatgac cacaaaattt 4860
tgtcctttaa gctttttaga ccataaattt caaaaaaaaa aatttgactg aaatatttaa 4920
taccacatat ttttaaaaaa ttattttttt cttacattta gtgtcaagta aaattagatg 4980
tgataggaaa aaagaatttc gatttcgtct agtaaggaaa gtacaaaatt gcttatgtaa 5040
ctcgtaatat atcagaaatg gtttcccagg tgtaaagcac aaacaacgga gcccacatca 5100
gtaatgtgta aatgtgtaac gtttactctc ttttttttcct caaataattg caaagaaaat 5160
gactttcctg caagtctttc ttgccccttt tatagaaggt gacgttgact cgtaccagat 5220
tttcttgtca tagtattaat cagtagtaat atcagtcacg gcgaggttta aaatttagtc 5280
tattagtaac gtaaataatt tttaaattgt catatttagt taatctaaaa tatcatgcaa 5340
ttttttatat caagtttgat atgttgacgt aaataataga acaataattt ataaacttga 5400
ttaaattgca ttgataataa atcaaaatat tatttgaacg attaaaatct cacagttaat 5460
tttgcatctt gcataaaaaa atatccatca tatttccttg attatcattt gatgccgtct 5520
tagtttcttt taaaaaaatt tagaatttat atcaaatatg atttttttaat tactcgaact 5580

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

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

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

252

tggcgctaca aatctaaatg gtagtatagt atttcttcat gcttcattta tttagtgctg 11820
aaacttcaag tattgtttgt taatgttatt tgctcaattc ttcaggctat atcagtgtta 11880
agactacggc tttggctgaa gattgtgcgg tggctaggat ggcacagcct gtcgaagatg 11940
ctcagaacaa gaaatcaaaa acccaaagat acatcgacaa gtgtgctaaa tattatacac 12000
caggctagtg aatcttatgt tgtgccacat caagtcaaaa aatgcacgta ccgtgtgaac 12060
ttgttctttg tcttatgaat cacgtcacta tcctctccct tttcgatatg agatttccct 12120
aaggtgtcat atgaatccct tcttcggaag cttgccagca taggagtcta tcagtccttt 12180
cacttgaccc gccctctcag cctgcctgca gtcatgggcg tcgcactact atattgctct 12240
ttcgtttaaa acttttttatt tctaatactt ccctgctctt tgtgtatgtc taatttcgac 12300
tggtgatgtt ttgcagcaat tgtggctata ccagcttctt tggcaattgt tcctactgca 12360
ttaagagttc acaatcgaaa tgaatggtat cgcttggctt tggtcacatt ggtgagtgca 12420
tgtccgtgtg cactcgttct atctacacca gttgccatgt gttgcgcact ttcaaaagca 12480
gcaacgtccg gtcttctgtt taaaggagca gagtaccttg agactctagc taaaatcaaa 12540
atcatggctt ttgacaaaac agggactata actaaaggag aatttatggt gaccgagttc 12600
aagtctctga ttgatggttt tagtctcaat acactgcttt actggtaaag gttaccactc 12660
atacatattc ttttatgttg ccaaagagaa ttcaaaatct taactggtta tctttcacgg 12720
cacattgata gcgatataac atgattgatt tatatcatat attcataaaa gatgaaatag 12780
ggagtgccac attcacattc tcatattgaa gtttctgaaa tggctctaat ggttcaccat 12840
agagccaaaa taacatatag acacaacgtc agccgtctga tattcaggaa cttagatgga 12900
atagttggat cttatacatt gaggacacat aaaagtactt ggtcatataa attttagaaa 12960
tataatcaat gtattataat ctaaaattct tcaaatattc ttgatactgc aatacaaaag 13020
cacatggcac actgaataga agccttgttc ggtggtctaa aacattcgtt tagagtaaat 13080
actgagttgt ctagtgaata ttttcagggt ttcaagcatt gagagcaagt caggtcatcc 13140
gatggcaacc gctctggtgg actatgcaca atcaaattcc gttgagccaa agcctgatag 13200
agttgagcgg tttcaaaatt ttcctggtga agggatattt ggaagaattg atggaatgga 13260
aatctatgtc gggaatagga aaatttcttc aagagctgga tgtaccacag gtaaatggtt 13320
gaatcatttc ttatgctcat agtagagata aaacatcaga gttataatta taagtatatg 13380
atttctccag ttaattttgc tgttagattt tctttgacct gtttagcact aatgcggtgg 13440
atgtttgaat ttcagtacca gaaatagagg gtgatagttt caaaggaaag tctgttggat 13500
acatattttt gggatcatct ccagctggaa ttttcagtct ttccgatgtt tgtcgaattg 13560
gtgtaaaaga agcaatgaga gaactgaagc agatgggtat caaaaccgcg atgcttactg 13620
gtgatcgtta tgcagctgcc aaccatgtgc aggatcaggt atattaataa ttctgcatta 13680
cgctgaaatg attataaaac cctttggatt attgtttagt cttaagaatt ttcactgaac 13740
tcttattgtt tccttcttct atcatcaaca ttggttaaac atttcatcta aatttagaga 13800
acgtatcacc aagtaagtgc tttaccttta cagggtcata taaaatactt aagacagtgt 13860

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

```
gcaaatctct agcatcgtga caaaattctt agatcatata caactttgag aatataggct   15960
gtcacagacc cttcttcata ctgcattaga ggagagcagc caatttttta ttcatgattt   16020
gaaacaaata aagttcttct tgaggtgtat ggagaggcta tgagaatcat ttgctgagta   16080
ggtttgagat tttcaggttc aaggtcatgc agaaataaga agtgccagga ctctgcaacc   16140
gagaacagtt ttcattcacc acttactaat ccactcagtg gggaaaagct ttcggagcag   16200
aaaagcttgg atttagtccg aaaagataag gaatcaagtc atgatcttcg tcatggctgc   16260
tctgacgagg aacatgatca tacaaattta gacaaggcat atgacagttg tgccttacaa   16320
gaatgttgtt attcggttca aggcaataaa actgatgtat cagaaactgg aatccaggaa   16380
actgctcatt gtgacagcac caatcaaaca tgccaaactg caagttcagg taggcactac   16440
caaatcatat gatccaaagt gctcctccac cttcactcct acaataaatg ttcgatcaaa   16500
cttcataaga agatagcata tgcatcgcaa atctctaaaa aaatgatgga taatgttact   16560
caccaactag tttgagatag aagtttaact gattgctata tatcgttaac tataaaaaac   16620
tacttgttaa ttagagctga gattttcagg atcgatgaca tgcggaaatg ataagatcct   16680
ggactctcta agcatccatg gttgtcattc gcatgataat ccactccacg aggagaacaa   16740
cctggagcag aaaatcttgg atgttgttgg agaaggtata aaatcacctc atgctgtcgg   16800
tcatggctgt tcggacaagg aacacgatca ctcacatcca gaaaaggcat atgacagttg   16860
tgcaacagat gattgttgtt tttcagttca agtccatggc attgacgacg tatcaaaaag   16920
tgaaattcaa gaaactgctc attgtgacag cacaaagcag agcatggtca tctccagcag   16980
ctgcaaacat gaaccaaaag atcaggtaaa tcactgtgga cttcactcta aaactactcc   17040
aactgatgaa gaactagcca agctggttag aagatgctgc gaatacaaac catgccacga   17100
cgtccgttct ggctgcagga agcatgctgc agaatgtggt ccaaccgttc gatcaactat   17160
caatatctta cgggacaacc atcatcatta cctagactgc agtggtcgta aggtttgttc   17220
gctgttggag aagagacaca tcggtggatg ctgtgacagc ttcagaaaag aatgttgtgc   17280
caagaagaac caccttggag caagtttcgg aggaggttta tcagaaattg tcatagagta   17340
gatgcaatcc gaagtgtaca tatgttgtaa acttcctacc tattttatct tcaagaagtt   17400
gagctgctaa tttgaacaaa gcaagggcga attctgcaga tatccatcac actggcggcc   17460
gctcgagcat gcatctagag ggcccaattc gccctatagt gagtcgtatt acaattcact   17520
ggccgtcgtt ttacaacgtc gtgactggga aaaccctggc gttacccaac ttaatcgcct   17580
tgcagcacat ccccctttcg ccagctggcg taatagcgaa gaggcccgca ccgatcgccc   17640
ttcccaacag ttgcgcagcc tatacgtacg gcagtttaag gtttacacct ataaaagaga   17700
gagccgttat cgtctgtttg tggatgtaca gagtgatatt attgacacgc cggggcgacg   17760
gatggtgatc cccctggcca gtgcacgtct gctgtcagat aaagtctccc gtgaacttta   17820
cccggtggtg catatcgggg atgaaagctg gcgcatgatg accaccgata tggccagtgt   17880
gccggtctcc gttatcgggg aagaagtggc tgatctcagc c                       17921
```

<210> 2
<211> 1397
<212> PRT
<213> Nicotiana tabacum

<400> 2

```
Met Asn Glu Thr Lys Lys Leu Ser Lys Ser Tyr Phe Asp Val Leu Gly
1               5                  10                  15

Ile Cys Cys Thr Ser Glu Val Val Leu Val Glu Lys Val Leu Lys Asn
            20                  25                  30

Leu Glu Gly Val Lys Glu Val Ser Val Ile Val Thr Thr Lys Thr Val
        35                  40                  45

Ile Val Ile His Asp Ser Leu Leu Ile Ser Pro Gln Gln Ile Val Lys
    50                  55                  60

Ala Leu Asn Gln Ala Arg Leu Glu Ala Ser Ile Arg Val Lys Gly Glu
65                  70                  75                  80

Lys Asn Tyr Gln Lys Lys Trp Pro Ser Pro Phe Ala Ile Gly Ser Gly
                85                  90                  95

Ile Leu Leu Gly Leu Ser Phe Leu Lys Tyr Phe Phe Ala Pro Phe Gln
            100                 105                 110

Trp Leu Ala Leu Ala Ala Val Ala Val Gly Ile Pro Pro Ile Ile Phe
        115                 120                 125

Arg Gly Val Ala Ala Val Arg Asn Leu Thr Leu Asp Ile Asn Ile Leu
    130                 135                 140

Val Leu Ile Ala Val Ala Gly Ser Ile Val Leu His Asp Tyr Trp Glu
145                 150                 155                 160

Ala Gly Thr Ile Val Phe Leu Phe Ala Ile Ala Glu Trp Leu Glu Ser
                165                 170                 175

Arg Ala Ser His Lys Ala Thr Ala Ala Met Ser Ser Leu Val Asn Ile
            180                 185                 190

Val Pro Pro Thr Ala Val Leu Ala Glu Ser Gly Glu Val Val Asn Val
        195                 200                 205

Asp Glu Val Lys Val Asn Ser Ile Leu Ala Val Lys Ala Gly Glu Thr
    210                 215                 220

Ile Pro Ile Asp Gly Val Val Val Glu Gly Glu Cys Asp Val Asp Glu
225                 230                 235                 240

Lys Thr Leu Thr Gly Glu Ser Phe Pro Val Ser Lys Gln Arg Asp Ser
                245                 250                 255
```

Thr Val Trp Ala Gly Thr Thr Asn Leu Asn Gly Tyr Ile Ser Val Lys
260 265 270

Thr Thr Ala Leu Ala Glu Asp Cys Ala Val Ala Arg Met Ala Gln Leu
275 280 285

Val Glu Asp Ala Gln Asn Lys Lys Ser Lys Thr Gln Arg Tyr Ile Asp
290 295 300

Lys Cys Ala Lys Tyr Tyr Thr Pro Ala Ile Val Ala Ile Ser Ala Ser
305 310 315 320

Leu Ala Ile Val Pro Thr Ala Leu Arg Val His Asn Arg Asn Glu Trp
325 330 335

Tyr Arg Leu Ala Leu Val Thr Leu Val Ser Ala Cys Pro Cys Ala Leu
340 345 350

Val Leu Ser Thr Pro Val Ala Met Cys Cys Ala Leu Ser Lys Ala Ala
355 360 365

Thr Ser Gly Leu Leu Phe Lys Gly Ala Glu Tyr Leu Glu Thr Leu Ala
370 375 380

Lys Ile Lys Ile Met Ala Phe Asp Lys Thr Gly Thr Ile Thr Lys Gly
385 390 395 400

Glu Phe Met Val Thr Glu Phe Lys Ser Leu Ile Asp Gly Phe Ser Leu
405 410 415

Asn Thr Leu Leu Tyr Trp Val Ser Ser Ile Glu Ser Lys Ser Gly His
420 425 430

Pro Met Ala Ala Ala Leu Val Asp Tyr Ala Gln Ser Asn Ser Val Glu
435 440 445

Pro Lys Pro Asp Arg Val Glu Gln Phe Gln Asn Phe Pro Gly Glu Gly
450 455 460

Ile Phe Gly Arg Ile Asp Gly Met Glu Ile Tyr Val Gly Asn Arg Lys
465 470 475 480

Ile Ser Ser Arg Ala Gly Cys Thr Thr Val Pro Glu Ile Glu Gly Asp
485 490 495

Ser Phe Lys Gly Lys Ser Val Gly Tyr Ile Phe Leu Gly Ser Ser Pro
500 505 510

Ala Gly Ile Phe Ser Leu Ser Asp Val Cys Arg Ile Gly Val Lys Glu
515 520 525

1st

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Gln Phe Gln Asn Gln Ser Arg Ala Glu Ile Ile Ser Ala Gln Thr
805 810 815

Pro Leu Lys Ile Val Val Phe Ile Leu Ile Pro Val Leu Asn Ala Ala
820 825 830

Arg Arg Arg Trp Leu Leu Lys Arg Ala Asn Leu Gln Phe Gln Asn Gln
835 840 845

Ser His Val Glu Ile Ile Ser Ala Gln Thr Pro Leu Lys Asn Ser Gly
850 855 860

Phe His Ser His Pro Arg Pro Gln Cys Cys Ser Ser Lys Met Ala Ala
865 870 875 880

Lys Ala Gly Gln Ser Ala Leu Ser Glu Ser Lys Ser Cys Gly Asn Asn
885 890 895

Asn Cys Ser Asp Ser Ile His Lys Ser Asn Cys His Ser Leu Thr Asn
900 905 910

Ser Leu Val Cys Ser Ser Lys Met Ser Ala Pro Gln Cys His Ser Ala
915 920 925

Thr Ser Ser Asn Lys Ser Cys Gly Ser Thr Lys Cys Ser Asp Phe Ser
930 935 940

Asp Lys Lys Cys Cys Gln Ser Asp Lys Ile Pro Gln Thr Cys Ser Thr
945 950 955 960

Lys Lys Ser Ala Pro Gly Cys Gln Ser Ala Val Ser Gly Ser Lys Ser
965 970 975

Cys Gly Asn Ser Lys Cys Ser Asp Ser Lys Asp Asn Ser Ser His Pro
980 985 990

Ser His Pro Asp His Gln Thr Cys Met Ser Lys Leu Cys Ala Pro Gln
995 1000 1005

Ser Gln Ser Ala Thr Ser Ser Ser Arg Thr Cys Gly Asn Thr Lys
1010 1015 1020

Cys Ser Asp Thr Asn Ser Lys Asn Ser Cys Tyr Ser Gln Thr Asn
1025 1030 1035

Ser Glu Ser Cys Ser Ser Lys Met Ser Gly Pro Ser Cys Lys Thr
1040 1045 1050

Ala Asn Ser Gly Ser Arg Ser Cys Arg Asn Lys Lys Cys Gln Asp
1055 1060 1065

Ser Ala Thr Glu Asn Ser Phe His Ser Pro Leu Thr Asn Pro Leu

1070 1075 1080

Ser Gly Glu Lys Leu Ser Glu Gln Lys Ser Leu Asp Leu Val Arg
1085 1090 1095

Lys Asp Lys Glu Ser Ser His Asp Leu Arg His Gly Cys Ser Asp
1100 1105 1110

Glu Gly His Asp His Thr Asn Leu Asp Lys Ala Tyr Asp Ser Cys
1115 1120 1125

Ala Leu Gln Glu Cys Cys Tyr Ser Val Gln Gly Asn Lys Thr Asp
1130 1135 1140

Val Ser Glu Thr Gly Ile Gln Glu Thr Ala His Cys Asp Ser Thr
1145 1150 1155

Asn Gln Thr Cys Gln Thr Ala Ser Ser Gly Ser Met Thr Cys Gly
1160 1165 1170

Asn Asp Lys Ile Leu Asp Ser Leu Ser Ile His Gly Cys His Ser
1175 1180 1185

His Asp Asn Pro Leu His Glu Glu Asn Asn Leu Glu Gln Lys Ile
1190 1195 1200

Leu Asp Val Val Gly Glu Gly Ile Lys Ser Pro His Ala Val Gly
1205 1210 1215

His Gly Cys Ser Asp Lys Glu His Asp His Ser His Pro Glu Lys
1220 1225 1230

Ala Tyr Asp Ser Cys Ala Thr Asp Asp Cys Cys Phe Ser Val Gln
1235 1240 1245

Val His Gly Ile Asp Asp Val Ser Lys Ser Glu Ile Gln Glu Thr
1250 1255 1260

Ala His Cys Asp Ser Thr Lys Gln Ser Met Val Ile Ser Ser Ser
1265 1270 1275

Cys Lys His Glu Pro Lys Asp Gln Val Asn His Cys Gly Leu His
1280 1285 1290

Ser Lys Thr Thr Pro Thr Asp Glu Glu Leu Ala Lys Leu Val Arg
1295 1300 1305

Arg Cys Cys Lys Tyr Lys Pro Cys His Asp Val Arg Ser Gly Cys
1310 1315 1320

Arg Lys His Ala Ala Glu Cys Gly Pro Thr Val Arg Ser Thr Ile
1325 1330 1335

Asn Ile Leu Arg Asp Asn His His His Tyr Leu Asp Cys Ser Gly
1340 1345 1350

Arg Lys Val Cys Ser Leu Leu Glu Lys Arg His Ile Gly Gly Cys
1355 1360 1365

Cys Asp Ser Phe Arg Lys Glu Cys Cys Ala Lys Lys Lys His Leu
1370 1375 1380

Gly Ala Ser Phe Gly Gly Gly Leu Ser Glu Ile Val Ile Glu
1385 1390 1395

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

<400> 3
tcacctcttt ccaaaacaaa agtatatcca atatattcca gaactagaaa ttccttttc 60
atctattatc ttctcctcct ccttagagaa ggagaaaaat ggtggaaagt gaaaaaatga 120
atgaaacaaa gaagttgagc aagagctatt ttgatgtttt gggaatttgc tgtacttcag 180
aagttgttct agttgaaaaa gttctcaaga atcttgaagg ggttaaagag gtttcagtaa 240
ttgtcacaac aaagactgtc attgttattc atgattctct tctcatttct ccgcaacaaa 300
ttgttaaagc attgaatcaa gcaagattag aagcaagcat aagagtgaaa ggagagaaaa 360
actaccaaaa gaaatggcca agtccatttg caattggcag tggaatattg cttggactct 420
catttttgaa gtacttttct gcacctttcc aatggttagc acttgcagct gttgcagttg 480
ggattcctcc aattattttt agaggtgtgg ctgccgtgcg aaacctcact cttgacatca 540
acattcttgt tttaatagca gtggctggat caattgtttt acacgattat tgggaagctg 600
gtactattgt cttcttattc gccattgcag aatggctaga gtcaagggca agtcacaagg 660
ctaccgctgc tatgtcatca ctggtcaata tagtccctcc aacagcagtt ttagctgaaa 720
gcggagaagt cgtaaatgtt gatgaagtca aggtgaatag cattcttgct gtgaaagctg 780
gtgaaactat acctattgat ggagttgtag tggaagggga atgtgacgtg gacgagaaaa 840
cactgacagg cgagtcgttt ccagtttcta agcaaagaga ttcaacggtc tgggctggca 900
ctacaaatct aaatggctat atcagtgtta agactacggc tttggctgaa gattgtgcgg 960
tggctaggat ggcacagctt gtcgaagatg ctcagaacaa gaaatcaaaa acccaaagat 1020
acatcgacaa gtgtgctaaa tattatacac cagcaattgt ggctatatca gcttctttgg 1080
caattgttcc tactgcatta agagttcaca atcgaaatga atggtatcgc ttggctttgg 1140
tcacattggt gagtgcatgt ccgtgtgcac ttgttctatc tacaccagtt gccatgtgtt 1200
gcgcactttc aaaagcagca acgtccggtc ttctgtttaa aggagcagag taccttgaga 1260
ctctagctaa aatcaaaatc atggcttttg acaaaacagg gactataact aaaggagaat 1320
ttatggtgac cgagttcaag tctctgattg atggttttag tctcaataca ctgctttact 1380

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

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

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

<220>
<221> Intrón
<222> (1)..(723)

<400> 4
gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt 60
aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta 120
tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc 180
gtcaggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttcctggc 240
cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt tcctgcgtta tcccctgatt ctgtggataa 300
ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgccgc agccgaacga ccgagcgcag 360
cgagtcagtg agcgaggaag cggaagagcg cccaatacgc aaaccgcctc tccccgcgcg 420
ttggccgatt cattaatgca gctggcacga caggtttccc gactggaaag cgggcagtga 480
gcgcaacgca attaatgtga gttagctcac tcattaggca ccccaggctt tacactttat 540
gcttccggct cgtatgttgt gtggaattgt gagcggataa caatttcaca caggaaacag 600
ctatgaccat gattacgcca agctatttag gtgacgcgtt agaatactca agctatgcat 660
caagcttggt accgagctcg gatccactag taacggccgc cagtgtgctg gaattcgccc 720

tta 723

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

<220>
<221> exón
<222> (1)..(303)

<400> 5

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

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

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

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

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

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

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

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

<220>
<221> Intrón
<222> (1)..(2218)

<400> 6

```
gtaagaaaga tagttacaca cctttattac tctctcagtt ctatttttta cgtgatacta      60

ttttcttttt aatatgttct gaaaagaacg ttacctttt atatattgat gtaatttcac      120

tttaaacttc atatttttt tcttaaatag tattgtttta tagtcataaa aatattatta      180

taagtctttc ttaagttttg tggcttgtta aataaattca cataaaatga aataaagcgg      240

taggagtacc attcttcatc ttttcttaat taactgacat ttcctttctt ttttgtaagt      300

ttatatatat taagtaaagt gatttttctc ttaagaaatc gccaaaaaaa aaaaggaaag      360

agaagagaag agacaagaag ggggagacaa atggaatcag aaacggtttt gatttgttca      420
```

agtgatattt ggtggtagtt gtttcaagca ctgttctttc tgtttgttgg catttgctag 480
aattaagtgt atatattaat ttgggaaaat ctttaaagtg gttattttta gttttattag 540
attgagtaac caagacggaa aaaacatgaa ctatttttct tttgaaattt ctagtcaaga 600
acatgcataa aaattctctt ttaaaacgac tctcataaaa attcatgtgg tcgagtttac 660
gcagcacatg gacccatagt ctccgcctaa ctaagtattt taagtatgta ttttctaaaa 720
ttcatctaat attttctgtt ggcgcacatg ctccacaaaa gatgaattgt gcatttgttt 780
gaatattgag ttattactca aaggaatatg gatcaattcc actttttttc tcttttcttt 840
aatattgtac ccatatctta aaaattctag ctccgcctcc gacttgccca tcgtatccgc 900
cccagccctc agtgggatag agtaggtgag gagtatagtt tataaatgtt ttttctctaa 960
caattaggtt ttggaataaa ttctgagatt caatggtcta tttgaaacct gtaattacta 1020
ctccctccgt ttcatattag atgattactt tccttttttag tctattccaa aacaaataac 1080
acatttctaa atttggaaat aattcaattt taaaatcttt cattttaccc atttacctta 1140
atgaatgttt ttatagccac acaaatgtca tgaccccaca aatttttttac cccttaaact 1200
tttaagacca caaattttaa aagtttcttc ttttttctta aactatatgc caagtaaaac 1260
taactcatct tgaaacggag gagtactata agaatagtta tatatgattt ggccccacaa 1320
attacataat tgtggcaaga aatccaagtt tctagttgtt gataatttag tgatggaggc 1380
gatctctgtt gaaccgttag agaaaatatt ttgactcatg tcgctttgca tctactgtgt 1440
tgaagagtag ttgctaggaa ctaacaaagt aattgtagtt tccttgtttt ttttttttcc 1500
tttcttgatg aattactgta ctttatttttc ccatttttttt aacgtctgtt acttatggtc 1560
agttttcaag tgtgaaaaat tagccagaaa gaataattca acaaacttaa cctttttctttt 1620
tcttcattct tgcgatcttt cctaaatata tttagtagag tctctttttct acttcagtct 1680
tattgcattt cttgcacacc taacagtagt ggtacataaa ttggacctag ctaacaaaag 1740
gtaactctta tctgcaagtt taattggtac agtaacatga aacttgttat aatcttttaa 1800
attgcagccg ataatatatg tatgttttac attggttgtg tgtatataat gtaaattctt 1860
tacagcatgt ttgactaacc tgcaaaaatt agtttttttt ttttcaaaag tatttttggt 1920
gagaagcagt ttgtgtttgg ctaagtaatt tgaaaaatac ttctgagcaa caattagtgt 1980
ttgtccaagc ttttaaaaac tgcttttaat tgtatttttg tcaaaagagc tttttaaaaa 2040
agtatttttt agagagaaac tacttttttc tgcttctcca aaattgtttc tgcttctcct 2100
caaaaacact ttttttcctt ctaaaagctt gtacaaacac ttcaactaaa aaaaatatat 2160
tagcacttat attatcctta taattattga agttaccatc tatcttttgt ggatgtag 2218

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

<220>
<221> exón

<222> (1)..(258)

<400> 7

```
tta aag cat tga atc aag caa gat tag aag caa gca taa gag tga aag        48
Leu Lys His     Ile Lys Gln Asp     Lys Gln Ala     Glu     Lys
1               5                                  10

gag aga aaa act acc aaa aga aat ggc caa gtc cat ttg caa ttg gca        96
Glu Arg Lys Thr Thr Lys Arg Asn Gly Gln Val His Leu Gln Leu Ala
        15                  20                  25

gtg aaa tat tgc ttg gac tct cat ctt tga agt act ttt ttg cac ctt       144
Val Lys Tyr Cys Leu Asp Ser His Leu     Ser Thr Phe Leu His Leu
    30                  35                  40

tcc aat ggt tag cac ttg cag ctg ttg cag ttg gga ttc ctc caa tta       192
Ser Asn Gly     His Leu Gln Leu Leu Gln Leu Gly Phe Leu Gln Leu
    45                  50                  55

ttt tta gag gtg tgg ctg ccg tgc gaa acc tca ctc ttg aca tcg aca       240
Phe Leu Glu Val Trp Leu Pro Cys Glu Thr Ser Leu Leu Thr Ser Thr
    60                  65                  70

ttc ttg ttt taa tag cag                                               258
Phe Leu Phe         Gln
75
```

<210> 8
<211> 3861
<212> ADN
<213> Nicotiana tabacum

<220>
<221> Intrón
<222> (1)..(3861)

<400> 8

```
gtactttgct tttccttttc tttcttttta acttttgaa aagcaaaaag agatactccc        60

ttttgtccca atttatatgg cggtatttaa ttaaacaaaa aaatctaaga aaaatatgaa       120

tactttaaaa atttatggtt tgaaataaat cttaggcatc taaatacaag gttaaaataa       180

taattttaaa gttaaaaaat tcaagaaaga aaggaagact tctaaaattt gtggcaagaa       240

ataaatctta gagatttgtg ttataaatca tctcactaag gctaaaataa taattttaaa       300

gttaaattac ttttaattat gaaaaggtga tagatttttg ggaaaagata gaaaagaaaa       360

ctgtgctata taaattgaga cagagagagt aatttaccat aagagtattt gaagttgatt       420

tggttataga attaacatgt gctcctactt tagctttgtg attgaaattt ggctattgct       480

ttaatttctt agctaattgg atgcttctaa tgtgatgctt gaatccttat tcttgataat       540

gctttgtgat tcattatttc attaaaaagc atgcaccata gggcatgcaa ttaaatattg       600

tatttaagaa tgcacttttа actaacccac aagattggag tgggagggat gattcttggg       660

tgttagatgc taatattgga ccaccctagt gactttaaat aacgaaagca tgaaaaacaa       720

ttattggatg cttgatatac tttatgttat aatattttca ggtgacctag aactacacaa       780

ataaacttct ttttccatat tggaatagga tgatttagat ttcaagatgg aattagtgat       840

tctatcacag attatctttt atttaatgat atcaaatatg aaaagagaaa aaaaaaaggt       900
```

gtctaggaaa tagtcagaaa gatagtatga catatattat tgatacaaat taatcagctc 960
aacacaaagg ctagcatata tttaacaaat agttatagac ttgtagtgtt gtacctttag 1020
ttaagagact aaacactacc aaaaggttgc gatggagcag taggtactcc tctattgtca 1080
tccaggcgcc ttgatataaa ttaattagat cccaaaacga ggatcagata ccaaataaaa 1140
aacaaaaaga aactatcttt agtgtttgtt gatttacatg gcgtagaaaa ataaaggaca 1200
atataataaa aaccttggaa tatcagttaa gatgccttaa tttcaaatca gtggagtata 1260
ttccgacttc cgtattaatt tcgctctaat caagtctttt aaaagattaa ataatgaaaa 1320
gtttttatag tcacgaaaac attatgacca caaaattttg tcctttaagc tttttagacc 1380
ataaatttca aaaaaaaaaa tttgactgaa atatttaata ccacatattt ttaaaaaatt 1440
atttttttct tacatttagt gtcaagtaaa attagatgtg ataggaaaaa agaatttcga 1500
tttcgtctag taaggaaagt acaaaattgc ttatgtaact cgtaatatat cagaaatggt 1560
ttcccaggtg taaagcacaa acaacggagc ccacatcagt aatgtgtaaa tgtgtaacgt 1620
ttactctctt tttttcctca aataattgca aagaaaatga ctttcctgca agtctttctt 1680
gcccctttta tagaaggtga cgttgactcg taccagattt tcttgtcata gtattaatca 1740
gtagtaatat cagtcacggc gaggtttaaa atttagtcta ttagtaacgt aaataatttt 1800
taaattgtca tatttagtta atctaaaata tcatgcaatt ttttatatca agtttgatat 1860
gttgacgtaa ataatagaac aataatttat aaacttgatt aaattgcatt gataataaat 1920
caaaatatta tttgaacgat taaaatctca cagttaattt tgcatcttgc ataaaaaaat 1980
atccatcata tttccttgat tatcatttga tgccgtctta gtttctttta aaaaaattta 2040
gaatttatat caaatatgat tttttaatta ctcgaactta caagcagact aagtttgata 2100
ttttcctaat tcaacgatat acggttacta cggaaggcat ttactagaaa tactctgaga 2160
tgttactgca attattatta ttattatttt aaaaagagaa aaaaataact tttaaagctc 2220
catgtgaaat tatgtatatt ttattatagc atgaagtgac cccatttttt atctcataaa 2280
taacattgat cccatatttt tctactgtat catcactatc atgaaaaata catctagatt 2340
actgagatgt ttattggcag tagtatctac agatacaaca gatgcttcta gttctattga 2400
tgttttcatt ttgacaaaaa tttaattgag aaagcaaaag attttgcaag aattcttagg 2460
gttttattca aaaaaaaaaa agaattctta gaaatataag ttttggcaat taaataattc 2520
cagtaattgg gaaaaaacac ttgaataggc tatagaagta aaagaaactt ctatatatta 2580
ccaggcagca gagtttccca aaatcctttt ttctaaaaaa aaaatagtag aaaatgagca 2640
atgtaatttc tttaagtaac attctctatt tagtaaaatg tccatttttc taatgaggta 2700
aaagcaatag caaataaaag aaagtttatt cctttttttc gagggtgttg ccgaccaagg 2760
cttaaataga taggaataat cacctaatta agaaaaacta cctatcaatt tttgtctcgg 2820
ttggatttca acatgatacc tcatagttct acgtacgccc acttcaatta ccactaggaa 2880
caccgtttgg tgcaggaaaa ttttggtcat aaacttcaat tttaagcctt catataaaca 2940
ataaaagagc taattagcag ttaacagtcg agttaatata gctgaataat gcagttcaac 3000

taaatatgta tggaaatggt gaaaagcaca aaggtgactt atccttaggt actttatagc 3060

tttatctttt aaaaagtagt agcaagatat gatatgattc cttgaagaag aaaaggtcac 3120

tgtgactctt tatttctatc agtacctgtt tgaataaaat tggctaagaa agttgtaaaa 3180

tggactagca ggacaagaat ctcaatttgg tgttgcttta ccatctttag agtgacagca 3240

atcaaaaacc caaaaattaa ataaataata agaaaagaaa aagatgagtt attggaaagg 3300

gtaaaatgaa tgaagataag aatactccat tcagtccaaa atattaagct agcatttgga 3360

catagatttg gttgaagctt gaagaaaaga aaaaagagtt tttgaagatt atatgaaaaa 3420

taatttttga aagttaaaat tgtgttaggg aagttttgtg attcaaaaac tactctagaa 3480

ctgtttttgg gatttaaata ttttctttte aacatgtgcc aaaaaatgat taaaatctat 3540

aaacgaacac ataattgaaa aaagctctca aattttatga ccaaacagga gcttattgtt 3600

ttggcaaatt gaatttgttt cgaaatactt gatgattaag gagagacaaa ggatagtata 3660

gacaaaaggc tattagtatt tgtaattgag gctattaaat gtctttttaa agcgatgtgc 3720

aaaaaccttа aaaaagacga attatatgga ttatattaga agtagtatta aattttaatg 3780

gaacttagtg caatcatttt acaagggcat agtgttaaag ctagaaatgc tgattcttat 3840

agctggcttt gtcatgtgca g 3861

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

<220>
<221> exón
<222> (1)..(98)

<400> 9
tgg ctg gat caa ttg ttt tac acg att att ggg aag ctg gta cta ttg 48
Trp Leu Asp Gln Leu Phe Tyr Thr Ile Ile Gly Lys Leu Val Leu Leu
1 5 10 15

tct tct tat tcg cca ttg cag aat ggc tag agt caa ggg caa gtc aca 96
Ser Ser Tyr Ser Pro Leu Gln Asn Gly Ser Gln Gly Gln Val Thr
20 25 30

ag 98

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

<220>
<221> Intrón
<222> (1)..(4063)

<400> 10
gtttgtgaat tttcgtcccc gtttaatttc cttgcacaag aaatggctag tgtacatcta 60

ctttcctagg atgacagtaa tgtgtgtttt ttttatttat tgtgatacca aaagtatgaa 120

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

gatgaataat cccatgagag ttcataaact tctgaaatgg ggaagacaaa tactctaggg 2280
cattatcact acgaaatgtg cggatagaaa ccccaaattg attttgaatt tcagcgtgga 2340
aggtctgaaa aatagaaaat agctcagacc gatttttcat caaaaatatc caagtgcacc 2400
tggaatcatc atcaatgaaa ctgacaaagt agcggaatcc caaggtagaa ctgacccgac 2460
taggacccca aacatctgaa tggaccaaag taaaaggtga cgctgaggga aatgggagtg 2520
ggtatactta ccgagctgtc atgactcata ctctagagtg gacaagtgag ataaaccagg 2580
tatcattttc taaagttttg acaaactggg atgtcccaac cgtttatgta ataaatctgg 2640
tgaatcggta acaagacaag ttattaaagg aagacaagat gcgagtccat atgattttgc 2700
aaggataagg taataaaatc catctaattc atgtctgata ccaatgatcc gccccgtact 2760
atgtttctct ataaaaataa ggtcatcaag aaataaaaca gcgcatttaa gtgatttggc 2820
taagcgacta acggctatga gattaaaagg actattggga acataaagga ctgaatctaa 2880
aggtgaggaa ggaagtgggc ctgcttgacc tattgcagtt gccatggttt gagactcatt 2940
ggccattgtg actgttagaa gagattgaga atatgaatac tggtgaaaag agatttgtta 3000
ccagaaatat gatcagatgc atttgaatca atgacccaag actcaaaggt ttaagattcg 3060
gagacacaag tcacgctact atctgtttga acaatggaag ctatcctgta agatgtctgt 3120
ttacatgctt tgtactgaag gaactcagta taatccgata aagaaaccat ctggattgga 3180
ttcaacgaat tggatccaac agattgtgag ttaaaggctt ctgatacgaa tgtcattata 3240
atgttgtgcc gaaaaaacaa aaaattcctg gaaattacta ttcacgccgg aaaaatataa 3300
aagtgatctg aatttgattt aaattggatg ggtatgctcg tatttgcaag gagaagacac 3360
tgccctgaag gaattttacc aaattctggc cggaaattgc ctcatgtgcg gcgtgtgggc 3420
gtcagaactt cgtcggaaaa attcttccgg cggcgcgtga gggcgcgtgt agccttttct 3480
gccagagatt ttttaatagg ttggtcgctg agctctgaac tacttcccgg tggtgttacc 3540
ttttgcacaa cactgacaga tagtatgatt cttgcggaca gacctatttt tgccggaaaa 3600
gagcttccgg ttgactgttt tctttttccg gagtcgctgg aatttatgca ctacgataaa 3660
tttctcacgg ttgctctgat accatgtgag aatgcacggg agaaaattat tatattgatt 3720
aaagtattgt acaaccctat ttatatacag taattacata ataataggta tctacttccc 3780
gatgtgggac actaaacatg actaactact taacaaatat ggtattggaa tttagtctct 3840
ttgacataaa cgacataagc ctatgcttat cttttcttac ttttttagca atgctaaata 3900
gtaggtccta actacaaact ttatagcaca ctgaaaatta ccaaaatata gagatggcca 3960
atgaaggttt tgtctgctaa cataactctg tgtctttatt ttctcactga tattgtatat 4020
ggataaagca ttctgataaa tgaaaacctt tatggttatg tag 4063

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

<220>
<221>
<222> (1)..(256)

<400> 11
gct acc gcc gct atg tca tca ctg gtc aat ata gtc cct cca aca gca 48
Ala Thr Ala Ala Met Ser Ser Leu Val Asn Ile Val Pro Pro Thr Ala
1 5 10 15

gtt tta gcg gaa agc gga gaa gtc gta aat gtt gat gaa gtc aag gtg 96
Val Leu Ala Glu Ser Gly Glu Val Val Asn Val Asp Glu Val Lys Val
20 25 30

aat agc att ctt gct gtg aaa gct ggt gaa act ata cct att gat gga 144
Asn Ser Ile Leu Ala Val Lys Ala Gly Glu Thr Ile Pro Ile Asp Gly
35 40 45

gtt gta gtg gaa ggg gaa tgt gac gtg gac gag aaa aca ctg aca ggc 192
Val Val Val Glu Gly Glu Cys Asp Val Asp Glu Lys Thr Leu Thr Gly
50 55 60

gag tcg ttt cca gtt tct aag caa aga gat tca acg gtc tgg gct ggc 240
Glu Ser Phe Pro Val Ser Lys Gln Arg Asp Ser Thr Val Trp Ala Gly
65 70 75 80

gct aca aat cta aat g 256
Ala Thr Asn Leu Asn
85

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

<220>
<221> Intrón
<222> (1)..(85)

<400> 12
gtagtatagt atttcttcat gcttcattta tttagtgctg aaacttcaag tattgtttgt 60

taatgttatt tgctcaattc ttcag 85

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

<220>
<221> exón
<222> (1)..(142)

<400> 13
gct ata tca gtg tta aga cta cgg ctt tgg ctg aag att gtg cgg tgg 48
Ala Ile Ser Val Leu Arg Leu Arg Leu Trp Leu Lys Ile Val Arg Trp
1 5 10 15

cta gga tgg cac agc ctg tcg aag atg ctc aga aca aga aat caa aaa 96
Leu Gly Trp His Ser Leu Ser Lys Met Leu Arg Thr Arg Asn Gln Lys
20 25 30

ccc aaa gat aca tcg aca agt gtg cta aat att ata cac cag gct a 142
Pro Lys Asp Thr Ser Thr Ser Val Leu Asn Ile Ile His Gln Ala
35 40 45

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

<220>
<221> Intrón
<222> (1)..(309)

<400> 14
gtgaatctta tgttgtgcca catcaagtca aaaaatgcac gtaccgtgtg aacttgttct 60

ttgtcttatg aatcacgtca ctatcctctc ccttttcgat atgagatttc cctaaggtgt 120

catatgaatc ccttcttcgg aagcttgcca gcataggagt ctatcagtcc tttcacttga 180

cccgccctct cagcctgcct gcagtcatgg gcgtcgcact actatattgc tctttcgttt 240

aaaacttttt atttctaata cttccctgct ctttgtgtat gtctaatttc gactggtgat 300

gttttgcag 309

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

<220>
<221> exón
<222> (1)..(328)

<400> 15
caa ttg tgg cta tac cag ctt ctt tgg caa ttg ttc cta ctg cat taa 48
Gln Leu Trp Leu Tyr Gln Leu Leu Trp Gln Leu Phe Leu Leu His
1 5 10 15

gag ttc aca atc gaa atg aat ggt atc gct tgg ctt tgg tca cat tgg 96
Glu Phe Thr Ile Glu Met Asn Gly Ile Ala Trp Leu Trp Ser His Trp
20 25 30

tga gtg cat gtc cgt gtg cac tcg ttc tat cta cac cag ttg cca tgt 144
Val His Val Arg Val His Ser Phe Tyr Leu His Gln Leu Pro Cys
35 40 45

gtt gcg cac ttt caa aag cag caa cgt ccg gtc ttc tgt tta aag gag 192
Val Ala His Phe Gln Lys Gln Gln Arg Pro Val Phe Cys Leu Lys Glu
50 55 60

cag agt acc ttg aga ctc tag cta aaa tca aaa tca tgg ctt ttg aca 240
Gln Ser Thr Leu Arg Leu Leu Lys Ser Lys Ser Trp Leu Leu Thr
65 70 75

aaa cag gga cta taa cta aag gag aat tta tgg tga ccg agt tca agt 288
Lys Gln Gly Leu Leu Lys Glu Asn Leu Trp Pro Ser Ser Ser
80 85 90

ctc tga ttg atg gtt tta gtc tca ata cac tgc ttt act g 328
Leu Leu Met Val Leu Val Ser Ile His Cys Phe Thr
95 100

<210> 16
<211> 463
<212> ADN

<213> Nicotiana tabacum

<220>
<221> Intrón
<222> (1)..(463)

<400> 16
gtaaaggtta ccactcatac atattctttt atgttgccaa agagaattca aaatcttaac 60

tggttatctt tcacggcaca ttgatagcga tataacatga ttgatttata tcatatattc 120

ataaaagatg aaatagggag tgccacattc acattctcat attgaagttt ctgaaatggc 180

tctaatggtt caccatagag ccaaaataac atatagacac aacgtcagcc gtctgatatt 240

caggaactta gatggaatag ttggatctta tacattgagg acacataaaa gtacttggtc 300

atataaattt tagaaatata atcaatgtat tataatctaa aattcttcaa atattcttga 360

tactgcaata caaaagcaca tggcacactg aatagaagcc ttgttcggtg gtctaaaaca 420

ttcgtttaga gtaaatactg agttgtctag tgaatatttt cag 463

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

<220>
<221> exón
<222> (1)..(203)

<400> 17
ggt ttc aag cat tga gag caa gtc agg tca tcc gat ggc aac cgc tct 48
Gly Phe Lys His Glu Gln Val Arg Ser Ser Asp Gly Asn Arg Ser
1 5 10 15

ggt gga cta tgc aca atc aaa ttc cgt tga gcc aaa gcc tga tag agt 96
Gly Gly Leu Cys Thr Ile Lys Phe Arg Ala Lys Ala Ser
20 25

tga gcg gtt tca aaa ttt tcc tgg tga agg gat att tgg aag aat tga 144
Ala Val Ser Lys Phe Ser Trp Arg Asp Ile Trp Lys Asn
30 35 40

tgg aat gga aat cta tgt cgg gaa tag gaa aat ttc ttc aag agc tgg 192
Trp Asn Gly Asn Leu Cys Arg Glu Glu Asn Phe Phe Lys Ser Trp
45 50 55

atg tac cac ag 203
Met Tyr His

<210> 18
<211> 145
<212> ADN
<213> Nicotiana tabacum

<220>
<221> Intrón
<222> (1)..(145)

<400> 18
gtaaatggtt gaatcatttc ttatgctcat agtagagata aaacatcaga gttataatta 60

taagtatatg atttctccag ttaattttgc tgttagattt tctttgacct gtttagcact 120

aatgcggtgg atgtttgaat ttcag 145

<210> 19
<211> 203
<212> ADN
<213> Nicotiana tabacum

<220>
<221> exón
<222> (1)..(203)

<400> 19

```
tac cag aaa tag agg gtg ata gtt tca aag gaa agt ctg ttg gat aca      48
Tyr Gln Lys     Arg Val Ile Val Ser Lys Glu Ser Leu Leu Asp Thr
1               5                   10                  15

tat ttt tgg gat cat ctc cag ctg gaa ttt tca gtc ttt ccg atg ttt      96
Tyr Phe Trp Asp His Leu Gln Leu Glu Phe Ser Val Phe Pro Met Phe
            20                  25                  30

gtc gaa ttg gtg taa aag aag caa tga gag aac tga agc aga tgg gta     144
Val Glu Leu Val     Lys Lys Gln     Glu Asn     Ser Arg Trp Val
        35                          40

tca aaa ccg cga tgc tta ctg gtg atc gtt atg cag ctg cca acc atg     192
Ser Lys Pro Arg Cys Leu Leu Val Ile Val Met Gln Leu Pro Thr Met
45                  50                  55                  60

tgc agg atc ag                                                     203
Cys Arg Ile
```

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

<220>
<221> Intrón
<222> (1)..(619)

<400> 20

gtatattaat aattctgcat tacgctgaaa tgattataaa acccttttgga ttattgttta 60

gtcttaagaa ttttcactga actcttattg tttccttctt ctatcatcaa cattggttaa 120

acatttcatc taaatttaga gaacgtatca ccaagtaagt gctttacctt tacagggtca 180

tataaaatac ttaagacagt gtgatgtgaa gatgaaggtt aaatgttgat ctggataaac 240

caagttatta tcacaactaa tataagatat gctattgttc tccaataatt ggacgatttt 300

cggacgtacg acgtacaatt cttcacatat gaaacctaca tcagacgtac atgacacgct 360

atgtttagca taaagagtca agattagcat gatgatttaa gctgaatctg aatttcaagt 420

atctattctt gtattgtacc caggggcgga actagtgttg tgcttagagg tctcaaacat 480

tgtatttgtg ttaaaaaatt cacttcatat gtatttaaat aatttatcca gagcagtgag 540

ccatattttt tagaatccag aacccataaa ctcaaaatca tagatccacc tctgattgta 600

agtcggaaca attatgcag 619

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

<220>
<221> exón
<222> (1)..(1498)

<400> 21

```
tta ggt gga gct ttg gat gaa ttt caa gca gaa ctc cta cca gag gac          48
Leu Gly Gly Ala Leu Asp Glu Phe Gln Ala Glu Leu Leu Pro Glu Asp
1               5                  10                  15

aag gca aca atc atc aag ggt ttt cag aag gaa gct cca aca gcg atg          96
Lys Ala Thr Ile Ile Lys Gly Phe Gln Lys Glu Ala Pro Thr Ala Met
            20                  25                  30

ata ggc gac ggc ctt aat gat gct cct gca tta gca aca gct gac att         144
Ile Gly Asp Gly Leu Asn Asp Ala Pro Ala Leu Ala Thr Ala Asp Ile
        35                  40                  45

ggc atc tca atg ggc atc tct ggg tca gct ctc gct aaa gaa aca ggc         192
Gly Ile Ser Met Gly Ile Ser Gly Ser Ala Leu Ala Lys Glu Thr Gly
    50                  55                  60

cat gct ata cta atg aca aat gac atc gga aga ata ccg aaa gct gca         240
His Ala Ile Leu Met Thr Asn Asp Ile Gly Arg Ile Pro Lys Ala Ala
65                  70                  75                  80

cgt ctt gct aga aga gtt cga agg aag att gtt gag aat atg att ata         288
Arg Leu Ala Arg Arg Val Arg Arg Lys Ile Val Glu Asn Met Ile Ile
                85                  90                  95

tca gcc gtt aca aag gct gcc ata gtt gca ttg gca ata gca ggt tat         336
Ser Ala Val Thr Lys Ala Ala Ile Val Ala Leu Ala Ile Ala Gly Tyr
            100                 105                 110

cca ttg gtt tgg gct gct gtc ctc gca gat act ggg aca tgc ttg cta         384
Pro Leu Val Trp Ala Ala Val Leu Ala Asp Thr Gly Thr Cys Leu Leu
        115                 120                 125

gtg att ttg aac agc atg cta ctt cta cga gga ggc aca cgc aga cat         432
Val Ile Leu Asn Ser Met Leu Leu Leu Arg Gly Gly Thr Arg Arg His
    130                 135                 140

ggg aaa aaa tgt tgg aga tct tct act cct tcg cat gct ccc cac cac         480
Gly Lys Lys Cys Trp Arg Ser Ser Thr Pro Ser His Ala Pro His His
145                 150                 155                 160

aaa gac aaa gct tca tgt tgc aag tcg gaa aat gct ccc cag ctg tgt         528
Lys Asp Lys Ala Ser Cys Cys Lys Ser Glu Asn Ala Pro Gln Leu Cys
                165                 170                 175

tgc tct gat att gag tca caa aag aaa tgt aca agt caa tca tgc tcg         576
Cys Ser Asp Ile Glu Ser Gln Lys Lys Cys Thr Ser Gln Ser Cys Ser
            180                 185                 190

tcc gag gtg tgt gtt cca aga tgt caa cct gtc tcc tcg gga tca aag         624
Ser Glu Val Cys Val Pro Arg Cys Gln Pro Val Ser Ser Gly Ser Lys
        195                 200                 205

tca tgt gga aat aat cag tgc cca gac tcc att gaa aat agt ggt ttt         672
Ser Cys Gly Asn Asn Gln Cys Pro Asp Ser Ile Glu Asn Ser Gly Phe
    210                 215                 220
```

```
cat tct cat cgc cgt cct caa tgc tgc tcg tcg aag atg gct gct aaa          720
His Ser His Arg Arg Pro Gln Cys Cys Ser Ser Lys Met Ala Ala Lys
225                 230                 235                 240

gca tgc caa tct gca gtt tca gaa tca aag tca tgc gga aat aat cag          768
Ala Cys Gln Ser Ala Val Ser Glu Ser Lys Ser Cys Gly Asn Asn Gln
                245                 250                 255

tgc cca gac tcc gtt gaa aat agt ggt ttt cat tct cat ccc cgt cct          816
Cys Pro Asp Ser Val Glu Asn Ser Gly Phe His Ser His Pro Arg Pro
            260                 265                 270

gaa tgc tgc tcg tcg aag atg gct gct aaa gcg tgc caa tct gca gtt          864
Glu Cys Cys Ser Ser Lys Met Ala Ala Lys Ala Cys Gln Ser Ala Val
        275                 280                 285

tca gaa tca aag tca tgt gga aat aat cag tgc cca gac tcc gtt gga          912
Ser Glu Ser Lys Ser Cys Gly Asn Asn Gln Cys Pro Asp Ser Val Gly
    290                 295                 300

aat agt ggt ttt cat tct cat ccc cgt cct caa tgc tgt tca tcg aag          960
Asn Ser Gly Phe His Ser His Pro Arg Pro Gln Cys Cys Ser Ser Lys
305                 310                 315                 320

atg gct gct aaa gca ggc caa tct gca ctt tca gaa tca aag tca tgt         1008
Met Ala Ala Lys Ala Gly Gln Ser Ala Leu Ser Glu Ser Lys Ser Cys
                325                 330                 335

gga aat aac aat tgc tca gac tcc att cac aag agt aat tgt cat tct         1056
Gly Asn Asn Asn Cys Ser Asp Ser Ile His Lys Ser Asn Cys His Ser
            340                 345                 350

tta act aac tct cta gta tgt tct tcc aag atg tct gct cca caa tgt         1104
Leu Thr Asn Ser Leu Val Cys Ser Ser Lys Met Ser Ala Pro Gln Cys
        355                 360                 365

cat tct gct act tca agc aac aaa tca tgt gga agt acc aag tgc tcc         1152
His Ser Ala Thr Ser Ser Asn Lys Ser Cys Gly Ser Thr Lys Cys Ser
    370                 375                 380

gac ttc agt gat aaa aaa tgt tgt caa tcc gac aaa att cct caa gcg         1200
Asp Phe Ser Asp Lys Lys Cys Cys Gln Ser Asp Lys Ile Pro Gln Ala
385                 390                 395                 400

tgc tct acc aag aag tct gct cca ggg tgt caa tct gca gtt tct ggg         1248
Cys Ser Thr Lys Lys Ser Ala Pro Gly Cys Gln Ser Ala Val Ser Gly
                405                 410                 415

tct aaa tca tgt gga aat agc aag tgt tca gac tca aaa gac aat agt         1296
Ser Lys Ser Cys Gly Asn Ser Lys Cys Ser Asp Ser Lys Asp Asn Ser
            420                 425                 430

agc cat cct tca cat ccc gat cat caa aca tgc atg tct aag ttg tgt         1344
Ser His Pro Ser His Pro Asp His Gln Thr Cys Met Ser Lys Leu Cys
        435                 440                 445

gct cca caa agc caa tct gca act tca agc tcc agg aca tgt gga aat         1392
Ala Pro Gln Ser Gln Ser Ala Thr Ser Ser Ser Arg Thr Cys Gly Asn
    450                 455                 460

aca aag tgc tcg gac acc aat agc aag aat tct tgt tat tca caa acc         1440
Thr Lys Cys Ser Asp Thr Asn Ser Lys Asn Ser Cys Tyr Ser Gln Thr
465                 470                 475                 480

aac tct gaa tca tgc tct tca aag atg tct ggt cca tca tgc aaa act         1488
Asn Ser Glu Ser Cys Ser Ser Lys Met Ser Gly Pro Ser Cys Lys Thr
                485                 490                 495
```

gct aat tca g 1498
Ala Asn Ser

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

<220>
<221> Intrón
<222> (1)..(321)

<400> 22
gtacgaccag attcctcttc ttgttaatac cccccgaacc aaactatagg atctaaagta 60

ttatttggcc ctctgtcgga ggatataatg gttagttaaa cctgaaatca tgtagtctat 120

gaattgcaaa tctctagcat cgtgacaaaa ttcttagatc atatacaact ttgagaatat 180

aggctgtcac agacccttct tcatactgca ttagaggaga gcagccaatt ttttattcat 240

gatttgaaac aaataaagtt cttcttgagg tgtatggaga ggctatgaga atcatttgct 300

gagtaggttt gagattttca g 321

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

<220>
<221> exón
<222> (1)..(333)

<400> 23
gtt caa ggt cat gca gaa ata aga agt gcc agg act ctg caa ccg aga 48
Val Gln Gly His Ala Glu Ile Arg Ser Ala Arg Thr Leu Gln Pro Arg
1 5 10 15

aca gtt ttc att cac cac tta cta atc cac tca gtg ggg aaa agc ttt 96
Thr Val Phe Ile His His Leu Leu Ile His Ser Val Gly Lys Ser Phe
20 25 30

cgg agc aga aaa gct tgg att tag tcc gaa aag ata agg aat caa gtc 144
Arg Ser Arg Lys Ala Trp Ile Ser Glu Lys Ile Arg Asn Gln Val
35 40 45

atg atc ttc gtc atg gct gct ctg acg agg aac atg atc ata caa att 192
Met Ile Phe Val Met Ala Ala Leu Thr Arg Asn Met Ile Ile Gln Ile
50 55 60

tag aca agg cat atg aca gtt gtg cct tac aag aat gtt gtt att cgg 240
Thr Arg His Met Thr Val Val Pro Tyr Lys Asn Val Val Ile Arg
65 70 75

ttc aag gca ata aaa ctg atg tat cag aaa ctg gaa tcc agg aaa ctg 288
Phe Lys Ala Ile Lys Leu Met Tyr Gln Lys Leu Glu Ser Arg Lys Leu
80 85 90

ctc att gtg aca gca cca atc aaa cat gcc aaa ctg caa gtt cag 333
Leu Ile Val Thr Ala Pro Ile Lys His Ala Lys Leu Gln Val Gln
95 100 105

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

<220>
<221> Intrón
<222> (1)..(220)

<400> 24
gtaggcacta ccaaatcata tgatccaaag tgctcctcca ccttcactcc tacaataaat 60

gttcgatcaa acttcataag aagatagcat atgcatcgca aatctctaaa aaaatgatgg 120

ataatgttac tcaccaacta gtttgagata gaagtttaac tgattgctat atatcgttaa 180

ctataaaaaa ctacttgtta attagagctg agattttcag 220

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

<220>
<221> exón
<222> (1)..(774)

<400> 25
gat cga tga cat gcg gaa atg ata aga tcc tgg act ctc taa gca tcc 48
Asp Arg His Ala Glu Met Ile Arg Ser Trp Thr Leu Ala Ser
1 5 10

atg gtt gtc att cgc atg ata atc cac tcc acg agg aga aca acc tgg 96
Met Val Val Ile Arg Met Ile Ile His Ser Thr Arg Arg Thr Thr Trp
15 20 25 30

agc aga aaa tct tgg atg ttg ttg gag aag gta taa aat cac ctc atg 144
Ser Arg Lys Ser Trp Met Leu Leu Glu Lys Val Asn His Leu Met
35 40 45

ctg tcg gtc atg gct gtt cgg aca agg aac acg atc act cac atc cag 192
Leu Ser Val Met Ala Val Arg Thr Arg Asn Thr Ile Thr His Ile Gln
50 55 60

aaa agg cat atg aca gtt gtg caa cag atg att gtt gtt ttt cag ttc 240
Lys Arg His Met Thr Val Val Gln Gln Met Ile Val Val Phe Gln Phe
65 70 75

aag tcc atg gca ttg acg acg tat caa aaa gtg aaa ttc aag aaa ctg 288
Lys Ser Met Ala Leu Thr Thr Tyr Gln Lys Val Lys Phe Lys Lys Leu
80 85 90

ctc att gtg aca gca caa agc aga gca tgg tca tct cca gca gct gca 336
Leu Ile Val Thr Ala Gln Ser Arg Ala Trp Ser Ser Pro Ala Ala Ala
95 100 105

aac atg aac caa aag atc agg taa atc act gtg gac ttc act cta aaa 384
Asn Met Asn Gln Lys Ile Arg Ile Thr Val Asp Phe Thr Leu Lys
110 115 120

cta ctc caa ctg atg aag aac tag cca agc tgg tta gaa gat gct gcg 432
Leu Leu Gln Leu Met Lys Asn Pro Ser Trp Leu Glu Asp Ala Ala
125 130 135

aat aca aac cat gcc acg acg tcc gtt ctg gct gca gga agc atg ctg 480
Asn Thr Asn His Ala Thr Thr Ser Val Leu Ala Ala Gly Ser Met Leu

```
140                 145                 150                 155

cag aat gtg gtc caa ccg ttc gat caa cta tca ata tct tac ggg aca      528
Gln Asn Val Val Gln Pro Phe Asp Gln Leu Ser Ile Ser Tyr Gly Thr
                160                 165                 170

acc atc atc att acc tag act gca gtg gtc gta agg ttt gtt cgc tgt      576
Thr Ile Ile Ile Thr     Thr Ala Val Val Val Arg Phe Val Arg Cys
            175                 180                 185

tgg aga aga gac aca tcg gtg gat gct gtg aca gct tca gaa aag aat      624
Trp Arg Arg Asp Thr Ser Val Asp Ala Val Thr Ala Ser Glu Lys Asn
        190                 195                 200

gtt gtg cca aga aga acc acc ttg gag caa gtt tcg gag gag gtt tat      672
Val Val Pro Arg Arg Thr Thr Leu Glu Gln Val Ser Glu Glu Val Tyr
    205                 210                 215

cag aaa ttg tca tag agt aga tgc aat ccg aag tgt aca tat gtt gta      720
Gln Lys Leu Ser     Ser Arg Cys Asn Pro Lys Cys Thr Tyr Val Val
220                 225                 230

aac ttc cta cct att tta tct tca aga agt tga gct gct aat ttg aac      768
Asn Phe Leu Pro Ile Leu Ser Ser Arg Ser     Ala Ala Asn Leu Asn
235                 240                 245

aaa gca                                                             774
Lys Ala
    250
```

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

<220>
<221> Intrón
<222> (1)..(498)

<400> 26

```
aggcgaatt ctgcagatat ccatcacact ggcggccgct cgagcatgca tctagagggc      60

ccaattcgcc ctatagtgag tcgtattaca attcactggc cgtcgtttta caacgtcgtg     120

actgggaaaa ccctggcgtt acccaactta atcgccttgc agcacatccc cctttcgcca     180

gctggcgtaa tagcgaagag gcccgcaccg atcgcccttc ccaacagttg cgcagcctat     240

acgtacggca gtttaaggtt tacacctata aaagagagag ccgttatcgt ctgtttgtgg     300

atgtacagag tgatattatt gacacgccgg ggcgacggat ggtgatcccc ctggccagtg     360

cacgtctgct gtcagataaa gtctcccgtg aactttaccc ggtggtgcat atcggggatg     420

aaagctggcg catgatgacc accgatatgg ccagtgtgcc ggtctccgtt atcggggaag     480

aagtggctga tctcagcc                                                  498
```

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

<220>
<223> Secuencia Complementaria Inversa de Exón 1

<400> 27
caatttgttg cggagaaatg agaagagaat catgaataac aatgacagtc tttgttgtga 60

caattactga aacctctttа acccccttcaa gattcttgag aatttttтca actagaacaa 120

cttctgaagt acagcaaatt cccaaaacat caaaatagct cttgctcaac ttctttgttt 180

cattcatttt ttcactttcc accatttttc tccttctcta aggaggagga gaagataata 240

gatgaaaaag gaatttctag ttctggaata tattggatat acttttgttt tggaaagagg 300

tga 303

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

<220>
<223> Secuencia Complementaria Inversa de Exón 2

<400> 28
ctgctattaa aacaagaatg tcgatgtcaa gagtgaggtt tcgcacggca gccacacctc 60

taaaaataat tggaggaatc ccaactgcaa cagctgcaag tgctaaccat tggaaaggtg 120

caaaaaagta cttcaaagat gagagtccaa gcaatatttc actgccaatt gcaaatggac 180

ttggccattt cttttggtag ttttttctctc ctttcactct tatgcttgct tctaatcttg 240

cttgattcaa tgctttaa 258

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

<220>
<223> Secuencia Complementaria Inversa de Exón 3

<400> 29
cttgtgactt gcccttgact ctagccattc tgcaatggcg aataagaaga caatagtacc 60

agcttcccaa taatcgtgta aaacaattga tccagcca 98

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

<220>
<223> Secuencia Complementaria Inversa de Exón 4

<400> 30
catttagatt tgtagcgcca gcccagaccg ttgaatctct ttgcttagaa actggaaacg 60

actcgcctgt cagtgttttc tcgtccacgt cacattcccc ttccactaca actccatcaa 120

taggtatagt ttcaccagct ttcacagcaa gaatgctatt caccttgact tcatcaacat 180

ttacgacttc tccgctttcc gctaaaactg ctgttggagg gactatattg accagtgatg 240

acatagcggc ggtagc 256

<210> 31

<211> 142
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia Complementaria Inversa de Exón 5

<400> 31
tagcctggtg tataatattt agcacacttg tcgatgtatc tttgggtttt tgatttcttg 60

ttctgagcat cttcgacagg ctgtgccatc ctagccaccg cacaatcttc agccaaagcc 120

gtagtcttaa cactgatata gc 142

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

<220>
<223> Secuencia Complementaria Inversa de Exón 6

<400> 32
cagtaaagca gtgtattgag actaaaacca tcaatcagag acttgaactc ggtcaccata 60

aattctcctt tagttatagt ccctgttttg tcaaaagcca tgattttgat tttagctaga 120

gtctcaaggt actctgctcc tttaaacaga agaccggacg ttgctgcttt tgaaagtgcg 180

caacacatgg caactggtgt agatagaacg agtgcacacg gacatgcact caccaatgtg 240

accaaagcca agcgatacca ttcatttcga ttgtgaactc ttaatgcagt aggaacaatt 300

gccaaagaag ctggtatagc cacaattg 328

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

<220>
<223> Secuencia Complementaria Inversa de Exón 7

<400> 33
ctgtggtaca tccagctctt gaagaaattt tcctattccc gacatagatt tccattccat 60

caattcttcc aaatatccct tcaccaggaa aattttgaaa ccgctcaact ctatcaggct 120

ttggctcaac ggaatttgat tgtgcatagt ccaccagagc ggttgccatc ggatgacctg 180

acttgctctc aatgcttgaa acc 203

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

<220>
<223> Secuencia Complementaria Inversa de Exón 8

<400> 34
ctgatcctgc acatggttgg cagctgcata acgatcacca gtaagcatcg cggttttgat 60

acccatctgc ttcagttctc tcattgcttc ttttacacca attcgacaaa catcggaaag 120

actgaaaatt ccagctggag atgatcccaa aaatatgtat ccaacagact ttcctttgaa 180

actatcaccc tctatttctg gta 203

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

<220>
<223> Secuencia Complementaria Inversa de Exón 9

<400> 35
ctgaattagc agttttgcat gatggaccag acatctttga agagcatgat tcagagttgg 60
tttgtgaata acaagaattc ttgctattgg tgtccgagca ctttgtattt ccacatgtcc 120
tggagcttga agttgcagat tggctttgtg gagcacacaa cttagacatg catgtttgat 180
gatcgggatg tgaaggatgg ctactattgt cttttgagtc tgaacacttg ctatttccac 240
atgatttaga cccagaaact gcagattgac accctggagc agacttcttg gtagagcacg 300
cttgaggaat tttgtcggat tgacaacatt ttttatcact gaagtcggag cacttggtac 360
ttccacatga tttgttgctt gaagtagcag aatgacattg tggagcagac atcttggaag 420
aacatactag agagttagtt aaagaatgac aattactctt gtgaatggag tctgagcaat 480
tgttatttcc acatgacttt gattctgaaa gtgcagattg gcctgcttta gcagccatct 540
tcgatgaaca gcattgagga cggggatgag aatgaaaacc actatttcca acggagtctg 600
ggcactgatt atttccacat gactttgatt ctgaaactgc agattggcac gctttagcag 660
ccatcttcga cgagcagcat tcaggacggg gatgagaatg aaaaccacta ttttcaacgg 720
agtctgggca ctgattattt ccgcatgact ttgattctga aactgcagat tggcatgctt 780
tagcagccat cttcgacgag cagcattgag gacggcgatg agaatgaaaa ccactatttt 840
caatggagtc tgggcactga ttatttccac atgactttga tcccgaggag acaggttgac 900
atcttggaac acacacctcg gacgagcatg attgacttgt acatttcttt tgtgactcaa 960
tatcagagca acacagctgg ggagcatttt ccgacttgca acatgaagct ttgtctttgt 1020
ggtggggagc atgcgaagga gtagaagatc tccaacattt tttcccatgt ctgcgtgtgc 1080
ctcctcgtag aagtagcatg ctgttcaaaa tcactagcaa gcatgtccca gtatctgcga 1140
ggacagcagc ccaaaccaat ggataacctg ctattgccaa tgcaactatg gcagcctttg 1200
taacggctga tataatcata ttctcaacaa tcttccttcg aactcttcta gcaagacgtg 1260
cagctttcgg tattcttccg atgtcatttg tcattagtat agcatggcct gtttctttag 1320
cgagagctga cccagagatg cccattgaga tgccaatgtc agctgttgct aatgcaggag 1380
catcattaag gccgtcgcct atcatcgctg ttggagcttc cttctgaaaa cccttgatga 1440
ttgttgcctt gtcctctggt aggagttctg cttgaaattc atccaaagct ccacctaa 1498

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

<220>
<223> Secuencia Complementaria Inversa de Exón 10

<400> 36
ctgaacttgc agtttggcat gtttgattgg tgctgtcaca atgagcagtt tcctggattc 60

cagtttctga tacatcagtt ttattgcctt gaaccgaata acaacattct tgtaaggcac 120

aactgtcata tgccttgtct aaatttgtat gatcatgttc ctcgtcagag cagccatgac 180

gaagatcatg acttgattcc ttatcttttc ggactaaatc caagcttttc tgctccgaaa 240

gcttttcccc actgagtgga ttagtaagtg gtgaatgaaa actgttctcg gttgcagagt 300

cctggcactt cttatttctg catgaccttg aac 333

<210> 37
<211> 774
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia Complementaria Inversa de Exón 11

<400> 37
tgctttgttc aaattagcag ctcaacttct tgaagataaa ataggtagga agtttacaac 60

atatgtacac ttcggattgc atctactcta tgacaatttc tgataaacct cctccgaaac 120

ttgctccaag gtggttcttc ttggcacaac attctttttct gaagctgtca cagcatccac 180

cgatgtgtct cttctccaac agcgaacaaa ccttacgacc actgcagtct aggtaatgat 240

gatggttgtc ccgtaagata ttgatagttg atcgaacggt tggaccacat tctgcagcat 300

gcttcctgca gccagaacgg acgtcgtggc atggtttgta ttcgcagcat cttctaacca 360

gcttggctag ttcttcatca gttggagtag ttttagagtg aagtccacag tgatttacct 420

gatcttttgg ttcatgtttg cagctgctgg agatgaccat gctctgcttt gtgctgtcac 480

aatgagcagt ttcttgaatt tcacttttttg atacgtcgtc aatgccatgg acttgaactg 540

aaaaacaaca atcatctgtt gcacaactgt catatgcctt ttctggatgt gagtgatcgt 600

gttccttgtc cgaacagcca tgaccgacag catgaggtga ttttatacct tctccaacaa 660

catccaagat tttctgctcc aggttgttct cctcgtggag tggattatca tgcgaatgac 720

aaccatggat gcttagagag tccaggatct tatcatttcc gcatgtcatc gatc 774

<210> 38
<211> 260
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Construcción de Transgen de Secuencia Codificante

<400> 38
atttgtagtg ccagcccaga ccgttgaatc tatttgctta gaaactggaa acgactcgcc 60

tgtcagtgtt ttctcgtcca cgtcacattc cccttccatt acaactccat caataggtat 120

agtttcacca gctttaacag caagaatgct attcaacttg acttcatcaa catttacgac 180

ttctccactt tcagctaaaa ctgctgttgg agggactata ttgaccagtg atgacatagc 240

agcagtagcc tacataacca 260

<210> 39
<211> 96
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Construcción de Transgen de Secuencia Separadora

<400> 39
agcctgaaga attgagcaaa taacattaac aaacaatact tgaagtttca gcactaaata 60

aatgaagcat gaaggaatac tacactacca tttaga 96

<210> 40
<211> 260
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Construcción de Transgen de Secuencia Complementaria Inversa

<400> 40
tggttatgta ggctactgct gctatgtcat cactggtcaa tatagtcccc ccaacagcag 60

ttttagctga aagtggagaa gtcgtaaatg ttgatgaagt caagttgaat agcattcttg 120

ctgttaaagc tggtgaaact atacctattg atggagttgt aatggaaggg gaatgtgacg 180

tggacgagaa aacactgaca ggcgagtcgt ttccagtttc taagcaaata gattcaacgg 240

tctgggctgg cactacaaat 260

<210> 41
<211> 616
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia ARNi

<400> 41
atttgtagtg ccagcccaga ccgttgaatc tatttgctta gaaactggaa acgactcgcc 60

tgtcagtgtt ttctcgtcca cgtcacattc cccttccatt acaactccat caataggtat 120

agtttcacca gctttaacag caagaatgct attcaacttg acttcatcaa catttacgac 180

ttctccactt tcagctaaaa ctgctgttgg agggactata ttgaccagtg atgacatagc 240

agcagtagcc tacataacca agcctgaaga attgagcaaa taacattaac aaacaatact 300

tgaagtttca gcactaaata aatgaagcat gaaggaatac tacactacca tttagatggt 360

tatgtaggct actgctgcta tgtcatcact ggtcaatata gtccctccaa cagcagtttt 420

agctgaaagt ggagaagtcg taaatgttga tgaagtcaag ttgaatagca ttcttgctgt 480

taaagctggt gaaactatac ctattgatgg agttgtaatg gaaggggaat gtgacgtgga 540

cgagaaaaca ctgacaggcg agtcgtttcc agtttctaag caaatagatt caacggtctg 600

ggctggcact acaaat 616

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

<220>
<223> Construcción de Transgen de Secuencia Codificante

<400> 42
tgagagcaag tcaggtcatc cgatggcagc cgctctggtg gactatgcac aatcaaattc 60

cgttgagcca aagcctgata gagttgagca gtttcaaaat tttcctggtg aagggatatt 120

tggaagaatt gatggaatgg aaatctatgt cgggaatagg aaaatttctt caagagctgg 180

atgtaccaca gg 192

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

<220>
<223> Construcción de Transgen de Secuencia Separadora

<400> 43
taaatggttg aatcatttct tatgctcata gtagagataa aacatcagag ttataattat 60

aagtatatga tttctccagt taattttgct gttagatttt ctttgacctg tttagcacta 120

atgcggtgga tgtttgaa 138

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

<220>
<223> Construcción de Transgen de Secuencia Complementaria Inversa

<400> 44
cctgtggtac atccagctct tgaagaaatt ttcctattcc cgacatagat ttccattcca 60

tcaattcttc caaatatccc ttcaccagga aaattttgaa actgctcaac tctatcaggc 120

tttggctcaa cggaatttga ttgtgcatag tccaccagag cggctgccat cggatgacct 180

gacttgctct caatgc 196

<210> 45
<211> 526
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia ARNi

<400> 45
tgagagcaag tcaggtcatc cgatggcagc cgctctggtg gactatgcac aatcaaattc 60

cgttgagcca aagcctgata gagttgagca gtttcaaaat tttcctggtg aagggatatt 120

tggaagaatt gatggaatgg aaatctatgt cgggaatagg aaaatttctt caagagctgg 180

atgtaccaca ggtaaatggt tgaatcattt cttatgctca tagtagagat aaaacatcag 240

agttataatt ataagtatat gatttctcca gttaattttg ctgttagatt ttctttgacc 300

tgtttagcac taatgcggtg gatgtttgaa cctgtggtac atccagctct tgaagaaatt 360

ttcctattcc cgacatagat ttccattcca tcaattcttc caaatatccc ttcaccagga 420

aaattttgaa actgctcaac tctatcaggc tttggctcaa cggaatttga ttgtgcatag 480

tccaccagag cggctgccat cggatgacct gacttgctct caatgc 526

<210> 46
<211> 4392
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de Complemento Inversa

<400> 46
acgaaacaag tttaatcgtc gagttgaaga acttctattt tatccatctt tcaaatgttg 60

tatacatgtg aagcctaacg tagatgagat actgttaaag actatttgga ggaggttttg 120

aacgaggttc cacaaaaaag aaccgtgttg taagaaaaga cttcgacagt gtcgtaggtg 180

gctacacaga gaagaggttg tcgcttgttt ggaatgctgg tgacgtcaga tccattacta 240

ctaccaacag ggcattctat aactaccaac tagcttgcca acctggtgta agacgtcgta 300

cgaaggacgt cggtcttgcc tgcagcaccg taccaaacat aaacgtcgta gaagattggt 360

cgaaccgatc aagaagtagt caacctcatc aaaatctcac ttcaggtgtc actaaatgga 420

ctagaaaacc aagtacaaac gtcgacgacc tctactggta cgagacgaaa cacgacagtg 480

ttactcgtca aagaacttaa agtgaaaaac tatgcagcag ttacggtacc tgaacttgac 540

tttttgttgt tagtagacaa cgtgttgaca gtatacggaa aagacctaca ctcactagca 600

caaggaacag gcttgtcggt actggctgtc gtactccact aaaatatgga agaggttgtt 660

gtaggttcta aaagacgagg ttcaacaaga ggagcacctc acctaatagt acgcttactg 720

ttggtaccta cgaatctctc aggtcctaga atagtaaagg cgtacagtag ctaggacttg 780

aacgtcaaac cgtacaaact aaccacgaca gtgttactcg tcaaaggacc taaggtcaaa 840

gactatgtag tcaaaataac ggaacttggc ttattgttgt aagaacattc cgtgttgaca 900

gtatacggaa cagatttaaa catactagta cagggagcag tctcgtcggt actgcttcta 960

gtactgaact aaggaataga aaagcctgat ttaggttcga aaagacgagg ctttcgaaaa 1020

ggggtgactc acctaatcat tcaccactta cttttgacaa gagccaacgt ctcaggaccg 1080

tgaagaataa agacgtactg gaacttggac ttaatcgtca aaacgtacta cctggtctgt 1140

agaaacttct cgtactaagt ctcaaccaaa cacttattgt tcttaagaac gataaccaca 1200

ggctcgtgaa acataaaggt gtacaggacc tcgaacttca acgtctaacc gaaacacctc 1260

gtgtgttgaa tctgtacgta caaactacta gccctacact tcctaccgat gataacagaa 1320

aactcagact tgtgaacgat aaaggtgtac taaatctggg tctttgacgt ctaactgtag 1380

gacctcgtct gaagaaccat ctcgtgcaaa ctccttaaaa cagcctaact gttgtaaaaa 1440

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

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

<210> 47
<211> 4011
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de Codificante

<400> 47
acgacggcca gtgaattgta atacgactca ctatagggcg aattgggccc tctagatgca 60
tgctcgagcg gccgccagtg tgatggatat ctgcagaatt cgcccttgag gaaacataga 120
aagaagagaa tggtggaaag tgagaaaatg aatgacacaa agaatctgag caagagctat 180
tttgatgttt tgggaatttg ctgtacttca gaagttgttc ttgttgaaaa aattctcaag 240
aatcttgaag gggttaaaga ggtttcagta attgtcacaa caaagactgt cattgttatt 300
catgattctc tcctcatttc tcagcaacaa attgttaaag cattgaatca agcaagatta 360
gaagcaagta taagagtgaa aggagagaaa aactaccaaa agaaatggcc aagtccattt 420
gcaattggca gtggaatatt gcttggactc tcatttttga agtacttttt tgcacctttc 480
caatggttag cacttgcagc tgttgcagtt gggattcctc caattatttt taggggtgtg 540
gctgccgtgc gaaacctcac tcttgacatc aacattcttg ttttaatagc agtgacggga 600
tcaattgttt tacacgatta ttgggaagct gatactattg tcttcttatt caccattgca 660
gaatggctag agtcaagggc aagtcacaag gctactgctg ctatgtcatc actggtcaat 720
atagtccctc caacagcagt tttagctgaa agtggagaag tcgtaaatgt tgatgaagtc 780
aagttgaata gcattcttgc tgttaaagct ggtgaaacta tacctattga tggagttgta 840

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

tcaaggttat gcggaaataa gaagtgccta gactctgcaa acgagaacag ttttcattca 3000
cttactaatc cactctgtga ggaaaagctt ttggagaagg aaagcttgga tttagcccga 3060
aaagataggg aatcaaatca tgatcttagt catggttact ctgacgagga acatgatcat 3120
ctaaatttag acaaggcaca tgacagttgt gccttacaag aatgttgtta ttctgttcaa 3180
ggcaataaaa ctgatgtatc agaaactgga atccaggaag ctgctcattg tgacagcatc 3240
aatcaaacat gccaaactgc aatttcagga tcaatgacat gcggaaataa taagagtctg 3300
gactctctaa gcatccatgg ttgtcattca catgatagtc cactccacaa ggagagcaac 3360
ttggagcaga aaagcttgga tgttgctgga gaaggtataa aatcacctca tgctgtcggt 3420
caaggctgtt cggacaagga gcacaatcac tcgcatccag aaaaggcgta tgacagttgt 3480
gcaacagacg attgttgttt ttcagttcaa gtccatggca ttgacgacgt atcaagaagt 3540
gaaattcaag aaactgctca ttgtgacagc acaaaacaga gcacggtcat ccccagcagc 3600
tgcgaacatg aaccaaaaga tcaggtaaat cactgtggat ctcactctaa aagtattcca 3660
actgatgaag aactagccaa gctggttaga agatgctgca aatacaaacc atgccacgat 3720
gtccgctctg gctgcaggaa gcatgctgca gaatgtggtc caaccgttcg atcaaccatc 3780
aatatcttac gggacaacca tcatcatcat ctagactgca gtggtcgtaa ggtttgttcg 3840
ctgttggaga agagacacat tggtggatgc tgtgacagct tcagaaaaga atgttgtgcc 3900
aagaacaatc accttggagc aagttttgga ggaggtttat cagaaattgt caaagggcga 3960
attccagcac actggcggcc gttactagtg gatccgagct cggtaccaag c 4011

<210> 48
<211> 4011
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de Complemento Inversa

<400> 48
gcttggtacc gagctcggat ccactagtaa cggccgccag tgtgctggaa ttcgcccttt 60
gacaatttct gataaacctc ctccaaaact tgctccaagg tgattgttct tggcacaaca 120
ttcttttctg aagctgtcac agcatccacc aatgtgtctc ttctccaaca gcgaacaaac 180
cttacgacca ctgcagtcta gatgatgatg atggttgtcc cgtaagatat tgatggttga 240
tcgaacggtt ggaccacatt ctgcagcatg cttcctgcag ccagagcgga catcgtggca 300
tggtttgtat ttgcagcatc ttctaaccag cttggctagt tcttcatcag ttggaatact 360
tttagagtga gatccacagt gatttacctg atcttttggt tcatgttcgc agctgctggg 420
gatgaccgtg ctctgttttg tgctgtcaca atgagcagtt tcttgaattt cacttcttga 480
tacgtcgtca atgccatgga cttgaactga aaaacaacaa tcgtctgttg cacaactgtc 540
atacgccttt tctggatgcg agtgattgtg ctccttgtcc gaacagcctt gaccgacagc 600
atgaggtgat tttatacctt ctccagcaac atccaagctt ttctgctcca agttgctctc 660

cttgtggagt ggactatcat gtgaatgaca accatggatg cttagagagt ccagactctt 720
attatttccg catgtcattg atcctgaaat tgcagtttgg catgtttgat tgatgctgtc 780
acaatgagca gcttcctgga ttccagtttc tgatacatca gttttattgc cttgaacaga 840
ataacaacat tcttgtaagg cacaactgtc atgtgccttg tctaaattta gatgatcatg 900
ttcctcgtca gagtaaccat gactaagatc atgatttgat tccctatctt ttcgggctaa 960
atccaagctt tccttctcca aaagcttttc ctcacagagt ggattagtaa gtgaatgaaa 1020
actgttctcg tttgcagagt ctaggcactt cttatttccg cataaccttg aacctgaatt 1080
agcagttttg catgctggac cagacatctt tgaagagcat gattcagagt tggtatgtga 1140
ataacaagaa ttcttgctat tggtgtccga gcacttcata tttccacatg tcctggagct 1200
tgaagttgca gattggcttt gtggagcaca caacttagac gtgcatattt gatgatcggg 1260
atgtgaagga tggctactat tgtcttttcga gtctgaacac ttgctatctc cacatgattt 1320
agacccagaa actgcagatt gacatcctgg agcagacttc ttggtagagc acgtttgagg 1380
aattttgtca tattggcaac atttttttgtc actgaagttg gagcacttgg tacttccaca 1440
tgatttggag cttgaagtgg cagaatgaca ttgtggagca gacatcttgg aagaacatac 1500
tagaggacgg ggatgagaat gaaaaccact attttcaacg gagtctgggc actgattatt 1560
tccacatgac tttgatcccg aggagacagg ttggcatctt ggaacacaca cctcggacga 1620
gcatgattga ctcgtacatt tcttttgtga ctcaatatca gagcaacaca gctgcggagc 1680
attttccgac ttgcaacaag aagctttgtc tttgtggttg ggagcatgcg aaggagtagc 1740
agatctacaa catttttttcc catgtctgtg tgtgcctact cgtagaagta gcatgctgtt 1800
caagatcact agcaagcatg tcccagtatc cgcgaggaca gcagcccaaa ccaatggata 1860
acctgctatt gccaatgcaa ctatggcggc ctttgtaacg actgatataa tcatattctc 1920
aacaatcttc cttcgaactc ttctagcaag acgtgcagct tttggtattc ttccgatgtc 1980
atttgtcatt agtataacat ggcctgtttc tttcgcgaga gctgacccag agatgcccat 2040
tgagatgcca atgtcagctg ttgctaatgc aggagcatca ttaaggccgt cgcctatcat 2100
cgctgttgga gcttccttct gaaaaccctt gatgattgtt gccttgtcct ctggtaagag 2160
ttccgcttga aattcatcca tagctccacc taactgatcc tgcacatggt tggcagctgc 2220
ataacaatca ccagtaagca tcgcggtttt gatacccatc tgcttcagct ctctcattgc 2280
ttcttttaca ccaattcgac aaacatcgga aagaccgaaa attccagcgg gagatgatcc 2340
caaaaatatg tatccaacag actttccttg gaaactatca ccctctattt ctggtactgt 2400
agtacatcca gctcttgaag aaatttttct attcccgaca tagatttcca ttccatcaat 2460
tcttccaaat atcccttcac caggaaaatt ttgaaactgc tcaactctat caggctttgg 2520
ctcaacggaa tttgattgtg catagtcaac cagagcggct gccatcggat gacctgactt 2580
gctctcaata cttgaaaccc agtaaagcag tgtattgaga ccaagaccat caaccagaga 2640
cttgaactcg gtcaccataa attctcctct agttatagtc cctgttttgt caaaagccat 2700
gattttgatt ttagcaagag tctcaaggta ctctgctcct ttaaacagaa gaccggacgt 2760

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

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

<400> 49

Gly Glu Leu Gly Pro Leu Asp Ala Cys Ser Ser Gly Arg Gln Cys Asp
1 5 10 15

Gly Tyr Leu Gln Asn Ser Pro Leu Arg Lys His Arg Lys Lys Arg Met
20 25 30

Val Glu Ser Glu Lys Met Asn Asp Thr Lys Asn Leu Ser Lys Ser Tyr
35 40 45

Phe Asp Val Leu Gly Ile Cys Cys Thr Ser Glu Val Val Leu Val Glu
50 55 60

Lys Ile Leu Lys Asn Leu Glu Gly Val Lys Glu Val Ser Val Ile Val
65 70 75 80

Thr Thr Lys Thr Val Ile Val Ile His Asp Ser Leu Leu Ile Ser Gln
85 90 95

Gln Gln Ile Val Lys Ala Leu Asn Gln Ala Arg Leu Glu Ala Ser Ile
100 105 110

Arg Val Lys Gly Glu Lys Asn Tyr Gln Lys Lys Trp Pro Ser Pro Phe
115 120 125

Ala Ile Gly Ser Gly Ile Leu Leu Gly Leu Ser Phe Leu Lys Tyr Phe
130 135 140

Phe Ala Pro Phe Gln Trp Leu Ala Leu Ala Ala Val Ala Val Gly Ile
145 150 155 160

Pro Pro Ile Ile Phe Arg Gly Val Ala Ala Val Arg Asn Leu Thr Leu
165 170 175

Asp Ile Asn Ile Leu Val Leu Ile Ala Val Thr Gly Ser Ile Val Leu
180 185 190

His Asp Tyr Trp Glu Ala Asp Thr Ile Val Phe Leu Phe Thr Ile Ala
195 200 205

Glu Trp Leu Glu Ser Arg Ala Ser His Lys Ala Thr Ala Ala Met Ser
210 215 220

Ser Leu Val Asn Ile Val Pro Pro Thr Ala Val Leu Ala Glu Ser Gly
225 230 235 240

Glu Val Val Asn Val Asp Glu Val Lys Leu Asn Ser Ile Leu Ala Val
245 250 255

Lys Ala Gly Glu Thr Ile Pro Ile Asp Gly Val Val Met Glu Gly Glu
260 265 270

Cys Asp Val Asp Glu Lys Thr Leu Thr Gly Glu Ser Phe Pro Val Ser
275 280 285

Lys Gln Ile Asp Ser Thr Val Trp Ala Gly Thr Thr Asn Leu Asn Gly
290 295 300

Tyr Ile Ser Val Lys Thr Thr Ala Leu Ala Glu Asp Cys Ala Val Ala
305 310 315 320

Arg Met Ala Gln Leu Val Glu Asp Ala Gln Asn Lys Lys Ser Lys Thr
325 330 335

Gln Arg Tyr Ile Asp Lys Cys Ala Lys Tyr Tyr Thr Pro Ala Ile Val
340 345 350

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

900 905 910

Ser Lys Leu Cys Ala Pro Gln Ser Gln Ser Ala Thr Ser Ser Ser Arg
915 920 925

Thr Cys Gly Asn Met Lys Cys Ser Asp Thr Asn Ser Lys Asn Ser Cys
930 935 940

Tyr Ser His Thr Asn Ser Glu Ser Cys Ser Ser Lys Met Ser Gly Pro
945 950 955 960

Ala Cys Lys Thr Ala Asn Ser Gly Ser Arg Leu Cys Gly Asn Lys Lys
965 970 975

Cys Leu Asp Ser Ala Asn Glu Asn Ser Phe His Ser Leu Thr Asn Pro
980 985 990

Leu Cys Glu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Glu Ser Leu Asp Leu Ala Arg
995 1000 1005

Lys Asp Arg Glu Ser Asn His Asp Leu Ser His Gly Tyr Ser Asp
1010 1015 1020

Glu Glu His Asp His Leu Asn Leu Asp Lys Ala His Asp Ser Cys
1025 1030 1035

Ala Leu Gln Glu Cys Cys Tyr Ser Val Gln Gly Asn Lys Thr Asp
1040 1045 1050

Val Ser Glu Thr Gly Ile Gln Glu Ala Ala His Cys Asp Ser Ile
1055 1060 1065

Asn Gln Thr Cys Gln Thr Ala Ile Ser Gly Ser Met Thr Cys Gly
1070 1075 1080

Asn Asn Lys Ser Leu Asp Ser Leu Ser Ile His Gly Cys His Ser
1085 1090 1095

His Asp Ser Pro Leu His Lys Glu Ser Asn Leu Glu Gln Lys Ser
1100 1105 1110

Leu Asp Val Ala Gly Glu Gly Ile Lys Ser Pro His Ala Val Gly
1115 1120 1125

Gln Gly Cys Ser Asp Lys Glu His Asn His Ser His Pro Glu Lys
1130 1135 1140

Ala Tyr Asp Ser Cys Ala Thr Asp Asp Cys Cys Phe Ser Val Gln
1145 1150 1155

Val His Gly Ile Asp Asp Val Ser Arg Ser Glu Ile Gln Glu Thr
1160 1165 1170

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ser
1325

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

<220>
<223> cebador PCR PMG783F

<400> 50
attctagact gctgctatgt catcactgg 29

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

<220>
<223> cebador PCR PMG783R

<400> 51
ataagcttag cctgaagaat tgagcaaa 28

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

<220>
<223> cebador PCR PMG 785F

<400> 52
atgagctctg gttatgtagg ctactgctgc t 31

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

<220>
<223> cebador PCR PMG 786R

<400> 53
atactagtat ttgtagtgcc agcccaga 28

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

<220>
<223> cebador PCR PMG754F

<400> 54
attctagatg agagcaagtc aggtcatcc 29

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

<220>
<223> cebador PCR PMG754R

<400> 55
ataagctttt caaacatcca ccgcatta 28

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

<220>
<223> cebador PCR PMG757F

<400> 56
atgagctcgc attgagagca agtcaggtc 29

<210> 57
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> cebador PCR PMG757R

303

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/010546

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/82 C07K14/415 C07K16/16 A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N C07K A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search, EMBL

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/090583 A (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE [FR]; RICHAUD PIERRE [FR]; VERRET FREDER) 29 September 2005 (2005-09-29) figure 1	1-4,17
X	COURBOT MIKAEL ET AL: "A major quantitative trait locus for cadmium tolerance in Arabidopsis halleri colocalizes with HMA4, a gene encoding a heavy metal ATPase" PLANT PHYSIOLOGY (ROCKVILLE), vol. 144, no. 2, June 2007 (2007-06), pages 1052-1065, XP002522569 ISSN: 0032-0889 figure 4	1-4,17

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
7 April 2009	22/04/2009

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31–70) 340–2040, Fax: (+31–70) 340–3016	Bucka, Alexander

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/010546

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HUSSAIN DAWAR ET AL: "P-type ATPase heavy metal transporters with roles in essential zinc homeostasis in Arabidopsis" PLANT CELL, AMERICAN SOCIETY OF PLANT PHYSIOLOGISTS, ROCKVILLE, MD, US, vol. 16, no. 5, 1 May 2004 (2004-05-01), pages 1327-1339, XP002495497 ISSN: 1040-4651 page 1337, right-hand column - page 1338, left-hand column	1-4,17, 18
X	DATABASE EMBL [Online] 21 June 2005 (2005-06-21), "Chloroplast transformation vector pRvdB1, complete sequence." XP002522570 retrieved from EBI accession no. EMBL:DQ073476 Database accession no. DQ073476 the whole document	1,2
Y	BOVET LUCIEN ET AL: "Cadmium partitioning and gene expression studies in Nicotiana tabacum and Nicotiana rustica" PHYSIOLOGIA PLANTARUM, vol. 128, no. 3, November 2006 (2006-11), pages 466-475, XP002522437 ISSN: 0031-9317 figure 6	1-18
Y	VERRET F ET AL: "Overexpression of AtHMA4 enhances root-to-shoot translocation of zinc and cadmium and plant metal tolerance" FEBS LETTERS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 576, no. 3, 22 October 2004 (2004-10-22), pages 306-312, XP004605705 ISSN: 0014-5793 page 311	1-18
A	VICTOR KORENKOV ET AL: "Enhancing tonoplast Cd/H antiport activity increases Cd, Zn, and Mn tolerance, and impacts root/shoot Cd partitioning in Nicotiana tabacum L" PLANTA ; AN INTERNATIONAL JOURNAL OF PLANT BIOLOGY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 226, no. 6, 18 July 2007 (2007-07-18), pages 1379-1387, XP019563589 ISSN: 1432-2048 page 1385, right-hand column - page 1386, left-hand column	1-18

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/010546

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 02/081707 A (POSCO [KR]; POHANG UNIVERSITY OF SCIENCE & [KR]; LEE YOUNGSOOK [KR]; Y) 17 October 2002 (2002-10-17) the whole document	1-18
A	MILLS R F ET AL: "The plant P1B-type ATPase AtHMA4 transports Zn and Cd and plays a role in detoxification of transition metals supplied at elevated levels" FEBS LETTERS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 579, no. 3, 31 January 2005 (2005-01-31), pages 783-791, XP004725196 ISSN: 0014-5793 the whole document	1-18
A	WILLIAMS ET AL: "P1B-ATPases - an ancient family of transition metal pumps with diverse functions in plants" TRENDS IN PLANT SCIENCE, ELSEVIER SCIENCE, OXFORD, GB, vol. 10, no. 10, 1 October 2005 (2005-10-01), pages 491-502, XP005099058 ISSN: 1360-1385 the whole document	1-18
A	LEE JOOHYUN ET AL: "Functional expression of a bacterial heavy metal transporter in Arabidopsis enhances resistance to and decreases uptake of heavy metals." PLANT PHYSIOLOGY (ROCKVILLE), vol. 133, no. 2, October 2003 (2003-10), pages 589-596, XP002522891 ISSN: 0032-0889 the whole document	1-18
A	SONG W-Y ET AL: "Engineering tolerance and accumulation of lead and cadmium in transgenic plants" NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, vol. 21, no. 8, 1 August 2003 (2003-08-01), pages 914-919, XP002287817 ISSN: 1087-0156 the whole document	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2008/010546

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005090583 A	29-09-2005	CA 2560220 A1	29-09-2005
		EP 1725668 A1	29-11-2006
		WO 2005093078 A1	06-10-2005
		JP 2007529217 T	25-10-2007
WO 02081707 A	17-10-2002	CN 1551921 A	01-12-2004
		EP 1373523 A1	02-01-2004
		JP 2004533231 T	04-11-2004
		US 2004098759 A1	20-05-2004

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN PCT

(21) N° de solicitud:	(51) Int Cl: **C12N 015/082**
22) Fecha de solicitud:	(71)Solicitante(s) **PHILIP MORRIS PRODUCTS S.A.**
(30) Prioridad (31) ***Prioridad*** (32) ***Fecha*** (33) ***País*** **60/996,982** **13/12/2007** **US**	(72) Inventor(es) **ALEC HAYES Y OTROS**
	(74) Apoderado: **LUZ CLEMENCIA DE PAEZ**
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 13/07/2010 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 11/12/2008 No. de solicitud PCT/EP2008/010546	(87) Publicación internacional Fecha: 18/06/2009 N° publicación: ***WO 2009/074325 A1***

(54) Titulo: **PLANTAS TRANSGÉNICAS MODIFICADAS PARA REDUCIR EL TRANSPORTE DE CADMIO, PRODUCTOS DERIVADOS, Y MÉTODOS RELACIONADOS**

Reivindicación(es):

1. Un polinucleótido aislado seleccionado del grupo que consiste de:
un polinucleótido que comprende o consiste de una secuencia que tiene por lo menos 70% de identidad de secuencia para la SEQ ID NO:1, y que codifica un transportador NtHMA que tiene actividad ATPasa tipo P1 B;
un polinucleótido que comprende o consiste de una secuencia que tiene por lo menos 70% de identidad de secuencia para la SEQ ID NO: 3;
un polinucleótido que comprende o consiste de una secuencia que tiene por lo menos 70% de identidad de secuencia para la SEQ ID NO: 47;
un polinucleótido que comprende o consiste de una secuencia que codifica un polipéptido que tiene por lo menos 70% de identidad de secuencia para la SEQ ID NO:2, en donde el polipéptido es un transportador NtHMA que tiene actividad ATPasa tipo P1 B; y
un polinucleótido que comprende o consiste de una secuencia que codifica un polipéptido que tiene por lo menos 70% de identidad de secuencia para la SEQ ID NO: 49, en donde el polipéptido es un transportador NtHMA que tiene actividad ATPasa tipo P1 B.

2. Un vector de expresión que comprende el polinucleótido aislado de la reivindicación 1.

3. Una planta transgénica hecha mediante un proceso que comprende introducir el polinucleótido aislado de la reivindicación 1 o el vector de expresión de la reivindicación 2.

4. Una estirpe celular hecha mediante un proceso que comprende introducir el polinucleótido aislado de la reivindicación 1 o el vector de expresión de la reivindicación 2.

5. Un producto de tabaco consumible que incorpora hojas cosechadas de la planta transgénica de la reivindicación 3.

6. Una construcción ARNi NtHMA capaz de inhibir la expresión de un ARN mensajero NtHMA al que esta corresponde, la construcción comprende o consiste de:
una primera secuencia que tiene por lo menos 70% de identidad de secuencia a una porción de la SEQ ID NO:3 o 47;
una segunda secuencia; y
una tercera secuencia que tiene una secuencia complementaria inversa de la primera secuencia, posicionada en la misma orientación como la primera secuencia,
en donde la segunda secuencia se posiciona entre la primera secuencia y la tercera secuencia, y la segunda secuencia se liga operablemente a la primera secuencia y a la tercera secuencia.

7. La consirucción ARNi NtHMA de la reivindicación 6, en donde:
(a) la primera secuencia tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia a una secuencia seleccionada de una o más del grupo que consiste de: exón 1 (SEQ ID NO:5), un fragmento de exón 1 (SEQ ID NO:5), exón 2 (SEQ ID NO:7), un fragmento de exón 2 (SEQ ID NO:7), exón 3 (SEQ ID NO:9), un fragmento de exón 3 (SEQ ID NO:9), exón 4 (SEQ ID NO:11), un fragmento de exón 4 (SEQ ID NO:11), exón 5 (SEQ ID NO:13), un fragmento de exón 5 (SEQ ID NO: 13), exón 6 (SEQ ID NO: 15), un fragmento de exón 6 (SEQ ID NO:15), exón 7 (SEQ ID NO: 17), un fragmento de exón 7 (SEQ ID NO: 17), exón 8 (SEQ ID NO: 19), un fragmento de exón 8 (SEQ ID NO: 19), exón 9 (SEQ ID NO:21), un fragmento de exón 9 (SEQ ID NO:21), exón 10 (SEQ ID NO:23), un fragmento de exón 10 (SEQ ID NO:23), exón 11 (SEQ ID NO:25), y un fragmento de exón 11 (SEQ ID NO:25);
(b) la segunda secuencia tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia a una secuencia seleccionada de una o más del grupo que consiste de: intrón 1 (SEQ ID NO:4), un fragmento de intrón 1 (SEQ ID NO:4), intrón 2 (SEQ ID NO:6), un fragmento de intrón 2 (SEQ ID NO:6), intrón 3 (SEQ ID NO:8), un fragmento de intrón 3 (SEQ ID NO:8), intrón 4 (SEQ ID NO: 10), un fragmento de intrón 4 (SEQ ID NO: 10), intrón 5 (SEQ ID NO:12), un fragmento de intrón 5 (SEQ ID NO:12), intrón 6 (SEQ ID NO:14), un fragmento de intrón 6 (SEQ ID NO:14), intrón 7 (SEQ ID NO:16), un fragmento de intrón 7 (SEQ ID NO:16), intrón 8 (SEQ ID NO:18), un fragmento de intrón 8 (SEQ ID NO: 18), intrón 9 (SEQ ID NO:20), un fragmento de intrón 9 (SEQ ID NO:20), intrón 10 (SEQ ID NO:22), un fragmento de intrón 10 (SEQ ID NO:22), intrón 11 (SEQ ID NO:24), un fragmento de intrón 11 (SEQ ID NO:24), intrón 12 (SEQ ID NO:26), y un fragmento de intrón 12 (SEQ ID NO:26);

508

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176081

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 10-085354- -00000-0000

Fecha: 2010-07-13 16:38:45 Dep: 2020 DIR.NULVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Lve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 310

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 42,145
FECHA : MAYO 24 DE 2010

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	132664663	24/05/2010	23,760,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	*** S.DISTINTIVO CAMBIOD TITULARIDAT-	350,000.00
		TOTAL : $	350,000.00

SON: TRESCIENTOS CINCUENTA MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

Clo 12770-841-041-1

309

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-7

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 48,328
FECHA : JUNIO 15 DE 2010

No. 10-085354- -00000-0000
Fecha: 2010-07-13 16:38:45 Dep: 2020 DIR.NULVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Lve: 378 PASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 310

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	132666984	15/06/2010	$1,356,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	*** TASA ANUAL C.RECARGO AÑOS 4 a 9 P	389,000.00

****

TOTAL : $ 389,000.00

SON: TRESCIENTOS OCHENTA Y NUEVE MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

C/c 12770 - 841-041-1

310.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 8001

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 10-085354- -00000-0000

Fecha: 2010-07-13 16:38:45 Dep: 2020 DIR NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASLNACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 310

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 55,138
FECHA : JULIO 6 DE 2010

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	156799985	06/07/2010	32,255,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	*** REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL	26,000.00
		TOTAL : $	26,000.00

SON: VEINTISEIS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

Cdlo 12770-84-041-1

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 10-085354- -00000-0000

Fecha: 2010-07-13 16:38:45 Dep: 2020 DIR NULVASCR
Tra: 11 PATENTEYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 310

PATENTE DE INVENCIÓN ☐ **MODELO DE UTILIDAD** ☐ **Art 33 Decisión 486/00**

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCIÓN PCT ☐ **MODELO DE UTILIDAD PCT** ☐ **Art.33 Decisión 486/00, Circular Única**

- ☐ Indicación que se solicita una PCT
- ☐ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ **(Art. 119 Decisión 486/00)**

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ **(Art. 92 Decisión 486/00)**

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
SUAREZ DE PAEZ LUZ CLEMENCIA
Apoderado(a) y/o Representante de
PHILIP MORRIS PRODUCTS S.A.

REFERENCIA	Radicación No.	10 085354
	Solicitud internacional	PCT/EP2008/010546
	Fecha inicio fase nacional	13/07/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	09498

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal b) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

ALBA CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 30 JUL 2010
adpa11