

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-067186- -00000-0000

Fecha: 2013-04-03 16:46:51
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 133

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO REDUCCION DE METAL PESADO EN VEGETALES

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE PHILIP MORRIS PRODUCTS S.A.

DOMICILIO NEUCHATEL, SUIZA

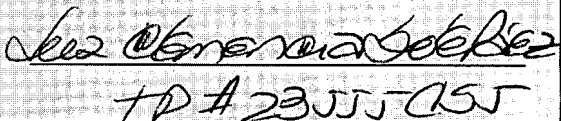
74. APODERADO LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
C.C. 35. 456.344 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D.C., _____

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 13-067186- -00000-0000 Fecha: 2013-04-03 16:46:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI Act. 411 PRESENTACION Folios: 133
---	--

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL -PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No.		PCT/EP2011/004383	Fecha 2011/08/31
Publicación Internacional No.		WO 2012/028309 A2	Fecha 2012/03/08
3	TÍTULO DE LA INVENCIÓN		
REDUCCIÓN DE METAL PESADO EN VEGETALES			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)		
CO7K 014/041			
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN
PHILIP MORRIS PRODUCTS S.A.			
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN		Quai Jeanreaud 3, CH-2000 Neuchâtel	No. TELÉFONO 3 47 36 11
CIUDAD		Neuchâtel	CORREO ELECTRÓNICO clientes@cavelier.com
DEPARTAMENTO/ESTADO			NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN
PAÍS DE RESIDENCIA		Suiza	
7	INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
1. BOVET		Lucien	Sueco
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
1. Suiza		La Chaux-de-Fonds	Rue du Temple-Allemand 45, 2300 La Chaux-de-Fonds,
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)			
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.			
9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO		
APELLIDOS		NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
De Páez		Luz Clemencia	C.C . 35.456.344 T.P . 23.555
DIRECCIÓN	Carrera 4ª No. 72-35	No. TELÉFONO	3 47 36 11
CIUDAD	BOGOTA	CORREO ELECTRÓNICO	cavelier@cavelier.com
PAÍS	COLOMBIA	No. RADICACIÓN DE PROTOCOLO DE PODER GENERAL	
10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO		
(33) PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO
EUROPA		EP	10009180.0
		(32) FECHA (AAAA/MM/DD)	2010/09/03

11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS		
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.</i>			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.			
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES		
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.</i>			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.			
13	REDUCCIÓN DE TASAS		
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i>			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.			
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐			
Universidades públicas o privadas ☐			
Entidades sin ánimo de lucro ☐			
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos			
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☐ SI ☐ NO		
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.			
15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	No. <u>13-0025026</u> No. <u>13-0030561</u>	Fecha: <u>2013/03/13</u> Fecha: <u>2013/04/03</u>
16	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL <i>Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)</i>		
Nombre del Firmante LUZ CLEMENCIA DE PAEZ		Firma  TP # 23555-055	
C.C 35.456.344 de Usaquen		Tarjeta Profesional 23.555	

JGG\SDC\ID-AF238896\WPC12770

17 ANEXOS	
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano 1. ☒ Descripción N° de folios: <u>99</u> 2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: <u>15</u> 3. ☒ Dibujos y/o figuras N° folios: <u>13</u> 4. ☒ Resumen. 5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso. 6. ☒ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso. 7. ☐ Arte final 12 x 12. 8. ☐ Anexo formato digital.	Documentación Jurídica 9. ☒ Poder de PHILIP MORRIS PRODUCTS S.A. 10. ☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante. 11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso. 12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso. 13. Reducción de tasas Micro, pequeñas o medianas empresas ☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea. ☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004. Universidades públicas o privadas ☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación Entidades sin ánimo de lucro ☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio. ☐ Hoja de información complementaria. ☐ Otros, especificar 14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$500.000. 15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad. 16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación. 17. ☒ Comprobante de pago por 5 reivindicaciones adicionales a 10 por \$150.000.

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
8 March 2012 (08.03.2012)

(10) International Publication Number
WO 2012/028309 A2

(51) International Patent Classification:
C07K 14/41 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/EP2011/004383

(22) International Filing Date:
31 August 2011 (31.08.2011)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
10009180.0 3 September 2010 (03.09.2010) EP

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

(72) Inventor; and

(75) Inventor/Applicant (for US only): **BOVET, Lucien** [CH/CH]; Numa-Droz 45, CH-2300 La-chaux-de-Fonds (CH).

(74) Agent: **LLOYD, John, Scott;** Edwards Wildman Innova-tions LLP, 10 Carlton Crescent, Southampton SO15 2EZ (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, CL, 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, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report (Rule 48.2(g))

— with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(54) Title: **HEAVY METAL REDUCTION IN PLANTA**

(57) Abstract: There is described a mutant, non-naturally occurring or transgenic plant or plant cell comprising (a) a polynucleotide selected from the group consisting of: (i) a polynucleotide comprising, consisting or consisting essentially of a sequence having at least 71 % sequence identity to SEQ ID NOs: 1, 2, 27, 28 or 29 or 51; or (ii) a polynucleotide comprising, consisting or consisting essentially of a sequence having at least 65 % sequence identity to any of SEQ ID NOs: 3 to 23 or 30 to 50; or (iii) a polynucleotide encoding a NtMRP polypeptide comprising, consisting or consisting essentially of a sequence having at least 65% sequence identity to any of SEQ ID NOs. 24 to 26 or 52, and wherein the polypeptide has heavy metal transporter activity; or (b) a polynucleotide construct of at least 15 contiguous nucleotides in length that is at least 65 % identical to a region of any of SEQ ID NOs: 1 to 23 or 27 to 51; or (c) a double-stranded RNA comprising at least two sequences that are at least partially complementary to each other and wherein a sense strand comprises a first sequence and an antisense strand comprises a second sequence and wherein at least one of the sequences comprises at least 10 contiguous nucleotides of NtMRP RNA; or (d) an expression vector comprising the polynucleotide as set forth in (i), (ii) or (iii) or the polynucleotide construct as set forth in (b).

WO 2012/028309 A2

Reducción de metal pesado en vegetales

Campo de la invención

La presente invención se dirige a polinucleótidos y polipéptidos que codifican transportadores ABC que se involucran en el transporte de metal pesado. La presente invención también está dirigida a modificar la expresión de dichos polinucleótidos o polipéptidos en vegetales. En particular, la presente invención se refiere a la modulación (por ejemplo, disminución o inhibición) de la expresión o la actividad de uno o más transportadores ABC involucrados en el transporte de metal pesado a nivel subcelular.

Introducción

Los vegetales obtienen metales pesados esenciales, tales como cinc y cobre, absorbiendo sustratos de ion metálico desde su ambiente mediante diversos mecanismos de transporte mediados por transportadores de transmembrana expresados sobre la superficie de células de raíz y otros tejidos vasculares. Un mecanismo utiliza el transporte de toxinas fuera del citosol. Por ejemplo, la familia de bomba del S-conjugado de glutationa (GS-X) es una clase de transportadores de casete que enlaza ATP (ABC, por las siglas de ATP-binding cassette) que es responsable de la eliminación / secuestro de compuestos en vegetales así como células de mamíferos, de levadura. La estructura y función molecular de las bombas GS-X codificadas por genes mamíferos y vegetales tMRP, cMOAT (por canalicular multispecific anion transporter o transportador de anión multiespecífico canalicular), y YCF1 (por yeast cadmio factor o factor de cadmio de levadura) parecen haberse conservado a lo largo de la evolución molecular.

Los vegetales se exponen a toxinas exógenas, tales como productos microbianos, aleloquímicos, agroquímicos y metales pesados, que hacen la supervivencia celular dependiente de mecanismos para desintoxicar o reducir la acumulación de estos agentes. Los metales pesados, tales como plomo, cadmio, mercurio, etc., son tóxicos ambientales principales que causan la generación de especímenes de oxidación reactivos, daño al ADN y desactivación de enzima por el enlace a sitios activos de enzimas en células de organismos vivos. La contaminación del ambiente con metal pasado se ha incrementado drásticamente debido a la industrialización y se incrementa en el tamaño de la población. Los suelos contaminados con metales pesados inhiben el crecimiento vegetal normal y causan contaminación de productos alimenticios. Muchos metales pesados son muy tóxicos para la salud humana y son carcinógenos a bajas concentraciones.

La reducción en el contenido de los metales pesados, tales como cadmio, de los vegetales o productos vegetales consumidos por animales y humanos, es altamente deseable y requerido de manera urgente. Un objeto de la presente invención es satisfacer esta necesidad.

Aspectos y modalidades de la invención

Los aspectos y las modalidades de la presente invención se describen en las reivindicaciones acompañantes.

En un aspecto se proporciona un polinucleótido aislado seleccionado del grupo que consiste de: un polinucleótido aislado que comprende, consiste o esencialmente consiste en una secuencia que tiene al menos 71 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO:27 o SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 o SEQ ID NO: 51; un polinucleótido aislado que comprende, consiste o esencialmente consiste en una secuencia que tiene al menos 65 % de identidad de secuencia a cualquiera de las SEQ ID NOs: 3 a 23 o 30 a 50 o 53; un polinucleótido que codifica un polipéptido NtMRP que comprende, consiste o esencialmente consiste en una secuencia que tiene al menos 65% de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NOs: 24 a 26 o 52, y en cuyo caso el polipéptido tiene preferiblemente actividad de transportador de metal pesado.

En otro aspecto, se proporciona un constructo de polinucleótido de al menos 15 nucleótidos contiguos en una longitud que es al menos 65 % idéntica a una región de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 23 o 27 a 51.

En otro aspecto, se proporciona un ribopolinucleótido bicatenario que comprende al menos dos secuencias que son al menos parcialmente complementarias entre sí y en cuyo caso una hebra sentido comprende una primera secuencia y una hebra antisentido comprende una segunda secuencia y en cuyo caso al menos una de las secuencias comprende al menos 10 nucleótidos contiguos de ARN NtMRP.

Adecuadamente, el ARN bicatenario comprende una primera secuencia que tiene al menos 65% de identidad de secuencia con al menos 10 nucleótidos de ADN NtMRP; una segunda secuencia; y una tercera secuencia que tiene a una secuencia complementaria opuesta de la primera secuencia, posicionada en la misma orientación que la primera secuencia, en cuyo caso la segunda secuencia está posicionada entre la primera secuencia y la tercera secuencia, y la segunda secuencia está enlazada de modo operable con la primera secuencia y con la tercera secuencia.

Adecuadamente, la primera secuencia tiene al menos 65% de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo consistente de: SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50 and SEQ ID NO:53.

Adecuadamente, la tercera secuencia tiene al menos 65% de identidad de secuencia con el complemento opuesto de la correspondiente secuencia con SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42,

SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50 and SEQ ID NO: 53.

En otro aspecto, se proporciona un vector de expresión que comprende el polinucleótido aislado o el constructo de polinucleótido.

En otro aspecto, se proporciona una célula vegetal mutante, que no se presenta de manera natural o transgénica que comprende el polinucleótido aislado, el constructo de polinucleótido, el ribopolinucleótido bicatenario o el vector de expresión.

En otro aspecto, se proporciona una célula vegetal mutante, que no se presenta en la naturaleza, o transgénica.

En otro aspecto, se proporciona material vegetal que incluye biomasa, semillas u hojas que comprenden células o tejidos de dicho vegetal.

En otro aspecto, se proporciona un producto de tabaco que comprende una parte de dicho vegetal o célula vegetal o dicho material vegetal.

En otro aspecto, se proporciona un vegetal mutante, que no se presenta en la naturaleza, o transgénico, en cuyo caso la expresión del polinucleótido NtMRP y la actividad de la proteína codificada por el mismo o la actividad de la proteína codificada por el mismo se disminuye y las hojas de dicho vegetal tienen una reducción en el contenido de cadmio de al menos 5% en comparación con una planta de control en la que la expresión del polinucleótido NtMRP y la actividad de la proteína codificada por el mismo o la actividad de la proteína codificada por el mismo no ha disminuido.

En otro aspecto, se proporciona biomasa, semillas u hojas que comprenden tejidos del vegetal.

En otro aspecto, se proporciona un método para reducir los niveles de cadmio en al menos una parte de un vegetal, que comprende el paso de reducir la expresión de polinucleótido NtMRP y la actividad de la proteína codificada por el mismo o la actividad de la proteína codificada por el mismo en comparación con un planta de control en el que la expresión de polinucleótido NtMRP y la actividad de la proteína codificada por el mismo o la actividad de la proteína codificada por el mismo no ha disminuido.

En otro aspecto, se proporciona un vegetal mutante, que no se presenta en la naturaleza, o transgénico, obtenido u obtenible mediante el método descrito en la presente, en cuyo caso hay una reducción en el contenido de cadmio de al menos cerca de 5% en al menos una parte del vegetal en comparación con un planta de control en el que la expresión de polinucleótido NtMRP y la actividad de la proteína codificada por el mismo

o la actividad de la proteína codificada por el mismo no se ha disminuido.

En otro aspecto, se proporciona un polipéptido NtMRP aislado expresado por el conjunto de secuencias descrito en cualquiera de SEQ ID NOs: 24 a 26 o SEQ ID NOs:52, preferiblemente, en cuyo caso el polipéptido tiene actividad transportadora de metal pesado.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo que se enlaza específicamente al polipéptido aislado.

En otro aspecto, se proporciona un método de detección de un polinucleótido NtMRP en una muestra que comprende el paso de: (a) proporcionar una muestra que comprende un polinucleótido; (b) poner en contacto dicha muestra con uno de varios cebadores o una o varias sondas para detectar específicamente al menos una porción de polinucleótido NtMRP; y (c) detectar la presencia de un producto de amplificación, en cuyo caso la presencia de un producto de amplificación es indicativa de la presencia del polinucleótido NtMRP en la muestra.

Otros aspectos de la presente invención se describen abajo.

Un gen quimérico que comprende el polinucleótido aislado enlazado de modo operable a una o varias secuencias reguladoras.

Un constructo de polinucleótido o un ARN bicatenario de acuerdo con la presente invención, donde el polinucleótido comprende, consiste o esencialmente consiste en al menos 15-30 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 o 600-700 nucleótidos.

Un conjugado que comprende el polinucleótido aislado, el gen quimérico, el constructo de polinucleótido, o el ARN bicatenario de acuerdo con la presente invención y al menos un grupo no-nucleótido o no-polinucleótido pegado de modo covalente al mismo.

Una célula vegetal mutante, que no se presenta en la naturaleza o transgénica que comprende el polinucleótido aislado, el gen quimérico, el constructo de polinucleótido, el ARN bicatenario, el conjugado o el vector de expresión de acuerdo con la presente invención.

Un vegetal mutante, que no se presenta en la naturaleza o transgénico que comprende la célula vegetal mutante, que no se presenta en la naturaleza o transgénica de acuerdo con la presente invención.

Adecuadamente, la biomasa seca de las hojas recogidas es aproximadamente la misma que aquella de la planta de control.

Biomasa, semillas u hojas que comprenden tejido del vegetal de la presente invención.

Un producto consumible que incorpora o utiliza biomasa, semillas u hojas de acuerdo con la presente invención.

Biomasa, semillas u hojas de acuerdo con la presente invención o un producto consumible de acuerdo con la presente invención, en cuyo caso hay una reducción en el contenido de cadmio de al menos aproximadamente 5% en comparación con la biomasa, semillas u hojas de una planta de control en el que la expresión de polinucleótido NtMRP y la actividad de la proteína codificada por el mismo o la actividad de la proteína codificada por el mismo no ha disminuido.

Una línea celular que comprende el polinucleótido aislado, el gen quimérico, el constructo de polinucleótido, el ARN bicatenario, el conjugado o el vector de expresión de acuerdo con la presente invención.

Un método para preparar una planta mutante, que no se presenta en la naturaleza, o transgénica, que comprende el paso de reducir la expresión de polinucleótido NtMRP y la actividad de la proteína codificada por el mismo o la actividad de la proteína codificada por el mismo en al menos una parte de dicho vegetal en comparación con un planta de control en el que la expresión de polinucleótido NtMRP y la actividad de la proteína codificada por el mismo o la actividad de la proteína codificada por el mismo no ha disminuido.

Un método para reducir los niveles de cadmio en al menos una parte de un vegetal, que comprende el paso de reducir la expresión de polinucleótido NtMRP y la actividad de la proteína codificada por el mismo o la actividad de la proteína codificada por el mismo en comparación con un planta de control en el cual la expresión del polinucleótido NtMRP y la actividad de la proteína codificada por el mismo o la actividad de la proteína codificada por el mismo no ha disminuido.

Adecuadamente, dicho método comprende el primer paso de poner en contacto dicho vegetal con el constructo de polinucleótido, el ARN bicatenario, el conjugado, el vector de expresión, una meganucleasa, o una proteína de dedo de cinc.

Adecuadamente, dicho método comprende el primer paso, o paso adicional, de poner en contacto dicho vegetal con un mutágeno.

Un vegetal mutante que no se presenta en la naturaleza, o transgénico, obtenido u obtenible por los métodos de la presente invención, en cuyo caso hay una reducción en el contenido de cadmio de al menos aproximadamente 5% en al menos una parte del vegetal en comparación con un planta de control en el cual la expresión de polinucleótido NtMRP y la actividad de la proteína codificada por el mismo o la actividad de la proteína codificada por el mismo no ha disminuido.

Un método para modular (por ejemplo, reducir o inhibir) la expresión de polinucleótido NtMRP o la actividad de la proteína codificada por el mismo en una célula, dicho método que comprende administrar el gen quimérico, el constructo de polinucleótido, el ARN bicatenario, el conjugado o el vector de expresión de acuerdo con la presente invención.

Un método para detectar, aislar, amplificar o analizar el polinucleótido NtMRP, el método que comprende el paso de proporcionar una muestra que comprende polinucleótido e hibridar dicho polinucleótido a una molécula de polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótido de al menos 10 nucleótidos contiguos a partir de la secuencia de nucleótido aislada de acuerdo con la presente invención.

Uso de agente que modula (por ejemplo, reduce o inhibe) la expresión de polinucleótido NtMRP y la actividad de la proteína codificada por el mismo o la actividad de la proteína codificada por el mismo para reducir el contenido de cadmio en al menos una parte de un vegetal en al menos el 5% en comparación con un planta de control en el que la expresión de polinucleótido NtMRP y la actividad de la proteína codificada por el mismo o la actividad de la proteína codificada por el mismo no ha disminuido.

El método o el uso de acuerdo con la presente invención, donde el agente es o se deriva de polinucleótido NtMRP, un gen NtMRP quimérico, un constructo de polinucleótido que comprende polinucleótido NtMRP, un ARN antisentido, un ARN bicatenario, un ADNc, un conjugado que comprende polinucleótido NtMRP y al menos un grupo no-nucleótido o no-polinucleótido pegado de modo covalente al mismo, una ribozima, un mutágeno, un dedo de cinc, una molécula pequeña o una meganucleasa.

En otro aspecto, se proporciona un método para producir un producto de tabaco que comprende los pasos de: (a) obtener semillas del vegetal mutante, que no se presenta en la naturaleza, o transgénico; (b) plantar y cultivar las semillas para convertirse en una planta; (c) cosechar la planta; y (d) preparar un producto de tabaco a partir de la planta cosechada.

Las modalidades arriba mencionadas se divulgan como modalidades de cada uno de los aspectos descritos arriba.

Algunas ventajas

Producir plantas mutantes, que no se presentan en la naturaleza, o transgénicas, (incluida la biomasa, las semillas y las hojas obtenidas de las mismas) en las que están presentes cantidades más bajas de cadmio proporciona un número de ventajas.

A manera de ejemplo, las plantas, incluidas las mutantes que no se presenta en la naturaleza o transgénicas, pueden cultivarse en suelos que contienen concentraciones de cadmio variables, o en suelos que contienen menos que las concentraciones deseables de cadmio. Estas plantas y semillas derivadas pueden proporcionar más opciones para cultivarlas en un rango más amplio de ambientes de suelo que pueden incrementar la cantidades de suelos cultivables disponibles para los profesionales (por ejemplo, granjeros).

A manera de otro ejemplo, las plantas mutantes, que no se presentan en la naturaleza (incluidas la biomasa, las semillas y hojas obtenidas de las mismas) exhiben contenido reducido de cadmio en comparación con las contrapartes de control y pueden consumirse directamente como productos comestibles. El consumo de estos productos comestibles puede ser una opción más saludable. Las plantas adecuadas que pueden manipularse de acuerdo con los métodos divulgados incluyen plantas cultivables para uso en la agricultura, incluido el tabaco, arroz, maíz, calabacín, soja, lechuga, papa, remolacha, hierbas, trigo, cebada y zanahoria, etc.

A manera de otro ejemplo, la altura y/o el peso de las plantas mutantes, que no se presentan en la naturaleza, o transgénicas, son sustancialmente las mismas que los vegetales de control. De esta manera, no se encuentran diferencias significativas en las hojas secas recogidas de las plantas en comparación con una de control lo cual indica que la modulación de los transcritos de NtMRP no tiene efecto estadísticamente relevante en la biomasa seca. Esto es ventajoso porque se usan las plantas para la producción comercial de diversos productos incluido tabaco, donde las alteraciones en la apariencia visual no serían aceptables para la industria o podrían resultar en rendimientos de producción reducidos de modo inaceptable.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. La Figura 1 (a) es un diagrama esquemático del locus NtMRP4 locus; la figura 1 (b) muestra la secuencia de nucleótido de NtMRP4 en la que las regiones UTR 5' y 3' están subrayadas; se muestran exones en letras mayúsculas y negrilla; se muestran intrones en minúsculas y en letras normales; y se muestran codones de inicio y de detención en gris. Las secuencias de cebadores 5' y 3' para la generación de una secuencia ARNi NtMRP4 están indicadas en *italica* y tachados.

Figura 2 ilustra la expresión de polinucleótido NtMRP4 durante tratamiento de cadmio en condiciones hidropónicas por 7 días. Plántulas KY14 de tres semanas fueron tratadas con CdCl₂ de 0.05 y 0.5 (a) y plántulas de *N. rustica* y *N. tabacum* (TN90) de 4 semanas fueron tratadas con CdCl₂ de 0.5 microM por una semana (b). se aisló ARN y se sometió a RT-PCR semicuantitativo.

Figura 3 ilustra reducción de cadmio en las hojas en líneas 1 y 2 de líneas de ARNi de NtMRP4 en comparación con las plantas de tipo silvestre cultivadas en campo.

Figura 4 muestra reducción de cadmio en las hojas para dos líneas cultivadas de ARNi NtMRP4. En este experimento se adicionó un control de vector sin un inserto de NtMRP4.

Figura 5 muestra la estructura entrón-exón y la locación de intrones y exones a lo largo de la secuencia genómica de clon NtPMI-BAC-GOTOWE_5_g0NA BAC que se extiende por la región codificante NtMRP4.

La homología de la secuencia de ADNc (par de base 1-4,521 hebra superior) y la secuencia de clon de BAC genómica que comprende la región que codifica MRP4 (par de base 61,781-69,748 hebra inferior) es 100%.

Figura 6 muestra la secuencia de nucleótido de NtMRP3 en la que las regiones de UTR 5' y 3' están en *italica*; los exones se muestran en letra mayúscula y negrilla; los intrones se muestran en letras minúsculas y normales; y los codones de inicio y de detención se muestran en letra mayúscula, negrilla e *italica*.

Definiciones

Los términos y expresiones técnicos usados dentro del alcance de esta solicitud reciben por lo general el significado comúnmente aplicado a los mismos en el arte pertinente de biología vegetal y molecular. Todas las siguientes definiciones de términos aplican al contenido completo de esta solicitud. La expresión "que comprende" no excluye otros elementos o pasos, y el artículo indefinido "uno" o "una" no excluye una pluralidad. Un solo paso puede cumplir las funciones de varias características declaradas en las reivindicaciones. Los términos "esencialmente", "cerca de", "aproximadamente" y similares en conexión con un atributo o un valor particularmente también define exactamente el atributo o el valor, respectivamente.

El término "cerca de" en el contexto de un valor numérico dado o de un rango se refiere a un valor o un rango que está dentro de 20 %, dentro de 10 %, o dentro de 5 %, 4%, 3%, 2% o 1 % del valor dado del rango.

Un 'polinucleótido' se refiere a un polímero de nucleótidos que puede ser desoxiribopolinucleótido (ADN) o ribopolinucleótido (ARN) no modificado o modificado. Por consiguiente, un polinucleótido puede ser, sin limitación, un ADN genómico, ADN complementario (ADNc) (por ejemplo, SEQ ID No. 27), ARNm, o ARN antisentido. Además, un polinucleótido puede ser ADN monocatenario o bicatenario, ADN que es una mezcla de regiones monocatenarias o bicatenarias, una molécula híbrida que comprende AND y ARN o una molécula híbrida con una mezcla de regiones monocatenarias y bicatenarias. Adicionalmente, el polinucleótido puede componerse de regiones tricatenarias que comprenden ADN, ARN o ambos. Un polinucleótido puede contener una o varias bases modificadas tales como fosfotioatos y puede ser un polinucleótido péptido (PNA). Por lo general, los polinucleótidos descritos en la presente pueden ensamblarse a partir de fragmentos aislados o clonados de ADNc, ADN genómico, oligonucleótidos, o nucleótidos individuales, o una combinación de los anteriores.

Aunque las secuencias polinucleótidas descritas en la presente se muestran como secuencias de ADN, las secuencias incluyen sus correspondientes secuencias de ARN y sus secuencias de ADN o ARN complementarias (por ejemplo, completamente complementarias), incluidos los complementos opuestos de las mismas.

El término 'polinucleótido NtMRP' abarca polinucleótidos en los que un polímero de nucleótidos comprende, consiste o esencialmente consiste de las secuencias descritas en SEQ ID NOs: 1, 2, 27, 28, 29 o 51. Este término también abarca una secuencia de polinucleótido con homología sustancial (es decir, similitud de secuencia) o identidad sustancial con SEQ ID NOs: 1, 2, 27, 28, 29 o 51; fragmentos de SEQ ID NOs: 1, 2, 27, 28, 29 o 51; y fragmentos de SEQ ID NOs: 1, 2, 27, 28, 29 o 51 con homología sustancial (es decir, similitud de secuencia) o identidad sustancial a la misma. La variante puede tener al menos 60%, 61 %, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la secuencia del gen NtMRP aislado – tal como el gen NtMRP3 o el gen NtMRP4. Aunque las secuencias de NtMRP de polinucleótido descritas en la presente se muestran como secuencias de ADN, las secuencias incluyen sus correspondientes secuencias de ARN, y sus secuencias de ARN o ADN complementarias (por ejemplo, completamente complementarias), incluyendo el o los complementos opuestos de las mismas y secuencias de ARN o ADN antisentido. Fragmentos ejemplares se describen en SEQ ID NOs: 3 a 23 y 30 a 50 y 53.

El término "polinucleótido de NtMRP3" se refiere a una modalidad en la que un polímero de nucleótidos comprende, consiste o esencialmente consiste en un polinucleótido denominado en la presente como SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO: 29 o SEQ ID NO: 51. El término abarca variantes de polinucleótido con homología sustancial (es decir, identidad de secuencia) o identidad de secuencia con SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO: 29 o SEQ ID NO: 51; fragmentos de SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO: 29 o SEQ ID NO: 51; y fragmentos de SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO: 29 o SEQ ID NO: 51 con homología sustancial (es decir, similitud de secuencia) o identidad sustancial a la misma. Tal como se describe en la presente, la variante puede tener al menos 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%,

96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la secuencia del gen NtMRP3 aislado. Fragmentos ejemplarizados se describen en SEQ ID NOs: 30 a 50.

El término "polinucleótido NtMRP4" se refiere a una modalidad en la que un polímero de nucleótidos comprende consiste o esencialmente consiste en un polinucleótido denominado en la presente como SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 27. El término abarca variantes de polinucleótido con homología sustancial (es decir, similitud de secuencia) o identidad sustancial con SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO: 27; fragmentos de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO: 27; y fragmentos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 27 con homología sustancial (es decir, similitud de secuencia) o identidad sustancial a la misma. La variante puede tener al menos 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la secuencia del gen NtMRP3 aislado. Se describen fragmentos ejemplarizados en SEQ ID NOs: 3 a 23 y 53.

El término "polipéptido NtMRP" se refiere a un polipéptido que comprende, consiste o esencialmente consiste en una secuencia de aminoácido que tiene homología sustancial (es decir, similitud de secuencia) o identidad sustancial con SEQ ID NOs: 24 a 26 y 52; fragmentos de SEQ ID NOs: 24 a 26 y 52; y fragmentos de SEQ ID NOs: 24 a 26 y 52 con homología sustancial (es decir, similitud de secuencia) o identidad sustancial a la misma. Los polipéptidos NtMRP incluyen fragmentos y secuencias que comprenden un grado suficiente o sustancial de identidad o similitud a SEQ ID NOs: 24 a 26 y 52 que pueden funcionar transportando metales pesados (por ejemplo, cadmio) a través de membranas celulares. Los polipéptidos NtMRP también incluyen variantes o mutantes producidos introduciendo cualquier tipo de alteración (por ejemplo, inserciones, supresiones o sustituciones de aminoácidos; cambios en los estados de glicosilación; cambios que afectan el repliegamiento o las isomerizaciones; estructuras tridimensionales o estados de auto-asociación), que puede ser manipulado deliberadamente o aislado naturalmente. Los polipéptidos NtMRP pueden estar en forma lineal o de ciclos usando métodos conocidos. La variante puede tener al menos 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia del polipéptido NtMRP4.

El término "polipéptido NtMRP3" se refiere a una modalidad en la que el polipéptido comprende, consiste o esencialmente consiste en la secuencia descrita en SEQ ID NOs: 52 o a un polipéptido que comprende, consiste o esencialmente consiste en una secuencia de aminoácido con homología sustancial (es decir, similitud de secuencia) o identidad sustancial con NOs:52; fragmentos de SEQ ID NO:52; y fragmentos de SEQ ID NO: 52 con homología sustancial (es decir, similitud de secuencia) o identidad sustancial a la misma. Los polipéptidos NtMRP3 incluyen fragmentos y secuencias que comprenden un grado suficiente o sustancial de identidad o similitud con SEQ ID NO: 52 que puede funcionar transportando metales pesados (por ejemplo, cadmio) a través de las membranas celulares. Los polipéptidos NtMRP3 también incluyen variantes o mutantes producidas introduciendo cualquier tipo de alteraciones (por ejemplo, inserciones, supresiones o sustituciones de aminoácidos; cambios en los estados de glicosilación; cambios que afectan repliegado o isomerizaciones, estructuras tridimensionales o estados

de auto-asociación), que pueden manipularse deliberadamente o aislarse naturalmente. Polipéptidos NtMRP3 pueden estar en forma lineal o de ciclo usando métodos conocidos. Tal como se describe en la presente, la variante pueden tener al menos 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con la secuencia del polipéptido NtMRP3.

El término "polipéptido de NtMRP4" se refiere a una modalidad en la que el polipéptido comprende, consiste o esencialmente consiste en la secuencia descrita en SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, o SEQ ID NO: 26 o a un polipéptido que comprende, consiste o esencialmente consiste en una secuencia de aminoácido con homología sustancial (es decir, similitud de secuencia) o identidad sustancial a SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, o SEQ ID NO: 26; fragmentos de SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, o SEQ ID NO: 26; y fragmentos de SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, o SEQ ID NO: 26 con homología sustancial (es decir, similitud de secuencia) o identidad sustancial a la misma. Los polipéptidos NtMRP4 incluyen fragmentos y secuencias que comprenden un grado suficiente o sustancial de identidad o similitud con SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, o SEQ ID NO: 26 que pueden funcionar transportando metales pesados (por ejemplo, cadmio) a través de membranas celulares. Polipéptidos NtMRP4 también incluyen variantes o mutantes producidos introduciendo cualquier tipo de alteraciones (por ejemplo, inserciones, supresiones, o sustituciones de aminoácidos; cambios en el estado de glicosilación; cambios que afectan el replegado o isomerizaciones, estructuras tridimensionales o estados de autoasociación), que pueden manipularse deliberadamente o polipéptidos de NtMRP4 aislados naturalmente pueden estar en forma lineal o en forma de ciclo usando métodos conocidos. Tal como se describe en la presente la variante puede tener al menos 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con la secuencia de polipéptido de NtMRP4.

El término 'aislado' significa una entidad que es tomada de su entorno natural, pero el término no tiene la connotación de algún grado de purificación.

'Secuencia de genes' se refiere a la secuencia de nucleótido de una molécula de polinucleótido o polinucleótido que codifica un polipéptido o un ARN biológicamente activo, y abarca la secuencia de nucleótido de una secuencia parcialmente codificante que solo codifica un fragmento de una proteína.

El término 'vector' se refiere a un vehículo de polinucleótido que comprende una combinación de componentes de polinucleótido para habilitar el transporte de polinucleótido, constructos de polinucleótido y conjugados de polinucleótido y similares. Vectores adecuados incluyen episomas capaces de replicación extra-cromosómica tales como plásmidos polinucleótidos circulares, bicatenarios; plásmidos polinucleótidos linealizados bicatenarios; y otros vectores de cualquier origen.

'Vector de expresión' se refiere a un vehículo polinucleótido que comprende una combinación de componentes de polinucleótido para habilitar la expresión de polinucleótido, constructos de polinucleótido, y conjugados de polinucleótido y similares. Vectores de expresión adecuados incluyen episomas capaces de replicación extra-cromosómica tales como plásmidos polinucleótidos circulares, bicatenarios; plásmidos

polinucleótidos linealizados bicatenarios; y otros vectores de expresión funcionalmente equivalentes de cualquier origen. Un vector de expresión comprende al menos un promotor posicionado de modo ascendente y enlazado de modo operable con un polinucleótido, constructos de polinucleótido o conjugado de polinucleótido, tal como se define abajo.

Un 'constructo' se refiere a un fragmento de polinucleótido bicatenario, recombinante, que comprende uno o varios polinucleótidos NtMRP. El constructo comprende una "hebra modelo" emparejada con bases con un "hebra sentido o codificante" complementaria. Un constructo dado puede insertarse a un vector en dos orientaciones posibles, en la misma orientación (sentido) o en la orientación opuesta (antisentido) con respecto a la orientación de un promotor posicionado dentro de un vector – tal como un vector de expresión.

El término "conjugado" se refiere a un compuesto formado por el pegado covalente ("conjugación") de un polinucleótido a una o más fracciones que no son ellas mismas polinucleótidos o monómeros ("fracciones conjugadas").

'Hebra modelo' se refiere a la hebra que comprende una secuencia que complementa aquella de la "hebra sentido o codificante" de un dúplex polinucleótido tal como un fragmento genómico NtMRP, ADNc NtMRP, o constructo NtMRP, o cualquier fragmento de polinucleótido que comprende una secuencia de polinucleótido que puede transcribirse por polimerasa de ARN. Durante la transcripción, puede trasladarse polimerasa ARN a lo largo de la hebra modelo en la dirección 3'-a-5' durante la síntesis emergente de ARN.

'Hebra sentido' se usa de modo intercambiable en la presente con el término "hebra codificante" se refiere a la hebra que comprende una secuencia que complementa aquella de la hebra modelo en un ADN dúplex. Por ejemplo, la secuencia de la hebra sentido ("secuencia sentido") para el clon genómico de NtMRP identificado es denominado como SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2. Por ejemplo, si la hebra sentido comprende una secuencia hipotética 5'-TAATCCGGT-3', luego la secuencia correspondiente sustancialmente idéntica dentro de una diana hipotética ARNm es 5'-UAAUCCGGU-3'.

'Secuencia opuesta complementaria' se refiere a la secuencia que complementa la "secuencia sentido" de interés (por ejemplo, secuencia de exón) posicionada dentro de la misma hebra, en la misma orientación con respecto a la secuencia sentido. Por ejemplo, si una hebra comprende una secuencia hipotética 5'-TAATCCGGT-3', entonces la secuencia opuesta complementaria 5'-ACCGGATTA-3' pueden estar enlazada de modo operable a la secuencia sentido, separada por una secuencia espaciadora.

'NtMRP', 'NtMRP3' o 'transcrito de ARN NtMRP4' incluyen moléculas de poliribopolinucleótido producidas dentro de una célula vegetal hospedera de interés, resultante de la transcripción del gen NtMRP3 o NtMRP4 endógeno o ADNc tal como se describe en la presente. De esta manera, este término incluye cualquier especie de ARN o variantes de ARN producidas como productos de transcripción a partir de NtMRP3 o NtMRP4 o NtMRP3 o ARN NtMRP4 incluidas aquellas especies de ARN o variantes de ARN que tienen suficiente similitud a niveles estructurales/funcionales. Por ejemplo, transcritos Nt MRP3 o ARN NtMRP3 incluyen, pero no se limitan a: (1) pre-mARNs y

mARNs producidos de la transcripción de gen NtMRP3 o NtMRP3 aislado o ANDc; (2) pre-mARNs y mARNs producidos a partir de la transcripción de cualquier gen que tiene al menos 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con la secuencia del gen NtMRP3 aislado (es decir, otros genes distintos sustancialmente idénticos al gen NtMRP3 identificado y que codifican isoformas relacionadas de transportadores ABC); y (3) pre-mARNs y mARNs producidos de la transcripción de alelos del gen NtMRP3. Los transcritos de NtMRP3 ARN incluyen variantes de ARN producidas como resultado de reacciones de splicing ARN alternativas de ARNs heteronucleares ("hnARNs") de un gen particular, variantes de mARN resultantes de tales reacciones de splicing ARN alternativas y cualesquiera variantes de ARN intermedias.

A manera de otro ejemplo, transcripciones de NtMRP4 o NtMRP4 ARN incluyen: (1) pre-mARNs y mARNs producidos de la transcripción del gen NtMRP4 o NtMRP4 aislado o cADN, tal como se describe en la presente; (2) pre-mARNs y mARNs producidos de la transcripción de genes cualesquiera que tienen al menos 60%, 61 %, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71 %, 72%, 73%, 74%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% o más de identidad de secuencia con la secuencia del gen NtMRP4 aislado (es decir, otros genes distintos sustancialmente idénticos al gen NtMRP4 identificado y que codifican isoformas relacionadas de transportadores ABC); y (3) premARNs y mARNs producidos de la transcripción de alelos del gen NtMRP o NtMRP4.

Los transcritos NtMRP y NtMRP4 ARN incluyen variantes de ARN producidas como resultado de reacciones de splicing de ARN alternativas de ARNs heteronuclear ("hnRNAs") de un gen particular, variantes de mARN resultantes de tales reacciones de splicing ARN alternativas, y variantes de ARN intermedias cualesquiera.

'Homología', 'identidad' o 'similitud' se refieren al grado de similitud de secuencia entre dos polipéptidos o entre dos moléculas de polinucleótido comparado por la alineación de secuencia. El grado de homología entre dos secuencias discretas de polinucleótidos que se están comparando es una función del número de nucleótidos idénticos, o coincidentes en posiciones comparables. El grado de similitud expresado en términos de identidad porcentual puede determinarse mediante inspección visual y cálculo matemático. De modo alternativo, la identidad porcentual de dos secuencias de polinucleótidos puede determinarse comparando información de secuencia usando el programa de computador GAP, versión 6.0 descrito por Devereux *et al.* (*Nucl. Acids Res.* 12:387, 1984) y disponible en la Universidad de Wisconsin, Grupo de computación en genética (UWGCG, por sus siglas en inglés), ClustalW, BLAST, FASTA o Smith-Waterman. Los parámetros típicos por defecto para el programa GAP incluyen: (1) una matriz de comparación unitaria (que contiene un valor de 1 para identidades y 0 para no identidades) para nucleótidos, y la matriz de comparación ponderada de Gribskov y Burgess, 15 *Nucl. Acids Res.* 14:6745, 1986, tal como se describe por Schwartz y Dayhoff, eds., Atlas de secuencia y estructura de proteína, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358, 1979; (2) una penalidad de 3.0 para cada espacio y una penalidad adicional de 0.10 para cada símbolo en cada espacio; y (3) sin penalidad para los espacios extremos. Pueden usarse diversos

programas conocidos a las personas versadas en la materia para la comparación de secuencias.

El término "upstream o ascendente" se refiere a una dirección/posición relativa respecto a un elemento de referencia a lo largo de la secuencia de polinucleótido. "Upstream" puede usarse de manera intercambiable con el "extremo 5' de un elemento de referencia."

'Enlazado de manera operable' se refiere a la unión de elementos, fragmentos o secuencias distintos de polinucleótido para producir una unidad funcional de transcripción o un vector funcional de expresión.

Un 'promotor' se refiere a un elemento/secuencia de polinucleótido, típicamente posicionados upstream y enlazados de modo operable a un fragmento de ADN bicatenario – tal como constructo de ARNi NtMRP. Por ejemplo, un promotor adecuado permite la activación de transcripción de un constructo de ARNi NtMRP alistando el complejo de transcripción, incluida la polimerasa de ARN y diversos factores, para iniciar la síntesis de ARN. Los promotores pueden derivarse enteramente de regiones próximas a un gen nativo de interés o pueden componerse de diferentes elementos derivados de diferentes promotores nativos o segmentos de ADN sintéticos.

Un 'potenciador' se refiere a una molécula de polinucleótido, o a una secuencia de polinucleótido, que puede alistar proteínas reguladoras de transcripción tales como activadores de transcripción, para potenciar la activación de transcripción incrementando la actividad del promotor. Potenciadores adecuados pueden derivarse de regiones próximas a un promotor nativo de interés (fuentes homólogas) o puede derivarse de contextos no nativos (fuentes heterólogas) y enlazados de modo operable a cualquier promotor de interés dentro de constructos de NtMRP – tales como vectores de expresión de ARNi – para potenciar la actividad o la especificidad de tejido de un promotor. Algunos potenciadores pueden operar en cualquier orientación con respecto a la orientación de una unidad de transcripción. Por ejemplo, los potenciadores pueden estar posicionados en dirección ascendente o descendente de una unidad de transcripción que comprende un promotor y un constructo de NtMRP.

Tal como se usa en la presente, el término 'planta' o 'vegetal' se refiere a cualquier planta o vegetal en cualquier etapa de su ciclo de vida o desarrollo y a sus progenies. En una modalidad, la planta es una planta de Tabaco, que se refiere a una planta perteneciente al género *Nicotiana*. En la presente se describen especies, variedades cultivadas, híbridos y variedades de la planta del tabaco.

El término 'célula vegetal' se refiere a una unidad estructural y fisiológica de un vegetal. La célula vegetal puede estar en forma de un protoplasto sin una pared celular, una célula individual aislada o una célula cultivada, o como una parte de una unidad más organizada tal como, pero no limitada a, tejido vegetal, un órgano vegetal o una planta completa.

'Material vegetal' se refiere a cualquier composición sólida, líquida o gaseosa o a una combinación de las mismas, obtenible de una planta, incluida biomasa, hojas, lámina de hoja, vena media, tallo, raíces, flores o partes de flores, frutas, polen, células, óvulos, cigotos, semillas, esquejes, secreciones, extractos, cultivos celulares o tisulares, o cualesquier partes o productos de un vegetal. En una modalidad, el material vegetal

comprende o consiste en biomasa, semillas u hojas. En otra modalidad, el material vegetal comprende o consiste de hojas.

El término "variedad" se refiere a una población de plantas que comparten características constantes que las separa de otras plantas de la misma especie. Mientras que poseen uno o más rasgos distintivos, una variedad se caracteriza además por una variación general muy pequeña entre individuos dentro de aquella variedad. Una variedad se vende comercialmente con frecuencia.

El término "línea" o "línea de reproducción" denota un grupo de plantas que se usan durante el cultivo de plantas.

Una línea es distinguible de una variedad ya que presenta una pequeña variación entre individuos para uno o más rasgos de interés, aunque puede haber cierta variación entre individuos para otros rasgos.

El término "reducir" o "reducido" se refiere a una reducción de cerca de 10% hasta cerca de 99%, o una reducción de al menos 10%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98%, al menos 99%, o al menos 100%, 200% o 300% o más de una cantidad o una actividad tal como, pero no limitada a, actividad de polipéptido, actividad de transcripción, y/o expresión de proteína.

El término "inhibir" o "inhibido" tal como se usa en la presente se refiere a una reducción desde cerca de 98% hasta cerca de 100%, o una reducción de al menos 98%, al menos 99%, pero particularmente de 100%, de una cantidad o una actividad tal como, pero no limitada a, actividad de polipéptido, actividad de transcripción, y/o expresión de proteína.

El término "incrementar" o "incrementado" se refiere a un incremento desde cerca de 10% hasta cerca de 99%, o un incremento de al menos 10%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98%, al menos 99%, o al menos 100%, 200% o 300% o más de una cantidad o una actividad, tal como, pero no limitada a, actividad de polipéptido, actividad de transcripción, y/o expresión de proteína.

El término "control" en el contexto de un planta de control o célula planta de control significa una vegetal o célula vegetal en la que la expresión o la actividad de un gen particular o proteína – tal como NtMRP – no ha sido modificado (por ejemplo, incrementado o reducido) y de esta manera puede proporcionar una comparación con un vegetal en el que la expresión o la actividad de un gen particular o proteína – tal como NtMRP – ha sido modificada. La planta de control puede comprender un vector vacío. La planta de control puede corresponder a un vegetal de tipo silvestre.

Descripción detallada

Polinucleótidos NtMRP y polipéptidos se describen en la presente incluyendo polinucleótidos y polipéptidos NtMRP3 y NtMRP4. Tal como se muestra en la Figura 6, el clon genómico NtMRP3, designado como SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO: 29 comprende: intrón 1 (SEQ ID NO:30), intrón 2 (SEQ ID NO:31), intrón 3 (SEQ ID NO:32), intrón 4

(SEQ ID NO:33), intrón 5 (SEQ ID NO:34), intrón 6 (SEQ ID NO:35), intrón 7 (SEQ ID NO:36), intrón 8 (SEQ ID NO:37), intrón 9 (SEQ ID NO:38), intrón 10 (SEQ ID NO:39), exón 1 (SEQ ID NO:40), exón 2 (SEQ ID NO:41), exón 3 (SEQ ID NO:42) exón 4 (SEQ ID NO:43), exón 5 (SEQ ID NO:44), exón 6 (SEQ ID NO:45) exón 7 (SEQ ID NO:46) exón 8 (SEQ ID NO:47), exón 9 (SEQ ID NO:48) exón 10 (SEQ ID NO:49) y exón 11 (SEQ ID NO:50).

Diversas modalidades están dirigidas a polinucleótidos aislados que representan fragmentos genómicos aislados en el locus NtMRP3, que comprende SEQ ID NO:28 o SEQ ID NO:29, fragmentos de SEQ ID NO:28 o SEQ ID NO:29, o variantes de los mismos.

Diversas modalidades están dirigidas a polinucleótidos aislados que representan secuencias de cADN del locus de NtMRP3, que comprende SEQ ID NO:51, fragmentos de SEQ ID NO:51, o variantes de los mismos.

Diversas modalidades están dirigidas a variantes aisladas de polinucleótido NtMRP variantes que comprende al menos 71 %, 72%, 73%, 74%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, y 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:28 o SEQ ID NO:29, o fragmentos de SEQ ID NO:28 o SEQ ID NO:29.

Diversas modalidades están dirigidas a polinucleótidos aislados que complementan aquella de las variantes de polinucleótido NtMRP que comprende al menos 71%, 72%, 73%, 74% 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, y 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:28 o SEQ ID NO:29 o SEQ ID NO: 51 o fragmentos de SEQ ID NO:28 o SEQ ID NO:29 o SEQ ID NO: 51.

Diversas modalidades están dirigidas a polinucleótidos aislados que pueden hibridarse específicamente, en condiciones moderadas a altamente rigurosas, a polinucleótidos que comprenden SEQ ID NO:28 o SEQ ID NO:29 o SEQ ID NO: 51, o fragmentos de SEQ ID NO:28 o SEQ ID NO:29 o SEQ ID NO: 51.

Tal como se muestra en la Figura 1, el clon genómico NtMRP4, designado como SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2 comprende: intrón 1 (SEQ ID NO:3), intrón 2 (SEQ ID NO:4), intrón 3 (SEQ ID NO:5), intrón 4 (SEQ ID NO:6), intrón 5 (SEQ ID NO:7), intrón 6 (SEQ ID NO:8), intrón 7 (SEQ ID NO:9), intrón 8 (SEQ ID NO:10), intrón 9 (SEQ ID NO:11), intrón 10 (SEQ ID NO:12), exón 1 (SEQ ID NO:13), exón 2 (SEQ ID NO:14), exón 3 (SEQ ID NO:15) exón 4 (SEQ ID NO:16), exón 5 (SEQ ID NO:17), exón 6 (SEQ ID NO:18) exón 7 (SEQ ID NO:19) exón 8 (SEQ ID NO:20), exón 9 (SEQ ID NO:21) exón 10 (SEQ ID NO:22) y exón 11 (SEQ ID NO:53) o SEQ ID No. 23.

Diversas modalidades están dirigidas a polinucleótidos aislados que representan fragmentos genómicos aislados en el locus NtMRP4, que comprende SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2, fragmentos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO:2, o variantes de los mismos.

Diversas modalidades están dirigidas a cADN aislado que comprende SEQ ID NO:27, fragmentos de SEQ ID NO:27, o variantes de los mismos.

Diversas modalidades están dirigidas a variantes asiladas de polinucleótido NtMRP que comprenden al menos 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, y 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2 o SEQ ID No. 27, o fragmentos de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2 o SEQ ID No. 27.

Diversas modalidades están dirigidas a polinucleótidos aislados que complementan variantes de polinucleótido NtMRP que comprenden al menos 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, y 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:27 o fragmentos de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:27.

Diversas modalidades están dirigidas a polinucleótidos aislados que pueden hibridar específicamente en condiciones moderadas hasta altamente rigurosas, a polinucleótidos que comprenden SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:27, o fragmentos de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:27.

Un polinucleótido tal como se describe en la presente contendrá generalmente enlaces de fosfodiéster, aunque en algunos casos están incluidos los análogos de polinucleótido que pueden tener espinas dorsales alternas que comprenden, por ejemplo, enlaces de fosforoamidato, fosforotioato, fosforoditioato, o O-metilfosforoamidita; y espinas dorsales y enlaces de polinucleótidos péptidos. Otros polinucleótidos análogos incluyen aquellos con espinas dorsales positivas; espinas dorsales no iónicas y espinas dorsales no ribosa. Modificaciones de la espina dorsal de ribosa-fosfato puede hacerse por una variedad de razones, por ejemplo, para incrementar la estabilidad y la vida media de tales moléculas en entornos fisiológicos o como sondas en un biochip. Pueden hacerse mezclas de polinucleótidos y análogos que se presentan en la naturaleza; como alternativa, pueden hacerse mezclas de diferentes análogos de polinucleótido, y pueden hacerse mezclas de polinucleótidos y análogos que se presentan en la naturaleza.

Se conoce una variedad de análogos de polinucleótido incluidos, por ejemplo, enlaces de fosforoamidato, fosforotioato, fosforoditioato, O-metilfosforoamidita y espinas dorsales y enlaces de polinucleótido péptido; Otros polinucleótidos análogos incluyen aquellos con espinas dorsales positivas, espinas dorsales no iónicas y espinas dorsales no-ribosa. Polinucleótidos que contienen uno o más azúcares carbocíclicos también están incluidos.

Otros análogos incluyen polinucleótido péptido (PNA) que son análogos de polinucleótido péptido. Estas espinas dorsales son sustancialmente no-iónicas en condiciones neutrales, en contraste con la espina dorsal de fosfodiéster altamente cargada de los polinucleótidos que se presentan en la naturaleza. Esto puede resultar en ventajas. Primero, la espina dorsal de PNA puede exhibir cinética de hibridación mejorada. PNAs tienen cambios más grandes en la temperatura de fusión (T_m) para pares de bases no coincidentes versus pares de bases perfectamente coincidentes. ADN y ARN exhiben típicamente una caída de 2-4 °C en la T_m por una no coincidencia interna. Con la espina dorsal no iónica de PNA, la caída es más cercana a 7-9 °C. Similarmente, debido a su naturaleza no iónica, la hibridación de las bases pegadas a estas espinas dorsales es relativamente insensible a la concentración de sal. Adicionalmente, PNAs pueden no estar degradados o pueden estar degradados en menos medida por enzimas celulares y de esta manera ser estables.

Entre los usos de los polinucleótidos NtMRP divulgados, y combinaciones de fragmentos de los mismos, está el uso de fragmentos como sondas en ensayos de hibridación de polinucleótido o cebadores para uso en ensayos de amplificación de polinucleótido o el uso de fragmentos en el desarrollo de diversos constructos de polinucleótido – tales como moléculas de ARNi. Tales fragmentos comprenden generalmente al menos cerca de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 o más nucleótidos contiguos de una secuencia de ADN. En otras modalidades, un fragmento de ADN comprende al menos cerca de 10, 15, 20, 30, 40, 50 o 60 o más nucleótidos contiguos de una Secuencia de ADN. Así, en otro aspecto, también se proporciona un método para detectar polinucleótidos NtMRP que comprende el uso de las sondas y/o los cebadores aquí.

Los parámetros básicos que afectan la escogencia de condiciones de hibridación y guía para diseñar condiciones adecuadas se describen por Sambrook, J., E. F. Fritsch, y T. Maniatis (1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Clonación molecular: un manual de laboratorio), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.).

Usando el conocimiento del código genético en combinación con las secuencias de aminoácido descritas arriba, pueden prepararse conjuntos de oligonucleótidos degenerados. Tales oligonucleótidos son útiles como cebadores, por ejemplo, en reacciones en cadena de polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), por lo cual se aíslan y amplifican fragmentos de polinucleótido. En ciertas modalidades, pueden usarse cebadores degenerados como sondas para librerías genéticas no humanas. Tales librerías incluirían, pero sin limitarse a, librerías de cADN, librerías genómicas e incluso EST (por etiqueta de secuencia de expresión) electrónica o librerías de ADN. Secuencias homólogas identificadas por este método se usarían luego como sondas para identificar homólogos no humanos de las secuencias de NtMRP identificadas aquí.

También son de uso potencial los polinucleótidos y oligonucleótidos (por ejemplo, cebadores o sondas) que hibridan en condiciones de rigurosidad reducida, condiciones de modo típico moderadamente rigurosas y condiciones comúnmente altamente rigurosas, a un polinucleótido NtMRP descrito en la presente. Los parámetros básicos que afectan la escogencia de condiciones de hibridación y la guía para diseñar condiciones adecuadas se describen en Sambrook, J., E. F. Fritsch, y T. Maniatis (1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.) y pueden determinarse fácilmente por aquellos que tienen habilidades ordinarias en la materia con base en, por ejemplo, la longitud o composición de base del polinucleótido.

Una manera de lograr condiciones moderadamente rigurosas involucra el uso de una solución de prelavado que contiene 5x citrato de sodio estándar, 0.5% de sulfato dodecilo de sodio, ácido etilendiaminatetraacético de 1.0 mM (pH 8.0), búfer de hibridación de aproximadamente 50% de formamida, 6x citrato de sodio estándar y una temperatura de hibridación de aproximadamente 55 °C (u otras soluciones de hibridación similares, tales como una que contiene cerca de 50% de formamida, con una temperatura de hibridación de cerca de 42 °C), y condiciones de lavado de aproximadamente 60 °C, en 0.5x citrato de sodio estándar, 0.1 % de sulfato dodecil sodio. Por lo general, las condiciones altamente rigurosas se definen como condiciones de hibridación como arriba, pero con lavado a aproximadamente 68 °C., 0.2x citrato de sodio estándar, 0.1 % de sulfato dodecil

sodio. SSPE (1 x SSPE es cloruro de sodio de 0.15M, fosfato de sodio de 10 mM, y ácido etilendiaminotetraacético de 1.25 mM, pH 7.4) puede ser sustituido por citrato de sodio estándar (1 x citrato de sodio estándar es cloruro de sodio de 0.15M y citrato de sodio de 15 mM) en los búferes de hibridación y de lavado se realizan lavados por 15 minutos después de que se ha completado la hibridación. Debe entenderse que la temperatura de lavado y la concentración de sal de lavado puede ajustarse como sea necesario para lograr un grado deseado de rigurosidad aplicando los principios básicos que rigen las reacciones de hibridación y la estabilidad dúplex, tal como es conocido por aquellos versados en la materia y descrito más abajo {véase, por ejemplo, Sambrook, J., E. F. Fritsch, y T. Maniatis (1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.). Al hibridar un polinucleótido hasta un polinucleótido diana de secuencia desconocida, la longitud de híbrido asume la del polinucleótido hibridante. Cuando se hibridan polinucleótidos de secuencia conocida, la longitud de híbrido puede determinarse alineando las secuencias de los polinucleótidos e identificando la región o las regiones de complementariedad de secuencia óptima. La temperatura de hibridación para híbridos que anticipan ser no menores a 50 pares de bases debe ser de 5 a 10°C menos que la temperatura de fusión (T_m) del híbrido, donde T_m se determina de acuerdo con las siguientes ecuaciones. Para híbridos menores a 18 pares de bases en longitud, $T_m(^{\circ}\text{C})=2(\text{número de A+T bases})+4(\text{número de G+C bases})$. Para híbridos por encima de 18 pares de bases en longitud, $T_m(^{\circ}\text{C})=81.5+16.6(\log_{10}[\text{Na}^{+}])+0.41(\% \text{ G+C})-(600/\text{N})$, donde N es el número de bases en el híbrido, y $[\text{Na}^{+}]$ es la concentración de iones de sodio en el búfer de hibridación ($[\text{Na}^{+}]$ para 1x citrato de sodio estándar = 0.165M). Típicamente cada polinucleótido hibridante de este tipo tiene una longitud que es al menos 25% (comúnmente al menos 50%, 60%, o 70%, y más comúnmente al menos 80%) de la longitud de un polinucleótido hasta el cual hibrida, y tiene al menos 60% de identidad de secuencia (por ejemplo, al menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97.5%, o al menos 99%) con un polinucleótido hasta el cual hibrida.

Tal como será entendido por una persona versada en la materia, un AND lineal tiene dos orientaciones posibles: la dirección 5'-a-3' y la dirección 3'-a-5'. Por ejemplo, si una secuencia de referencia está posicionada en la dirección 5'-a-3', y si una segunda secuencia está posicionada en la dirección 5'-a-3' dentro de la misma molécula de polinucleótido/hebra, entonces la secuencia de referencia y la segunda secuencia están orientadas en la misma dirección o tienen la misma orientación.

De manera típica, una secuencia de promotor y un gen de interés bajo la regulación del promotor dado están posicionados en la misma orientación. Sin embargo, con respecto a la secuencia de referencia posicionada en la dirección 5'-a-3', si una segunda secuencia está posicionada en la dirección 3'-a-5' dentro de la misma molécula de polinucleótido/hebra, entonces la secuencia de referencia y la segunda secuencia están orientadas en una dirección anti-sentido, o tienen orientación anti-sentido. Dos secuencias que tienen orientaciones anti-sentido una con respecto a la otra pueden describirse alternativamente como que tienen la misma orientación, si la secuencia de referencia (dirección 5'-a-3') y la secuencia opuesta complementaria de la secuencia de referencia (secuencia de referencia posicionada en la 5'-a-3') están posicionadas dentro de la misma

molécula de polinucleótido /hebra. Las secuencias descritas en la presente se muestran en la dirección 5'-a-3'.

Polipéptidos NtMRP incluyen variantes producidas introduciendo cualquier tipo de alteraciones (por ejemplo, inserciones, supresiones, o substituciones de aminoácidos; cambios en los estados de glicosilación; cambios que afectan el repliegado o las isomerizaciones, estructuras tridimensionales, o estados de auto-asociación), que pueden manipularse deliberadamente o aislarse naturalmente. Polipéptidos NtMRP3 o NtMRP4 pueden estar en forma lineal o ciclizada usando métodos conocidos. Polipéptidos NtMRP4 comprenden al menos 10, al menos 20, al menos 30, o al menos 40 aminoácidos contiguos.

Diversas modalidades están dirigidas a polipéptidos NtMRP3 aislados codificados por una secuencia de polinucleótido que comprende, consiste o esencialmente consiste en SEQ ID NO:28 o SEQ ID NO:29 o SEQ ID NO:51 y fragmentos de SEQ ID NO:28 o SEQ ID NO:29 o SEQ ID NO:51, o variantes de las mismas.

Diversas modalidades están dirigidas a polipéptidos NtMRP4 aislados codificados por una secuencia de polinucleótido que comprende, consiste o esencialmente consiste en SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:27, fragmentos de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:27, o variantes de las mismas.

Diversas modalidades están dirigidas a variantes de polipéptido NtMRP aisladas que comprenden al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, y 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:27 o SEQ ID NO:28 o SEQ ID NO:29 o SEQ ID NO:51 o fragmentos de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:27 o SEQ ID NO:28 o SEQ ID NO:29 o SEQ ID NO:51.

Variantes mutantes de polipéptido de NtMRP, NtMRP3 y NtMRP4 también están comprendidas por las reivindicaciones y se divulgan en la presente como plantas mutantes, que no se presentan en la naturaleza, o transgénicas (por ejemplo, plantas de tabaco mutantes, que no se presentan en la naturaleza o transgénicas) que comprenden las variantes mutantes de polipéptido de NtMRP y/o NtMRP3 y/o NtMRP4.

El término 'que no se presenta en la naturaleza' tal como se usa en la presente describe una entidad (por ejemplo, un polinucleótido, una mutación genética, un polipéptido, una planta, una célula vegetal y material vegetal) que no es formado por la naturaleza o no existe en la naturaleza. Tales entidades que no se presentan en la naturaleza o entidades artificiales pueden ser hechas, sintetizadas, iniciadas, modificadas, intervenidas o manipuladas por métodos descritos en la presente o son conocidas en la técnica. De esta manera, a modo de ejemplo, una planta que no se presenta en la naturaleza, una célula vegetal que no se presenta en la naturaleza o un material vegetal que no se presenta en la naturaleza pueden ser hechos usando técnicas de cultivo tradicional, tales como retrocruzamiento - o por medio de tecnologías de manipulación genética - tal como ARN antisentido, ARN de interferencia, meganucleasa y similares. A manera de otro ejemplo, una planta que no se presenta en la naturaleza, una célula vegetal que no se presenta en la naturaleza o un material vegetal que no se presenta en la naturaleza pueden hacerse mediante introgresión de, o transfiriendo, una o varias mutaciones genéticas (por ejemplo,

uno o más polimorfismos) de una primera planta o célula vegetal a una segunda planta o célula vegetal (las cuales pueden ellas mismas presentarse en la naturaleza), de tal modo que la planta, la célula vegetal o el material vegetal resultantes, o la progenie de las mismas, comprenden una constitución genética (por ejemplo, un genoma, un cromosoma o un segmento de los mismos) que no se forma por la naturaleza o que no existe en la naturaleza. La planta, la célula vegetal o el material vegetal resultante son de este modo artificiales o no se presentan en la naturaleza. Por consiguiente, una planta o célula vegetal artificiales o que no se presentan en la naturaleza pueden hacerse modificando una secuencia genética en una primera planta o célula vegetal que se presenta en la naturaleza, incluso si la secuencia genética resultante se presenta naturalmente en una segunda planta o célula vegetal que comprende un antecedente genético diferente de la primera planta o célula vegetal. Las diferencias en el antecedente genético pueden detectarse mediante diferencias fenotípicas o mediante técnicas de biología molecular conocidas en el arte, tales como secuenciación de polinucleótido, presencia o ausencia de marcadores genéticos (por ejemplo, marcadores de ARN microsatélite).

Un polipéptido puede prepararse cultivando células hospederas transformadas o recombinantes en condiciones de cultivo adecuadas para expresar un polipéptido. El polipéptido expresado resultante puede entonces purificarse de tal cultivo usando proceso de purificación conocidos. La purificación del polipéptido también puede incluir una columna de afinidad que contienen agentes que se enlazan al polipéptido; una o más etapas de columna sobre tales resinas de afinidad, tales como concanavalina A-agarosa, heparina-toyopearl® o Cibacrom blue 3GA Sepharose®; una o varias etapas que involucran cromatografía de interacción hidrófuga usando tales resinas como éter de fenilo, éter de butilo o éter de propilo; o cromatografía de inmutioafinidad. De manera alterna, el polipéptido también puede ser expresado en una forma que facilite la purificación. Por ejemplo, puede ser expresado como un polipéptido de fusión, tal como aquellos de polipéptido que enlaza maltosa (MBP), glutathiona-5-transferasa (GST) o tioredoxina (TRX). Los kits para expresión y purificación de tales polipéptidos de fusión se encuentran comercialmente disponibles en New England BioLab (Beverly, Mass.), Pharmacia (Piscataway, N.J.), e InVitrogen, respectivamente. El polipéptido también puede etiquetarse con un epítipo y a continuación purificarse usando un anticuerpo específico dirigido a tal epítipo. Finalmente, pueden emplearse una o más etapas de cromatografía líquida de alto rendimiento de fase opuesta (RP-HPLC por reverse-phase high performance liquid chromatography) que emplean medios hidrófugos de RP-HPLC, por ejemplo, gel de sílice que tiene metilo colgante u otros grupos alifáticos, para seguir purificando el polipéptido. También pueden emplearse algunas o todas las etapas de purificación precedentes, en diversas combinaciones, para proporcionar un polipéptido recombinante sustancialmente homogéneo. El polipéptido purificado de esta manera está sustancialmente libre de otros polipéptidos y se define en la presente como un "polipéptido sustancialmente purificado"; tales polipéptidos purificados incluyen polipéptido NtMRP, fragmento, variante, y similares. La expresión, aislamiento y purificación de los polipéptidos y fragmentos puede llevarse a cabo mediante cualquier técnica adecuada, incluyendo, pero sin limitarse a, los métodos descritos en la presente.

También es posible utilizar una columna de afinidad tal como un anticuerpo monoclonal generado contra polipéptidos, para purificar por afinidad polipéptidos expresados. Estos

polipéptidos pueden retirarse de una columna de afinidad usando técnicas convencionales, por ejemplo, en un búfer de elución de sal alta y luego someterse a diálisis en un búfer de sal más baja para uso o cambiando el pH u otros componentes dependiendo de la matriz de afinidad utilidad, o retirarse de manera competitiva usando el sustrato que se presenta en la naturaleza de la fracción de afinidad, tal como un polipéptido derivado de la divulgación.

Un polipéptido también puede ser producido mediante síntesis química convencional. Para aquellos versados en la materia son conocidos métodos para construir los polipéptidos o los fragmentos de los mismos por medios sintéticos. Las secuencias de polipéptido construidas sintéticamente por virtud de compartir características estructurales o conformacionales primarias, secundarias o terciarias con un polipéptido nativo pueden poseer propiedades biológicas en común con éstas, incluida la actividad biológica.

Modalidades están dirigidas a composiciones y métodos para producir plantas mutantes, que no se presentan en la naturaleza, o transgénicas, que han sido modificadas para reducir o impedir el transporte de metal pesado (cadmio, por ejemplo) a la lámina de la hoja mediante reducción de los niveles de expresión de polinucleótido NtMRP o mediante la reducción de la actividad de la proteína codificada por el mismo. El nivel de estado invariable de transcritos de ARN NtMRP pueden ser disminuidos en comparación con un planta de control. En consecuencia, el números de transportadores activos de NtMRP disponibles para transportar metales pesados (cadmio, por ejemplo) a través de membranas celulares puede disminuirse de tal modo que también disminuya el nivel de cadmio en el vegetal.

La reducción en la expresión de polinucleótido NtMRP puede ser desde cerca de 5 % hasta cerca de 100 %, o una reducción de al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, o de hasta 100 %, lo cual incluye una reducción en la actividad de transcripción o expresión de la proteína.

La reducción en la actividad de la proteína NtMRP puede ser desde cerca de 5 % hasta cerca de 100 %, o una reducción de al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, o de hasta 100 %.

La inhibición se refiere a una reducción de cerca de 98 % hasta cerca de 100 %, o una reducción de al menos 98 %, al menos 99 %, pero particularmente de 100 %.

Los polinucleótidos y constructos recombinantes descritos aquí pueden usarse para modular (por ejemplo, reducir o inhibir) la expresión de un polipéptido NtMRP en una especie vegetal de interés. Un número de métodos a base de polinucleótido, incluido ARN antisentido, escisión de ARN dirigido por ribozima, silenciamiento de gen post-transcripcional (PTGS), por ejemplo, interferencia de ARN (iARN), y silenciamiento de gen transcripcional (TGS) son conocidos para inhibir la expresión de gen en vegetales.

Polinucleótidos adecuados incluyen polinucleótidos de longitud total que codifican polipéptidos NtMRP o fragmentos de tales polinucleótidos de longitud plena. En algunas

modalidades puede usarse un complemento del polinucleótido de longitud plena o un fragmento del mismo. De manera típica, un fragmento es de al menos 10 nucleótidos contiguos, por ejemplo de al menos 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 30, 35, 40, 50, 80, 100, 200, 500 nucleótidos contiguos o más. Generalmente puede usarse una homología superior para compensar por el uso de una secuencia más corta.

De esta manera las composiciones que pueden modular (por ejemplo, reducir o inhibir) la expresión o la actividad de NtMRP incluyen, pero no están limitadas a, polinucleótidos de secuencia específica que pueden interferir con la transcripción de uno o varios genes NtMRP endógenos; los polinucleótidos de secuencia específica que pueden interferir con la translación de transcritos de ARN NtMRP (por ejemplo, ARNs bicatenarios, siARNs, ribozimas); polipéptidos de secuencia específica que pueden interferir con la estabilidad de proteínas NtMRP; polinucleótidos de secuencia específica que pueden interferir con la actividad enzimática de proteína NtMRP o la actividad enlazante de proteína NtMRP con respecto a sustratos o proteínas reguladoras; anticuerpos que exhiben especificidad por proteína NtMRP; compuestos de molécula pequeña que pueden interferir con la estabilidad de proteína NtMRP o la actividad enzimática de proteína NtMRP o la actividad enlazante de proteína NtMRP; proteínas de dedos de cinc que enlazan polinucleótido NtMRP; y meganucleasas que tienen actividad hacia polinucleótido NtMRP.

La tecnología antisentido es un método bien conocido que puede usarse para modular (por ejemplo, reducir o inhibir) la expresión de un polipéptido NtMRP. Un polinucleótido de un gen que va a reprimirse es clonado y enlazado de manera operable a una región reguladora y una secuencia de terminación de transcripción de modo que la hebra antisentido de ARN sea transcrita. El constructo recombinante se transforma entonces en plantas, tal como las descritas en la presente, y se produce la hebra antisentido de ARN. El polinucleótido no necesita ser toda la secuencia del gen que va a reprimirse, pero típicamente será sustancialmente complementario a al menos una porción de la hebra sentido del gen que va a reprimirse.

Un polinucleótido puede transcribirse en una ribozima, o ARN catalítico, que afecta la expresión de un ARNm. Las ribozimas pueden diseñarse para emparejarse específicamente con virtualmente cualquier ARN diana y escindir la espina dorsal de fosfodiéster en una locación específica, desactivando funcionalmente de esta manera el ARN diana. Los polinucleótidos heterólogos pueden codificar ribozimas diseñadas para escindir transcritos particulares de ARNm, evitando de esta manera la expresión de un polipéptido. Las ribozimas con cabeza de martillo son útiles para destruir ARNms particulares, aunque pueden usarse diversas ribozimas que escinden ARNm en secuencias de reconocimiento específicas en sitio. Las ribozimas con cabeza de martillo escinden ARNms en locaciones dictadas por regiones de flancos que forman pares de bases complementarias con el ARN diana. El único requisito es que el ARN diana contiene una secuencia de nucleótido 5'-UG-3'. La construcción y producción de ribozimas son conocidas en el arte. Las secuencias de ribozima cabeza de martillo pueden incrustarse en un ARN estable tal como un ARN de transferencia (ARNt) para incrementar la eficiencia de escisión *in vivo*.

Por ejemplo, un constructo puede prepararse de modo que incluya una secuencia que se transcriba a un ARN que pueda hibridarse, por ejemplo, un ARN bicatenario que tiene una estructura tallo-bucle. En algunas modalidades, una hebra de la porción de tallo de un ARN bicatenario comprende una secuencia que es similar o idéntica a la secuencia codificante sentido o un fragmento de la misma de un polinucleótido NtMRP, y que tiene una longitud de alrededor de 10 nucleótidos hasta alrededor de 2,500 nucleótidos contiguos. La longitud de la secuencia que es similar o idéntica a la secuencia codificante de sentido puede ser de 10 nucleótidos contiguos a 500 nucleótidos contiguos, desde 15 nucleótidos contiguos a 300 nucleótidos contiguos, desde 20 nucleótidos contiguos a 100 nucleótidos contiguos, o desde 25 nucleótidos contiguos a 100 nucleótidos contiguos. La otra hebra de la porción de tallo de un ARN bicatenario comprende una secuencia que es similar o idéntica a la hebra antisentido o a un fragmento de la misma de la secuencia codificante del polinucleótido NtMRP, y puede tener una longitud que es más corta, la misma o más larga que la longitud correspondiente de la secuencia sentido. En algunos casos una hebra de la porción de tallo de un ARN bicatenario comprende una secuencia que es similar o idéntica a la región no traducida 3' o 5', o un fragmento de la misma, de un ARNm que codifica un polipéptido NtMRP, y la otra hebra de la porción de tallo del ARN bicatenario comprende una secuencia que es similar o idéntica a la secuencia que es complementario a la región no traducida 3' o 5', respectivamente, o un fragmento de la misma, del ARNm que codifica el NtMRP. En otras modalidades, una hebra de la porción de tallo de un ARN bicatenario comprende una secuencia que es similar o idéntica a la secuencia de un intrón, o un fragmento de la misma, en el pre-ARNm que codifica un polipéptido NtMRP, y la otra hebra de la porción de tallo comprende una secuencia que es similar o idéntica a la secuencia que es complementaria a la secuencia del intrón, o a un fragmento de la misma, en el pre-ARNm.

La porción de bucle de un ARN bicatenario puede ser de alrededor de 3 nucleótidos hasta alrededor de 5,000 nucleótidos – tal como desde alrededor de 15 nucleótidos hasta alrededor de 1000 nucleótidos, desde alrededor de 20 nucleótidos hasta alrededor de 500 nucleótidos, desde alrededor de 25 nucleótidos hasta alrededor de 250 nucleótidos. La porción de bucle del ARN puede incluir un intrón o un fragmento del mismo. Un ARN bicatenario puede tener cero, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más estructuras de tallo-bucle.

Un constructo que incluye una secuencia que está enlazada de modo operable a una región reguladora o una secuencia de terminación de transcripción, y que se transcribe a un ARN que puede formar un ARN bicatenario, puede transformarse en plantas tal como se describe en la presente. Los métodos para usar iARN para inhibir la expresión de un gen son conocidos por aquellos versados en la materia.

Los constructos que comprenden regiones reguladoras enlazadas de modo operable a las moléculas de polinucleótido en orientación sentido también pueden usarse para inhibir la expresión de un gen. El producto de transcripción puede ser similar o idéntico a la secuencia codificante sentido, o a un fragmento de la misma, de un polipéptido NtMRP. El producto de transcripción también puede ser no poliadenilado, carecer de una estructura de cubierta 5', o contener un intrón incapaz de empalmarse. Los métodos de inhibición de

la expresión de gen usando ADNc de longitud plena, así como una secuencia parcial de ADNc son conocidos en el arte.

En algunas modalidades, se usa un constructo que comprende un polinucleótido que tiene al menos una hebra y que es un modelo tanto para secuencia de sentido como para la antisentido que son complementarias entre sí para inhibir la expresión de un gen. Las secuencias de sentido y antisentido pueden ser una parte de una molécula más grande de polinucleótido o pueden ser una parte de moléculas separadas de polinucleótido que tienen secuencias que no son complementarias. Las secuencias sentido o antisentido pueden ser una secuencia que es idéntica o complementaria a la secuencia de un ARNm, la región no traducida 3' o 5' de un ARNm o un intrón en un ARNm que codifica un polipéptido NtMRP, o un fragmento de tales secuencias. En algunas modalidades, la secuencia sentido o antisentido es idéntica o complementaria a una secuencia de la región reguladora que impulsa la transcripción del gen que codifica un polipéptido NtMRP. En cada caso, la secuencia sentido es la secuencia que es complementaria a la secuencia antisentido.

Las secuencias sentido y antisentido pueden tener una longitud mayor a cerca de 10 nucleótidos (por ejemplo cerca de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, o más nucleótidos). Por ejemplo, una secuencia antisentido puede ser de una longitud de alrededor de 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 nucleótidos. Típicamente, las secuencias de sentido y antisentido tienen una longitud en el rango de cerca de 15 nucleótidos hasta cerca de 30 nucleótidos, por ejemplo, desde aproximadamente 18 nucleótidos hasta aproximadamente 28 nucleótidos, o desde aproximadamente 21 nucleótidos hasta aproximadamente 25 nucleótidos, o desde alrededor de 23 nucleótidos hasta alrededor de 25 nucleótidos.

En algunas modalidades, una secuencia antisentido es una secuencia complementaria a una secuencia ARNm, o a un fragmento de la misma, que codifica un polipéptido NtMRP descrito en la presente. La secuencia sentido complementaria a la secuencia antisentido puede ser una secuencia presente dentro del ARNm del polipéptido NtMRP. Típicamente, las secuencias sentido y antisentido se diseñan para corresponder a una secuencia de 15-30 nucleótidos de un ARNm diana de modo que el nivel de tal mRNA diana se reduzca.

En algunas modalidades, puede usarse un constructo que comprende un polinucleótido que tiene al menos una hebra que es un modelo para más de una secuencia sentido (por ejemplo, cerca de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más secuencias sentido) para inhibir la expresión de un gen. Similarmente, puede usarse un constructo que comprende un polinucleótido que tiene al menos una hebra que es un modelo para más de una secuencia antisentido (por ejemplo, cerca de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más secuencias antisentido) para inhibir la expresión de un gen. Por ejemplo, un constructo puede contener un polinucleótido que tiene al menos una hebra que es un modelo para dos secuencias sentido y dos secuencias antisentido. Las múltiples secuencias sentido pueden ser idénticas o diferentes. Las múltiples secuencias antisentido pueden ser idénticas o diferentes. Por ejemplo, un constructo puede comprender un polinucleótido que tiene una hebra que es un modelo para dos secuencias sentido idénticas y dos

secuencias antisentido idénticas que son complementarios a las dos secuencias sentido idénticas.

De modo alternativo, un polinucleótido aislado puede comprender una hebra que es un modelo para (1) dos secuencias sentido idénticas con una longitud de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 o más nucleótidos, (2) una secuencia antisentido que es complementaria a las dos secuencias sentido idénticas con una longitud de aproximadamente 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 o más nucleótidos, (3) una secuencia sentido con longitud de cerca de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 o más nucleótidos, y (4) tres secuencias antisentido idénticas que son complementarios a la secuencia sentido de aproximadamente 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 o más nucleótidos de longitud. Los constructos proporcionados en la presente pueden diseñarse para tener cualquier disposición de secuencias sentido y antisentido. Por ejemplo, dos secuencias sentido idénticas pueden ser seguidas por dos secuencias antisentido idénticas o pueden estar posicionadas entre dos secuencias antisentido idénticas.

Un polinucleótido que comprende al menos una hebra que es un modelo para una o más secuencias sentido o antisentido puede enlazarse de modo operable a una región reguladora para impulsar la transcripción de una molécula de ARN que comprende la(s) secuencia(s) sentido o antisentido. Adicionalmente, un polinucleótido de este tipo puede enlazarse de modo operable a una secuencia terminadora de transcripción, tal como el terminador del gen de nopalina sintasa (nos). En algunos casos, dos regiones reguladoras pueden dirigir la transcripción de dos transcritos: una desde la hebra de arriba y una desde la hebra de abajo. Las dos regiones reguladoras pueden ser las mismas o diferentes.

Las dos regiones reguladoras pueden ser iguales o diferentes. Los dos transcritos pueden formar moléculas de ARN bicatenario que inducen la degradación del ARN diana. En algunos casos, un polinucleótido puede estar posicionado dentro de un T-ADN o ADN de transferencia derivado de vegetal (P-DNA) tal que las secuencias de T-ADN izquierda y derecha del borde, o las secuencias izquierda y derecha del tipo borde del P-ADN están de costado o están a cada lado del polinucleótido. La secuencia de polinucleótido entre las dos regiones reguladoras pueden ser de aproximadamente 15 a aproximadamente 300 nucleótidos de longitud, de alrededor de 15 a alrededor de 200 nucleótidos de longitud, de alrededor de 15 a alrededor de 100 nucleótidos de longitud, de alrededor de 15 a alrededor de 50 nucleótidos de longitud, de alrededor de 18 a alrededor de 50 nucleótidos de longitud, desde alrededor de 18 a alrededor de 40 nucleótidos de longitud, desde alrededor de 18 a alrededor de 30 nucleótidos de longitud, o desde alrededor de 18 a alrededor de 25 nucleótidos de longitud.

Por consiguiente, composiciones que pueden modular (por ejemplo, regular hacia abajo) la expresión o la actividad de proteína NtMRP incluyen polinucleótidos de secuencia específica que pueden interferir con la transcripción de uno o varios genes endógenos NtMRP; polinucleótidos de secuencia específica que pueden interferir con la translación de transcritos de ARN NtMRP (por ejemplo, ARNs bicatenarios; ARNs_i, ribozimas);

polipéptidos de secuencia específica que pueden interferir con la estabilidad de proteínas NtMRP; polinucleótidos de secuencia específica que pueden interferir con la actividad enzimática de proteína NtMRP o la actividad enlazante de proteína NtMRP con respecto a sustratos o proteínas reguladoras; anticuerpos que exhiben especificidad por proteína NtMRP; compuestos de molécula pequeña que pueden interferir con la estabilidad de proteína NtMRP o la actividad enzimática de proteína NtMRP o la actividad enlazante de proteína NtMRP; proteínas de dedos de cinc que enlazan polinucleótido NtMRP; y meganucleasas que tienen actividad hacia polinucleótido NtMRP.

Un antagonista efectivo puede reducir el transporte de metal pesado (por ejemplo, cadmio) hacia la hoja (por ejemplo, estructuras de lámina de hoja) en al menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%.

En una modalidad, los polinucleótidos de secuencia específica que pueden interferir con la traducción de transcrito(s) de ARN NtMRP es iARN.

La interferencia de ARN ("iARN") o silenciamiento de ARN es un proceso conservado evolucionariamente por el cual pueden tenerse como propósito ARNms específicos para degradación enzimática. Un ARN bicatenario (ARN bicatenario) debe introducirse o producirse por una célula (por ejemplo, virus de ARN bicatenario, o polinucleótidos de iARN NtMRP) para iniciar la ruta de iARN. El ARN bicatenario puede convertirse en múltiples dúplex de ARNsi de 21-23 bp de longitud ("ARNsis") por RNasas que son endonucleasas específicas de ARN bicatenario ("Dicer"). Los ARNsis pueden reconocerse a continuación por complejos de silenciamiento inducidos por ARN ("RISC") que promueven el desenrollamiento de ARNsi a través de un proceso dependiente de ATP. La hebra antisentido desenrollada del ARNsi guía los RISC al ARNm direccionado (por ejemplo, variantes de ARN NtMRP) que comprenden una secuencia complementaria a la hebra anti-sentido de ARNsi. El ARNm direccionado y la hebra anti-sentido puede formar un hélice con forma de A, y el surco principal de la hélice con forma de A puede ser reconocido por los RISC activados. El ARNm diana puede escindirse por RISC activados en un solo sitio definido por el sitio enlazante del extremo 3' de la hebra de ARNsi. Los RISC activados pueden reciclarse para catalizar otro evento de escisión.

Los vectores de expresión de ARNi NtMRP que comprenden constructos de iARN que codifican polinucleótidos de iARN NtMRP exhiben actividad de interferencia de ARN reduciendo el nivel de expresión de ARNms NtMRP, pre-ARNms NtMRP, o variantes relacionadas de ARN NtMRP. Los vectores de expresión pueden comprender un promotor posicionado de modo ascendente y enlazado de modo operable a un constructo de iARN NtMRP, tal como se describe en la presente. Los vectores de expresión de iARN NtMRP pueden comprender un promotor de núcleo mínimo adecuado un constructo de iARN NtMRP de interés, una región reguladora en posición ascendente (5'), una región reguladora en posición descendente (3'), incluidas señales de terminación de transcripción y poliadenilación, y otras secuencias conocidas a las personas versadas en la materia, tales como diversos marcadores de selección.

Los polinucleótidos NtMRP pueden ser producidos en diversas formas, incluidas como estructuras bicatenarias (es decir, una molécula de ARN bicatenario que comprende una

hebra antisentido y una hebra sentido complementaria), estructuras bicatenarias de tipo horquilla ("iARNbc"), estructuras monocatenarias (es decir, una molécula ARNmc que comprende apenas una hebra antisentido). Las estructuras pueden comprender un dúplex, dúplex asimétrico, estructura secundaria tipo horquilla u horquilla asimétrica, que tiene hebras sentido y antisentido auto-complementarias. El iARN bc NtMRP puede convertirse enzimáticamente en siARNs NtMRP bicatenario. Una de las hebras del dúplex ARNsi NtMRP puede hibridar a una secuencia complementaria dentro del ARNm NtMRP diana y variantes relacionadas de ARN NtMRP. Los dúplex ARNsi/ARNm son reconocidos por RISC que pueden escindir ARNs NtMRP en múltiples sitios de una manera dependiente de la secuencia, lo que resulta en la degradación del ARNm NtMRP diana y variantes relacionadas de ARN NtMRP.

Las moléculas de ARN bicatenario pueden incluir moléculas de ARNsi juntadas a partir de un solo oligonucleótido en una estructura tipo tallo-bucle, en cuyo caso las regiones sentido y antisentido auto-complementarias de la molécula de ARNsi están enlazadas por medios de un(os) enlazante(s) a base de polinucleótido o a base de no polinucleótido, así como ARN monocatenario circular que tiene dos o más estructuras de bucle y un tallo que comprende hebras auto-complementarias sentido y antisentido, en cuyo caso el ARN circular puede procesarse o bien *in vivo* o bien *in vitro* para generar una molécula de ARNsi activa capaz de mediar iARN.

Moléculas de ARN de horquilla pequeña (ARNhp) también se divulgan en la presente, que comprenden una secuencia específica antisentido en adición a la secuencia de complemento opuesto (sentido), típicamente separada por una secuencia espaciadora o bucle. La escisión del espaciador o del bucle proporciona una molécula de ARN monocatenario y su complemento opuesto, de tal modo que puedan hibridar para formar una molécula de ARN bicatenario (opcionalmente con etapas de procesamiento adicionales que pueden resultar en adición o retiro de uno, dos, tres o más nucleótidos del extremo 3' o del extremo 5' de cualquiera de las dos hebras o de ambas). El espaciador puede ser de longitud suficiente para permitir que las secuencias antisentido y sentido hibriden y formen una estructura bicatenaria (o tallo) antes de la escisión del espaciador (y, opcionalmente, etapas subsiguientes de procesamiento que pueden resultar en adición o retiro de uno, dos, tres o más nucleótidos del extremo 3' o del extremo 5' de cualquiera de las dos hebras o de ambas). La secuencia espaciadora es típicamente una secuencia de nucleótido no relacionado que se sitúa entre dos regiones complementarias de secuencia de nucleótido que al hibridar a un polinucleótido bicatenario, comprenden un ARNhp. La secuencia espaciadora generalmente comprende entre cerca de 3 y cerca de 100 nucleótidos.

Cualquier polinucleótido de ARN NtMRP de interés puede ser producido seleccionando una composición de secuencia adecuada, tamaño de bucle y longitud de tallo para producir el dúplex de horquilla NtMRP. Un rango adecuado para diseñar longitudes de tallo de un dúplex de horquilla incluye longitudes de tallo de al menos aproximadamente 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleótidos – tales como alrededor de 14-30 nucleótidos, alrededor de 30-50 nucleótidos, alrededor de 50-100 nucleótidos, alrededor de 100-150 nucleótidos, alrededor de 150-200 nucleótidos, alrededor de 200-300 nucleótidos, alrededor de 300-400 nucleótidos, alrededor de 400-500 nucleótidos,

alrededor de 500-600 nucleótidos, y alrededor de 600-700 nucleótidos. Un rango adecuado para diseñar longitudes de bucle de un dúplex de horquilla incluye longitudes de horquilla de alrededor de 4-25 nucleótidos, alrededor de 25-50 nucleótidos, o más largo si la longitud de tallo del dúplex de horquilla de pelo es sustancial. En ciertas modalidades, una molécula de ARN bicatenario o ARNmc es de entre alrededor de 15 y alrededor de 40 nucleótidos de longitud. En otra modalidad, La molécula de ARNsi es una molécula de ARN bicatenario o ARNmc de entre alrededor de 15 y alrededor de 35 nucleótidos de longitud. En otra modalidad, la molécula de ARNsi es una molécula de ARN bicatenario o de ARNmc de entre alrededor de 17 y alrededor de 30 nucleótidos de longitud. En otra modalidad, la molécula de ARNsi es un ARN bicatenario o una molécula de ARNmc de entre alrededor de 19 y alrededor de 25 nucleótidos de longitud. En otra modalidad la molécula de ARNsi es un ARN bicatenario o una molécula de ARNmc de entre alrededor de 21 a alrededor de 23 nucleótidos de longitud. En ciertas modalidades, las estructuras de horquilla con regiones de dúplex más largas que 21 nucleótidos pueden promover un silenciamiento efectivo dirigido por ARNsi, independientemente de la secuencia y longitud de bucle.

La secuencia de ARNm diana es típicamente de entre alrededor de 14 a alrededor de 50 nucleótidos de longitud. El ARNm diana puede, por lo tanto, escanearse para regiones entre alrededor de 14 y alrededor de 50 nucleótidos de longitud que cumplen preferiblemente uno o varios de los siguientes criterios para una secuencia diana: una proporción A+T/G+C de entre alrededor de 2:1 y alrededor de 1:2; un dinucleótido AA o un dinucleótido CA en el extremo 5' de la secuencia diana; una secuencia de al menos 10 nucleótidos consecutivos únicos para el ARNm diana; y sin "corridas" de más de tres nucleótidos guanina (G) consecutivos o más de tres nucleótidos citosina (C) consecutivos. Estos criterios pueden evaluarse usando diversas técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, pueden usarse programas de computador tales como BLAST para buscar bases de datos disponibles al público para determinar si la secuencia diana seleccionada es única para el ARNm diana. De manera alterna, una secuencia diana puede ser seleccionada (y una secuencia de ARNsi diseñada) usando software de computador comercialmente disponible (por ejemplo, OligoEngine.TM. (Seattle, Wash.); Dharmacon, Inc. (Lafayette, Colo.); Target Finder de Ambion Inc. (Austin, Tex.) y la siRNA Design Tool de QIAGEN, Inc. (Valencia, Calif.).

En una modalidad, las secuencias de ARNm diana son seleccionadas para estar entre alrededor de 14 y alrededor de 30 nucleótidos de longitud que cumplan uno o más de los criterios de arriba. En otra modalidad, las secuencias diana son seleccionadas que estén entre alrededor de 16 y alrededor de 30 nucleótidos de longitud que cumplan uno o más de los criterios de arriba. En otra modalidad, las secuencias diana son seleccionadas que estén entre alrededor de 19 y alrededor de 30 nucleótidos de longitud que cumplan uno o más de los criterios de arriba. En otra modalidad, las secuencias diana son seleccionadas que estén entre alrededor de 19 y alrededor de 25 nucleótidos de longitud que cumplan uno o más de los criterios de arriba.

En una modalidad ejemplar, las moléculas de ARNsi comprenden una secuencia específica antisentido que es complementaria a al menos 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19,

20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, o más nucleótidos contiguos de cualquiera de las secuencias como se describen en SEQ ID NOs:1-23.

La secuencia específica antisentido comprendida por la molécula de ARNsi puede ser idéntica o sustancialmente idéntica al complemento de la secuencia diana. En una modalidad, la secuencia específica antisentido comprendida por la molécula de ARNsi es al menos de alrededor de 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica al complemento de la secuencia de ARNm diana. Los métodos de determinación de la identidad de secuencia son conocidos en la técnica y pueden determinarse, por ejemplo, usando el programa BLASTN del grupo de computación de la Universidad de Wisconsin (GCG) o proporcionado en el sitio de internet NCBI.

La secuencia específica antisentido de las moléculas de ARNsi descritas en la presente pueden exhibir variabilidad diferenciando (por ejemplo, mediante sustitución de nucleótido, incluyendo transición o transversión) en uno, dos, tres, cuatro o más nucleótidos de la secuencia de ARNm diana. Cuando tales sustituciones de nucleótido se presentan en la hebra antisentido de una molécula de ARN bicatenario, el nucleótido complementario en la hebra sentido, con el cual el nucleótido sustituto formaría típicamente emparejamiento de base de enlace de hidrógeno, puede estar sustituido o no estar sustituido de modo correspondiente. También se contemplan moléculas de ARN en las cuales ocurre una o más sustituciones de nucleótido en la secuencia sentido, pero no en la hebra antisentido. Cuando la secuencia antisentido de una molécula de ARNsi comprende una o más discordancias entre la secuencia de nucleótido del ARNsi y la secuencia de nucleótido diana, tal como se describe arriba, las discordancias pueden encontrarse en el terminal 3', el terminal 5' o en la porción central de la secuencia antisentido.

En otra modalidad, las moléculas de ARNsi comprenden una secuencia específica antisentido que es capaz de hibridar selectivamente en condiciones rigurosas a una porción de gen diana de ocurrencia natural o ARNm diana. Las condiciones rigurosas adecuadas incluyen, por ejemplo, hibridación de acuerdo con procedimientos de hibridación convencionales y condiciones de lavado de 1-3 veces. Citrato de sodio estándar, 0.1-1% de sulfato dodecilo de sodio, 50-70 °C, con un cambio de solución de lavado después de alrededor de 5-30 minutos. Como es conocido por aquellos versados en la materia, pueden lograrse variaciones en la rigurosidad de las condiciones de hibridación modificando el tiempo, la temperatura o la concentración de las soluciones usadas para las etapas de la hibridación y de lavado. Las condiciones adecuadas también pueden depender en parte de las secuencias particulares de nucleótido usadas, por ejemplo la secuencia del ARNm o gene diana.

Las moléculas de iARN que tienen una estructura dúplex o bicatenaria, por ejemplo ARN bicatenario o ARN_{ph}, pueden tener extremos despuntados o pueden tener colgantes 3' o 5'. Tal como se usa en la presenta, "colgante" se refiere al nucleótido o nucleótidos no emparejados que sobresalen de una estructura dúplex cuando un terminal 3' de una hebra de aRN se extiende más allá del terminal 5' de la otra hebra (colgante 3'), o viceversa (colgante 5'). Los nucleótidos que comprenden los colgantes pueden ser ribonucleótidos, desoxiribonucleótidos o versiones modificadas de los mismos. En una modalidad, al

menos una hebra de la molécula de iARN tiene un colgante 3' desde alrededor de 1 hasta alrededor de 6 nucleótidos de longitud. En otras modalidades, el colgante 3' es desde alrededor de 1 a alrededor de 5 nucleótidos, desde alrededor de 1 a alrededor de 3 nucleótidos y desde alrededor de 2 a alrededor de 4 nucleótidos de longitud.

Cuando la molécula de iARN comprende un colgante 3' en un extremo de la molécula, el otro extremo puede ser un extremo despuntado o tener también un colgante (5' o 3'). Cuando la molécula de iARN comprende un colgante en ambos extremos de la molécula, la longitud de los colgantes puede ser la misma o diferente. En una modalidad, la Molécula de iARN descrita en la presente comprende colgantes 3' de alrededor de 1 a alrededor de 3 nucleótidos en ambos extremos de la molécula. En otra modalidad, la molécula de iARN es un ARN bicatenario que tiene un colgante 3' de 2 nucleótidos en ambos extremos de la molécula. En una modalidad más, los nucleótidos que comprenden el colgante del iARN son dinucleótidos TI o dinucleótidos UU.

Al determinar el porcentaje de identidad de la molécula de iARN que comprende uno o más colgantes con la secuencia de ARNm diana, el o los colgantes pueden tomarse o no tomarse en cuenta. Por ejemplo, los nucleótidos de un colgante 3' y hasta 2 nucleótidos del terminal 5' o 3' de la doble hebra pueden modificarse sin pérdida significativa de actividad de la molécula de ARNs.

Las moléculas de iARN pueden comprender una o más estructuras de cubierta 5' o 3'. La molécula de iARN puede comprender una estructura de cubierta en el extremo 3' de la hebra sentido, la hebra antisentido, o ambas hebras sentido y antisentido; o en el extremo 5' de la hebra sentido, la hebra antisentido, o ambas hebras sentido y antisentido de la molécula de iARN. De manera alternativa, la molécula de iARN puede comprender una estructura de cubierta en ambos extremos 3' y 5' de la molécula de iARN. El término "estructura de cubierta" se refiere a una modificación química en cualquier terminal de un oligonucleótido (véase, por ejemplo, la patente estadounidense No. 5,998,203), que protege la molécula de degradación de exonucleasa, y también puede facilitar la entrega o la localización dentro de una célula.

Otra modificación aplicable a la molécula de iARNs es el enlazamiento químico a la molécula de iARN de una o más fracciones o conjugados que aumentan la actividad, distribución celular, absorción celular, biodisponibilidad o estabilidad de la molécula de iARN. Los polinucleótidos pueden sintetizarse o modificarse mediante métodos bien establecidos en la técnica. Las modificaciones químicas pueden incluir, pero no limitarse a, modificaciones 2', introducción de bases no naturales, unión covalente a un ligando y reemplazo de enlaces de fosfato con enlaces de tiofosfato. En esta modalidad, la integridad de la estructura dúplex se fortalece en al menos uno, y típicamente dos, enlaces químicos. El enlazamiento químico por cualquiera de una variedad de técnicas bien conocidas, por ejemplo introduciendo enlaces covalentes, iónicos o de hidrógeno; interacciones hidrófugas, interacciones de van der Waals o de apilamiento; por medio de una coordinación con ion de metal, o a través del uso de análogos de purina.

En una modalidad más, los nucleótidos en una de las dos, o en ambas, hebras individuales pueden ser modificados para impedir o inhibir la activación de enzimas celulares tales como, por ejemplo, sin limitación, ciertas nucleasas. Las técnicas para

inhibir la activación de enzimas celulares son conocidas en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, modificaciones 2'-amino, modificaciones 2'-flúor, modificaciones 2'-alquilo, modificaciones de espina dorsal no cargada, modificaciones de morfolina, modificaciones de 2'-O-metilo y fosforoamidato. Así, al menos un grupo 2'-hidroxilo de los nucleótidos en un ARN bicatenario se reemplaza por un grupo químico. También, al menos un nucleótido puede modificarse para formar un nucleótido cerrado. Un tal nucleótido cerrado contiene un Puente de metileno o de etileno que conecta el 2'-oxígeno de ribosa con el 4'-carbono de ribosa. La introducción de un nucleótido cerrado a un oligonucleótido mejora la afinidad por secuencias complementarias e incrementa la temperatura de fusión en varios grados.

Los ligandos pueden conjugarse a una molécula de iARN, por ejemplo, para aumentar su absorción molecular. En cierta modalidad, un ligando hidrófugo es conjugado a la molécula para facilitar permeación directa de la membrana celular. Estos enfoques han sido usados para facilitar la permeación celular de los oligonucleótidos antisentido. En ciertos casos, la conjugación de un ligando catiónico a oligonucleótidos resulta con frecuencia en Resistencia mejorada a las nucleasas. Ejemplos representativos de ligandos catiónicos son propilamonio y dimetilpropilamonio. Los oligonucleótidos antisentido pueden retener su alta afinidad enlazante a ARNm cuando el ligando catiónico se dispersa por todo el oligonucleótido.

Las moléculas y nucleótidos descritos en la presente pueden prepararse usando la técnica bien conocida de síntesis de fase sólida. Pueden emplearse de modo adicional o alternativo cualesquiera otros medios conocidos en la técnica para tal síntesis.

Diversas modalidades están dirigidas a vectores de expresión de NtMRP (por ejemplo, vectores de expresión de NtMRP3) que comprenden polinucleótido NtMRP o constructos de iARN NtMRP que comprenden uno o varios: SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 51, intrón 1 (SEQ ID NO:30), intrón 2 (SEQ ID NO:31), intrón 3 (SEQ ID NO:32), intrón 4 (SEQ ID NO:33), intrón 5 (SEQ ID NO:34), intrón 6 (SEQ ID NO:35), intrón 7 (SEQ ID NO:36), intrón 8 (SEQ ID NO:37), intrón 9 (SEQ ID NO:38), intrón 10 (SEQ ID NO:39), exón 1 (SEQ ID NO:40), exón 2 (SEQ ID NO:41), exón 3 (SEQ ID NO:42) exón 4 (SEQ ID NO:43), exón 5 (SEQ ID NO:44), exón 6 (SEQ ID NO:45) exón 7 (SEQ ID NO:46) exón 8 (SEQ ID NO:47), exón 9 (SEQ ID NO:48) exón 10 (SEQ ID NO:49) o exón 11 (SEQ ID NO:50) y fragmentos de las mismas, y variantes de las mismas. Tal como se describe en la presente, la referencia a las secuencias específicas también incluye el complemento o el complemento opuesto de las mismas.

Diversas modalidades están dirigidas a vectores de expresión de NtMRP (por ejemplo, vector de expresión de NtMRP4) que comprende polinucleótido NtMRP o constructos de iARN NtMRP que comprenden una o más de: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:27, intrón 1 (SEQ ID NO:3), intrón 2 (SEQ ID NO:4), intrón 3 (SEQ ID NO:5), intrón 4 (SEQ ID NO:6), intrón 5 (SEQ ID NO:7), intrón 6 (SEQ ID NO:8), intrón 7 (SEQ ID NO:9), intrón 8 (SEQ ID NO:10), intrón 9 (SEQ ID NO:11), intrón 10 (SEQ ID NO:12), exón 1 (SEQ ID NO:13), exón 2 (SEQ ID NO:14), exón 3 (SEQ ID NO:15) exón 4 (SEQ ID NO:16), exón 5 (SEQ ID NO:17), exón 6 (SEQ ID NO:18) exón 7 (SEQ ID NO:19) exón 8 (SEQ ID NO:20), exón 9 (SEQ ID NO:21) exón 10 (SEQ ID NO:22), exón 11 (SEQ ID NO:53) o SEQ ID No. 23 y fragmentos de las mismas, y variantes de las mismas. Tal

como se describe en la presente, la referencia a las secuencias específicas también incluye el complemento o el complemento opuesto de las mismas.

Diversas modalidades están dirigidas a vectores de expresión que comprenden: uno o varios polinucleótido(s) NtMRP o constructor de iARN NtMRP (por ejemplo, polinucleótido NtMRP3 o constructor de iARN NtMRP3) que tienen al menos 71 %, 72%, 73%, 74%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, y 99% de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, intrón 1 (SEQ ID NO:30), intrón 2 (SEQ ID NO:31), intrón 3 (SEQ ID NO:32), intrón 4 (SEQ ID NO:33), intrón 5 (SEQ ID NO:34), intrón 6 (SEQ ID NO:35), intrón 7 (SEQ ID NO:36), intrón 8 (SEQ ID NO:37), intrón 9 (SEQ ID NO:38), intrón 10 (SEQ ID NO:39), exón 1 (SEQ ID NO:40), exón 2 (SEQ ID NO:41), exón 3 (SEQ ID NO:42) exón 4 (SEQ ID NO:43), exón 5 (SEQ ID NO:44), exón 6 (SEQ ID NO:45) exón 7 (SEQ ID NO:46) exón 8 (SEQ ID NO:47), exón 9 (SEQ ID NO:48), exón 10 (SEQ ID NO:49), exón 11 (SEQ ID NO:50) o SEQ ID NO: 51 y fragmentos de las mismas, y variantes de las mismas o una combinación de dos o más de las mismas.

Tal como se describe en la presente, la referencia a las secuencias específicas también incluye el complemento o el complemento opuesto de las mismas.

Diversas modalidades están dirigidas a vectores de expresión que comprenden: polinucleótido NtMRP o constructos de iARN NtMRP (por ejemplo, polinucleótido NtMRP4 o constructos de iARN NtMRP4) que tienen al menos 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, y 99% de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, intrón 1 (SEQ ID NO:3), intrón 2 (SEQ ID NO:4), intrón 3 (SEQ ID NO:5), intrón 4 (SEQ ID NO:6), intrón 5 (SEQ ID NO:7), intrón 6 (SEQ ID NO:8), intrón 7 (SEQ ID NO:9), intrón 8 (SEQ ID NO:10), intrón 9 (SEQ ID NO:11), intrón 10 (SEQ ID NO:12), exón 1 (SEQ ID NO:13), exón 2 (SEQ ID NO:14), exón 3 (SEQ ID NO:15) exón 4 (SEQ ID NO:16), exón 5 (SEQ ID NO:17), exón 6 (SEQ ID NO:18) exón 7 (SEQ ID NO:19) exón 8 (SEQ ID NO:20), exón 9 (SEQ ID NO:21) exón 10 (SEQ ID NO:21), exón 11 (SEQ ID NO:22) o SEQ ID No. 23 y fragmentos de las mismas, y variantes de las mismas o una combinación de dos o más de las mismas. Tal como se describe en la presente, la referencia a las secuencias específicas también incluyen el complemento o complemento opuesto de las mismas.

Diversas modalidades están dirigidas a vectores de expresión que comprenden: polinucleótido NtMRP o constructo de iARN NtMRP que codifican polinucleótidos de iARN NtMRP (por ejemplo, polinucleótido NtMRP3 o constructos de iARN NtMRP3 que codifican polinucleótidos de iARN NtMRP3) capaces de auto-hibridación para formar una estructura de horquilla en la cual el constructo comprende (a) una primera secuencia que tiene al menos 71 %, 72%, 73%, 74%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, y 99% de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, intrón 1 (SEQ ID NO:30), intrón 2 (SEQ ID NO:31), intrón 3 (SEQ ID NO:32), intrón 4 (SEQ ID NO:33), intrón 5 (SEQ ID NO:34), intrón 6 (SEQ ID NO:35), intrón 7 (SEQ ID NO:36), intrón 8 (SEQ ID NO:37), intrón 9 (SEQ ID NO:38), intrón 10 (SEQ ID NO:39), exón 1 (SEQ ID NO:40), exón 2 (SEQ ID NO:41), exón 3 (SEQ ID NO:42) exón 4 (SEQ ID NO:43), exón 5 (SEQ ID NO:44), exón 6 (SEQ ID

NO:45) exón 7 (SEQ ID NO:46), exón 8 (SEQ ID NO:47), exón 9 (SEQ ID NO:48), exón 10 (SEQ ID NO:49), exón 11 (SEQ ID NO:50) o SEQ ID NO:51 y fragmentos de las mismas, y variantes de las mismas o una combinación de dos o más de las mismas; (b) una segunda secuencia que codifica un elemento espaciador de aquella forma un bucle de la estructura de horquilla; y (e) una tercera secuencia que comprende una secuencia opuesta complementaria de la primera secuencia, posicionada en la misma orientación que la primera secuencia, en cuyo caso la segunda secuencia está posicionada entre la primera secuencia y la tercera secuencia, y la segunda secuencia está ligada de manera operable con la primera secuencia y con la tercera secuencia. Tal como se describe en la presente, la referencia a las secuencias específicas también incluyen el complemento o complemento opuesto de las mismas.

Diversas modalidades están dirigidas a vectores de expresión que comprenden: polinucleótido NtMRP o constructo de iARN NtMRP que codifica polinucleótidos de iARN NtMRP (por ejemplo, polinucleótido NtMRP4 o constructos de iARN NtMRP4 que codifican polinucleótidos de iARN NtMRP4) capaces de auto-hibridación para formar una estructura de horquilla en la cual el constructo comprende (a) una primera secuencia que tiene al menos 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, y 99% de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, intrón 1 (SEQ ID NO:3), intrón 2 (SEQ ID NO:4), intrón 3 (SEQ ID NO:5), intrón 4 (SEQ ID NO:6), intrón 5 (SEQ ID NO:7), intrón 6 (SEQ ID NO:8), intrón 7 (SEQ ID NO:9), intrón 8 (SEQ ID NO:10), intrón 9 (SEQ ID NO:11), intrón 10 (SEQ ID NO:12), exón 1 (SEQ ID NO:13), exón 2 (SEQ ID NO:14), exón 3 (SEQ ID NO:15), exón 4 (SEQ ID NO:16), exón 5 (SEQ ID NO:17), exón 6 (SEQ ID NO:18), exón 7 (SEQ ID NO:19), exón 8 (SEQ ID NO:20), exón 9 (SEQ ID NO:21), exón 10 (SEQ ID NO:22), exón 11 (SEQ ID NO:53), SEQ ID No. 23 o SEQ ID NO:51 y fragmentos de las mismas, y variantes de las mismas o una combinación de dos o más de las mismas; (b) una segunda secuencia que codifica un elemento espaciador de la que forma un bucle de la estructura de horquilla; y (e) una tercera secuencia que comprende una secuencia opuesta complementaria de la primera secuencia, posicionada en la misma orientación que la primera secuencia, en cuyo caso la segunda secuencia está posicionada entre la primera secuencia y la tercera secuencia, y la segunda secuencia está ligada de modo operable a la primera secuencia y a la tercera secuencia. Tal como se describe en la presente, la referencia a las secuencias específicas también incluyen el complemento o complemento opuesto de las mismas.

Las secuencias reveladas pueden utilizarse para construir diversos polinucleótidos NtMRP que no forman estructuras de horquilla. Por ejemplo, un ARN bicatenario NtMRP puede formarse (1) transcribiendo una primera hebra del ADNc NtMRP enlazando de modo operable a un primer promotor, y (2) transcribiendo la secuencia opuesta complementaria de la primera hebra del fragmento de ADNc NtMRP enlazando de modo operable a un segundo promotor. Cada hebra del polinucleótido NtMRP puede transcribirse a partir del mismo vector de expresión o de diferentes vectores de expresión. El dúplex de ARN NtMRP que tiene actividad de interferencia de ARN puede convertirse enzimáticamente en ARNsis para reducir los niveles de ARN NtMRP.

Diversas modalidades están dirigidas a vectores de expresión de NtMRP que comprenden polinucleótido NtMRP o constructo de iARN NtMRP que codifican polinucleótidos de iARN NtMRP (por ejemplo, vectores de expresión de NtMRP3 que comprenden polinucleótido NtMRP3 o constructos de iARN NtMRP3 que codifican polinucleótidos de iARN NtMRP3) capaces de auto-hibridación, en los que el constructo comprende (a) una primera secuencia que tiene al menos 71 %, 72%, 73%, 74%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50 y SEQ ID NO:51, y fragmentos de las mismas, y variantes de las mismas o una combinación de dos o más de las mismas; y (b) una segunda secuencia que comprende una secuencia complementaria (por ejemplo, opuesta complementaria) de la primera secuencia, posicionada en la misma orientación que la primera secuencia. Tal como se describe en la presente, la referencia a las secuencias específicas también incluyen el complemento o complemento opuesto de las mismas.

Otras modalidades están dirigidas a vectores de expresión NtMRP que comprenden polinucleótido NtMRP o constructo de iARN NtMRP que codifican polinucleótidos de iARN NtMRP (por ejemplo, vectores de expresión de NtMRP4 que comprenden polinucleótido NtMRP4 o constructos de iARN NtMRP4 que codifican polinucleótidos de iARN NtMRP4) capaces de auto-hibridación, en los cuales el constructo comprende (a) una primera secuencia que tiene al menos 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo consistente en: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:27 y SEQ ID NO: 53 y fragmentos de las mismas, y variantes de las mismas o una combinación de dos o más de las mismas; y (b) una segunda secuencia que comprende una secuencia complementaria (por ejemplo, opuesta complementaria) de la primera secuencia, posicionada en la misma orientación que la primera secuencia. Tal como se describe en la presente, la referencia a las secuencias específicas también incluyen el complemento o complemento opuesto de las mismas.

Se han proporcionado diversas composiciones y métodos para modular (por ejemplo, reducir) los niveles de expresión endógena para miembros de la familia de genes NtMRP promoviendo la co-supresión de la expresión de genes NtMRP. El fenómeno de la co-supresión ocurre como resultado de introducir múltiples copias de un transgén a un hospedero de célula vegetal. La integración de múltiples copias de un transgén puede resultar en expresión reducida del transgén y el gen endógeno direccionado. El grado de co-supresión es dependiente del grado de identidad de secuencia entre el transgén y el gen endógeno direccionado. El silenciamiento de tanto el gen endógeno como del transgén puede ocurrir mediante metilación extensiva de los sitios silenciados (es decir, el promotor endógeno y el gen endógeno de interés) que pueden excluir la transcripción.

Como alternativa, en algunos casos, la co-supresión del gen endógeno y el transgén puede ocurrir mediante silenciamiento de gen después de la transcripción ("PTGS", por post transcriptional gene silencing), en el cual los transcritos pueden ser producidos pero tasas aumentadas de degradación descartan la acumulación de transcritos. El mecanismo para co-supresión mediante PTGS es pensado para parecerse a la interferencia de ARN, en la cual ARN parece ser tanto un factor importante como una diana en estos procesos, y puede mediar al menos en parte por la misma maquinaria molecular, posiblemente a través de degradación guiada por ARN de ARNms. La co-supresión de polinucleótido NtMRP puede lograrse integrando múltiples copias del ADNc NtMRP o fragmentos de las mismas, como transgenes, dentro del genoma de un vegetal de interés. La planta hospedera puede transformarse con un vector de expresión que comprende un promotor enlazado de modo operable a ADNc NtMRP o a fragmentos del mismo. Diversas modalidades están dirigidas a vectores de expresión para promover la co-supresión de genes endógenos de NtMRP que comprenden: un promotor ligado de modo operable a NtMRP (por ejemplo, ADNc NtMRP) identificado como SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 o SEQ ID NO: 51 o un fragmento de las mismas – tal como cualquiera de las SEQ ID Nos 3 a 23 o 30 a 50 - o una variante de las mismas que tiene al menos alrededor de 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad de secuencia a las mismas.

Diversas modalidades están dirigidas a métodos para modular (por ejemplo, reducir o inhibir) el nivel de expresión de polinucleótido NtMRP integrando múltiples copias de polinucleótido NtMRP (por ejemplo, ADNc NtMRP) identificado como SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID No. 28 o SEQ ID No. 29 o SEQ ID NO: 51 o un fragmento de las mismas – tal como cualquiera de las SEQ ID Nos 3 a 23 o 30 a 50 o 53 – o una variante de las mismas que tiene al menos alrededor de 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71 %, 72%, 73%, 74%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad de secuencia a las mismas dentro de un genoma vegetal, que comprende: transformar un hospedero de célula vegetal con un vector de expresión que comprende un promotor ligado de modo operable a SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID No. 28 o SEQ ID No. 29 o SEQ ID NO: 51 o un fragmento de las mismas – tal como cualquiera de las SEQ ID NOS 3 a 23 o 30 a 50 - o una variante de las mismas que tiene al menos alrededor de 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad de secuencia a las mismas.

Se han proporcionado diversas composiciones y métodos para reducir el nivel de expresión génica endógena de NtMRP inhibiendo la traducción de ARNm NtMRP. Una célula vegetal hospedera puede transformarse con un vector de expresión que comprende: un promotor ligado de modo operable al polinucleótido NtMRP o una variante o fragmento de las mismas, posicionada en orientación anti-sentido con respecto al promotor para hacer posible la expresión de polinucleótidos de ARN que tiene una secuencia complementaria a una porción de ARNm NtMRP.

Diversos vectores de expresión para inhibir la traducción de ARNm NtMRP pueden comprender: un promotor ligado de modo operable a NtMRP (por ejemplo, ADNc NtMRP) identificado como SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:27 o SEQ ID No: 28 o SEQ ID No. 29 o SEQ ID NO:51 o un fragmento de las mismas – tal como cualquiera de las

SEQ ID NOs 3 a 23 o 30 a 50 o 53 - o una variante de las mismas que tiene al menos alrededor de 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad de secuencia con las mismas en donde la secuencia está posicionada en orientación anti-sentido con respecto al promotor. Las longitudes de polinucleótidos de ARN NtMRP anti-sentido pueden variar, y pueden ser desde alrededor de 15-20 nucleótidos, alrededor de 20-30 nucleótidos, alrededor de 30-50 nucleótidos, alrededor de 50-75 nucleótidos, alrededor de 75-100 nucleótidos, alrededor de 100-150 nucleótidos, alrededor de 150-200 nucleótidos, y alrededor de 200-300 nucleótidos.

También se proporcionan métodos para obtener polinucleótidos NtMRP mutantes y polipéptidos. Cualquier vegetal de interés, incluida una célula vegetal o material vegetal, pueden modificarse genéticamente mediante diversos métodos conocidos para inducir mutagénesis, incluida mutagénesis dirigida al sitio, mutagénesis dirigida a oligonucleótidos, mutagénesis químicamente inducida, mutagénesis inducida por irradiación, mutagénesis que utiliza bases modificadas, mutagénesis que utiliza ADN dúplex espaciado, mutagénesis bicatenario de fisura, mutagénesis que utiliza cepas hospederas con deficiencia en reparación, mutagénesis mediante síntesis total de gen, transposición de ADN y otros métodos equivalentes.

De modo alternativo, los genes NtMRP pueden enfocarse para inactivación introduciendo transposones (por ejemplo, elementos IS) dentro de los genomas de vegetales de interés. Estos elementos genéticos móviles pueden introducirse mediante fertilización cruzada sexual y los mutantes de inserción pueden investigarse para pérdida en la actividad de proteína NtMRP, tal como transporte reducido de cadmio. El gen NtMRP afectado en un vegetal parental puede introducirse en otros vegetales cruzando la planta parental con plantas no sometidas a mutagénesis inducida por transposones, por ejemplo, fertilización cruzada sexual. Pueden utilizarse técnicas de cultivo cualesquiera, conocidas para personas versadas en la materia. En una modalidad, uno o más genes relacionados con NtMRP pueden desactivarse por la inserción de uno o más transposones. Las mutaciones pueden resultar en alteración homocigótica de uno o más genes NtMRP, en alteración heterocigótica de uno o más genes, o una combinación de ambas alteraciones, homocigótica y heterocigótica si se altera más de un gen NtMRP. Elementos susceptibles de transposición pueden seleccionarse de dos clases amplias, designadas como Clase I y Clase II. Elementos susceptibles de transposición adecuados de Clase I incluyen retrotransposones, retroposones, y elementos similares a SINE. Tales métodos son conocidos para las personas versadas en la materia. De modo alterno, los genes NtMRP pueden ser direccionados para desactivación introduciendo ribozimas derivadas de un número de ARNs circulares pequeños que son capaces de auto-escindir y replicarse en vegetales. Estos ARNs pueden replicar, o bien solos (ARNs viroides) o con un virus auxiliar (ARNs satélite).

Ejemplos de ARNs adecuados incluyen aquellos derivados de viroide de mancha de sol en aguacate y ARNs satélites derivados del virus mancha anular en tabaco, virus de mancha transitoria en alfalfa, virus de moteado en tabaco de terciopelo, virus de moteado en solanum nodiflorum (quelite mora), y virus de moteado en trébol subterráneo. Diversas ribozimas específicas de ARN diana son conocidas para personas versadas en la materia.

En algunas modalidades, la expresión de un polipéptido NtMRP es modulada, reducida, o inhibida por medios no transgénicos, tal como la creación de una mutación en un gen NtMRP, incluido un gen NtMRP3 y/o NtMRP4. Los métodos que introducen una mutación de manera aleatoria a una secuencia de gen pueden incluir mutagénesis química, mutagénesis de EMS y mutagénesis por radiación.

Los métodos que introducen una o varias mutaciones direccionadas dentro de una célula incluyen, pero no se limitan a, tecnología de edición de genoma, particularmente mutagénesis mediada por nucleasa de dedos de cinc, tilling (del inglés *targeting induced local lesions in genomes* o direccionamiento a lesiones locales inducidas en genomas), recombinación homóloga, mutagénesis dirigida a oligonucleótidos, y mutagénesis mediada por meganucleasa.

Algunos ejemplos de mutaciones son supresiones, inserciones y mutaciones con cambio de sentido de al menos un nucleótido, polimorfismos de nucleótidos individuales (SNPs), una repetición simple de secuencia. Después de la mutación, puede realizarse tamizaje para identificar supresiones que crean codones de detención prematura o genes NtMRP no funcionales de otra manera. El tamizaje de los mutantes puede llevarse a cabo mediante secuenciación o por el uso de una o más sondas o cebadores específicos para el gen o proteína NtMRP. También pueden crearse mutaciones específicas en los polinucleótidos NtMRP que pueden resultar en una expresión disminuida de gen NtMRP, estabilidad disminuida de ARNm NtMRP, o estabilidad disminuida de la proteína NtMRP. Tales vegetales son denominados en la presente como vegetales "que no se presentan en la naturaleza" o vegetales mutados.

Los vegetales que no se presentan en la naturaleza y mutantes pueden tener cualquier combinación de una o más mutaciones que da lugar a niveles reducidos de polipéptido NtMRP. Por ejemplo, los vegetales pueden tener una sola mutación en un solo gen NtMRP o múltiples mutaciones en un solo gen NtMRP. Por consiguiente, se divulgan los vegetales mutantes o que no se presentan en la naturaleza (por ejemplo, plantas de tabaco mutantes, que no se presentan en la naturaleza, o transgénicas, y similares, tal como se describen en la presente) que comprenden las variantes de polipéptido mutante de NtMRP, NtMRP3 y NtMRP4.

En una modalidad, se mutagenizan semillas de plantas y luego se hacen crecer en plantas mutantes de primera generación. A las plantas de primera generación se les permite auto-polinizarse se hacen crecer semillas de la planta de primera generación en plantas de segunda generación, las cuales se tamizan para mutaciones en sus sitios de NtMRP. Aunque el material vegetal mutagenizado puede tamizarse para mutaciones, una ventaja de tamizar las plantas de segunda generación es que todas las mutaciones somáticas corresponden a mutaciones germinales. Alguien versado en la material entendería que una variedad de materiales vegetales, que incluyen, pero no se limitan a, semillas, polen, tejido vegetal o células vegetales, pueden mutagenizarse a fin de crear las plantas mutadas en NtMRP. Sin embargo, el tipo de material vegetal mutagenizado puede afectarse cuando el polinucleótido vegetal es tamizado para mutaciones. Por ejemplo, cuando el polen se somete a mutagénesis antes de la polinización de una planta no mutagenizada, las semillas resultantes de aquella polinización se cultivan hasta

plantas de primera generación. Cada célula de las plantas de primera generación contendrá mutaciones creadas en el polen; así, estas plantas de primera generación pueden tamizarse luego para mutaciones de NtMRP en lugar de esperar hasta la segunda generación.

Los mutágenos que crean primariamente mutaciones de punto y supresiones, inserciones, transversiones, y/o transiciones breves, incluidos mutágenos químicos o radiación, pueden usarse para crear las mutaciones. Mutágenos incluyen, pero no se limitan a, metansulfonato de etilo (EMS), metansulfonato de metilo (MMS), N-etil-N-nitrosourea (ENU), trietilmelamina (TEM), N-metil-N-nitrosourea (MNU), procarbazona, clorambucilo, ciclofosfamida, sulfato de dietilo, monómero de acrilamida, melfalano, mostaza nitrogenada, vincristina, dimetilnitrosamina, N-metil-N'-nitro-nitrosoguanidina (MNNG), nitrosoguanidina, 2-aminopurina, 7,12 dimetilbenz(a)antraceno (DMBA), óxido de etileno, hexametilfosforo-amida, bisulfano, diepoxialcanos (diepoxioctano (DEO), diepoxibutano (BEB), y similares), 2-metoxi-6-cloro-9[3-(etil-2-cloro-til)aminopropilamino]acridina dihidrocloruro (ICR-170), y formaldehído. También han sido contempladas mutaciones espontáneas en el locus de NtMRP que pueden no haber sido causadas directamente por el mutágeno, siempre que den lugar al fenotipo deseado descrito en la presente. Agentes mutagénicos adecuados incluyen también, por ejemplo, radiación ionizante, tal como rayos X, rayos gama, irradiación con neutrones rápidos y radiación UV.

Puede usarse cualquier método de preparación de polinucleótido vegetal conocido por aquellos versados en la materia con el fin de preparar el polinucleótido vegetal para tamizaje de mutación de NtMRP.

El polinucleótido preparado a partir de plantas individuales puede combinarse opcionalmente a fin de acelerar el tamizaje para mutaciones en el gen NtMRP de toda la población de plantas que se originan del tejido vegetal mutagenizado. Una o más generaciones subsiguientes de plantas, células vegetales o material vegetal pueden tamizarse. El tamaño del grupo opcionalmente combinado depende de la sensibilidad del método de tamizaje que se haya usado. Después que se hayan combinado opcionalmente las muestras de polinucleótido, éstas pueden someterse a técnicas de amplificación específicas para polinucleótido NtMRP, tales como reacción en cadena de polimerasa (PCR por Polimerase Chain Reaction). Uno o varios cebadores o sondas cualesquiera específicas para el gen NtMRP gene o las secuencias inmediatamente adyacentes al gen NtMRP pueden utilizarse para amplificar las secuencias de NtMRP dentro de la muestra combinada de polinucleótido. Preferiblemente, los cebadores o sondas, uno o varios, se diseñan para amplificar las regiones del locus de NtMRP donde es más probable que surjan las mutaciones. Más preferiblemente, los cebadores o sondas, uno o varios, se diseñan para detectar mutaciones dentro de regiones exónicas del polinucleótido NtMRP. Adicionalmente, es preferible que los cebadores o sondas, uno o varios, impidan sitios polimórficos conocidos a fin de facilitar tamizaje para mutaciones puntuales. Para facilitar la detección de productos de amplificación, los cebadores o sondas, uno o varios, pueden etiquetarse usando cualquier método de etiquetado convencional. Uno o varios cebadores o sondas pueden diseñarse con base en las secuencias de NtMRP tal como se describe en la presente usando métodos que son bien

entendidos en la técnica. Los polimorfismos pueden identificarse por medios conocidos en la técnica.

En otro aspecto se proporciona un método de preparación de una planta mutante. El método involucra proporcionar al menos una célula de un vegetal que comprende un gen que codifica un polipéptido funcional de NtMRP. A continuación, al menos una célula de la planta es tratada en condiciones efectivas para modular la actividad del gen NtMRP. La célula vegetal mutante, al menos una, se propaga luego dentro de una planta mutante, donde la planta mutante tienen un nivel modulado de polipéptido NtMRP en comparación con aquel de una planta de control. En una modalidad de este método de hacer una planta mutante, la etapa de tratamiento incluye someter la célula, al menos una, a un agente químico de mutagénesis tal como se describe arriba y en condiciones efectivas para producir al menos una célula vegetal mutante. En otra modalidad de este método, la etapa de tratamiento incluye someter la célula, al menos una, a una fuente de radiación en condiciones efectivas para producir al menos una célula vegetal mutante. El término "planta mutante" incluye plantas mutantes en las que el genotipo se modifica en comparación con una planta de control, adecuadamente por medios distintos de ingeniería genética o modificación genética.

En ciertas modalidades, la planta mutante, la célula vegetal mutante o el material vegetal mutante pueden comprender uno o más mutaciones que se han presentado naturalmente en otra planta, célula vegetal o material vegetal y conferir un rasgo característico. Esta mutación puede incorporarse (por ejemplo, por introgresión) a otra planta, célula vegetal o material vegetal (por ejemplo, una planta, célula vegetal o material vegetal con un antecedente genético diferente a la planta a partir de la cual la mutación fue derivada) para conferir el rasgo a la misma. Así, a modo de ejemplo, una mutación que se presenta en la naturaleza en una primera planta puede introducirse dentro de una segunda planta – tal como una segunda planta con un antecedente genético diferente de la primera planta. La persona versada en la materia es capaz, por lo tanto, de buscar e identificar una planta que porta naturalmente en su genoma uno o más alelos mutantes del gen NtMRP que confieren un rasgo deseado. El o los alelos mutantes que se presentan naturalmente pueden transferirse a la segunda planta mediante diversos métodos que incluyen cultivo, retrocruzamiento e introgresión para producir líneas, variedades o híbridos que tienen una o más mutaciones en el gen NtMRP. Las plantas que muestran un atributo deseado pueden tamizarse de una combinación de plantas mutantes. Adecuadamente, la selección se lleva a cabo utilizando el conocimiento de la secuencia de nucleótidos de NtMRP tal como se describe en la presente.

Por consiguiente, es posible tamizar para un atributo genético que es indicativo de niveles modulados (por ejemplo, disminuidos) de cadmio en comparación con un control. Tal enfoque de tamizaje puede involucrar la aplicación de técnicas convencionales de amplificación y/o hibridación de polinucleótido tal como se discute en la presente. Así, un tercer aspecto se refiere a un método para identificar una planta mutante que comprende los pasos de: (a) proporcionar una muestra que comprende un polinucleótido de NtMRP de una planta; y (b) determinar la secuencia de polinucleótido del polinucleótido NtMRP, en cuyo caso una diferencia en la secuencia del polinucleótido NtMRP en comparación con el polinucleótido NtMRP de una planta de control es indicativo de que dicho vegetal es

una planta mutante de NtMRP. En otro aspecto se proporciona un método para identificar un vegetal mutante que acumula niveles modulados (por ejemplo, disminuidos) de cadmio en comparación con un planta de control que comprende los pasos de: (a) proporcionar una muestra de un vegetal que va a tamizarse; (b) determinar si dicha muestra comprende una o más mutaciones en el polinucleótido NtMRP; y (c) determinar el contenido de cadmio en al menos una parte de dicho vegetal; en cuyo caso si dicha muestra comprende una o más mutaciones en el polinucleótido NtMRP que modula (por ejemplo, disminuye) la expresión o la actividad de la proteína codificada en comparación con un planta de control y al menos una parte del vegetal tiene un contenido modulado (por ejemplo disminuido) de cadmio en comparación con un planta de control en el que la expresión o la actividad de NtMRP no ha sido modulada (por ejemplo disminuida) es indicativa de un vegetal mutante que se presenta en la naturaleza el cual acumula niveles modulados (por ejemplo disminuidos) de cadmio. En otro aspecto, se proporciona un método para preparar un vegetal mutante que acumula niveles modulados (por ejemplo, disminuidos) de cadmio en comparación con un planta de control que comprende los pasos de: (a) proporcionar una muestra de un primer vegetal; (b) determinar si dicha muestra comprende una o varias mutaciones en el polinucleótido NtMRP que resulten en niveles modulados (por ejemplo, disminuidos) de cadmio en la misma; y (c) transferir las mutaciones, una o varias, a un segundo vegetal. La(s) mutación(es) pueden transferirse al segundo vegetal usando diversos métodos que son conocidos en la técnica, tales como ingeniería genética, manipulación genética, introgresión, cultivo de plantas, retrocruzamiento y similares. En una modalidad, el primer vegetal es un vegetal que se presenta en la naturaleza. En una modalidad, el segundo vegetal tiene un antecedente genético diferente del primer vegetal. En otro aspecto se proporciona un método para preparar un vegetal mutante que acumula niveles modulados (por ejemplo disminuidos) de cadmio en comparación con una planta de control, que comprende los pasos de: (a) proporcionar una muestra de un primer vegetal; (b) determinar si dicha muestra comprende una o varias mutaciones en el polinucleótido NtMRP que resultan en niveles modulados (por ejemplo, disminuidos) de cadmio en la misma; y (c) introgresión de una o varias mutaciones del primer vegetal adentro del segundo vegetal. En una modalidad, el paso de introgresión comprende cultivo de plantas, que opcionalmente incluye retrocruzamiento y similares. En una modalidad, el primer vegetal es un vegetal que se presenta en la naturaleza. En una modalidad, el segundo vegetal tiene un antecedente genético diferente del primer vegetal. En una modalidad, el primer vegetal no es una planta de cultivo o una plante de cultivo élite). En una modalidad, el segundo vegetal es una planta de cultivo o una planta de cultivo élite). Otro aspecto se refiere a un vegetal mutante (que incluye una plante mutante de cultivo o de cultivo élite) obtenido o capaz de obtenerse por los métodos descritos en la presente. En ciertas modalidades, los vegetales mutantes pueden tener una o varias mutaciones localizadas solo en una región específica de la planta – tal como dentro de la secuencia del polinucleótido NtMRP. De acuerdo con esta modalidad, la secuencia genómica remanente de la planta mutante será la misma o sustancialmente la misma que la planta antes de la mutagénesis.

En ciertas modalidades, las plantas mutantes pueden tener una o varias mutaciones localizadas en más de una región de la planta, tal como dentro de la secuencia del polinucleótido NtMRP y en una o varias regiones más del genoma. De acuerdo con esta

modalidad, la secuencia genómica remanente de la planta mutante no será la misma o no será sustancialmente la misma que la planta antes de la mutagénesis. En ciertas modalidades, las plantas mutantes pueden no tener una o varias mutaciones en una o varias, dos o más, tres o más, cuatro o más o cinco o más exones del polinucleótido NtMRP; o pueden no tener una o varias mutaciones en una o varias, dos o más, tres o más, cuatro o más o cinco o más intrones del polinucleótido NtMRP; o pueden no tener una o varias mutaciones en un promotor del polinucleótido NtMRP; o pueden no tener una o varias mutaciones en la región no traducida 3' del polinucleótido NtMRP; o pueden no tener una o varias mutaciones en la región no traducida 5' del polinucleótido NtMRP; o pueden no tener una o varias mutaciones en la región codificante del polinucleótido NtMRP; o pueden no tener una o varias mutaciones en la región no codificante del polinucleótido NtMRP; o cualquier combinación de dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, o seis o más partes de las mismas.

En otro aspecto se proporciona un método para identificar una planta, una célula vegetal o material vegetal que comprende una mutación en un gen que codifica NtMRP, el cual comprende: (a) someter una planta, una célula vegetal o un material vegetal a mutagénesis; (b) obtener una muestra de polinucleótido de dicho vegetal, célula vegetal o material vegetal o descendientes de las mismas; y (c) determinar la secuencia de polinucleótido del gen que codifica NtMRP o una variante o un fragmento de las mismas, en cuyo caso una diferencia en dicha secuencia es indicativa de una o varias mutaciones en la misma.

Pueden usarse proteínas de dedos de cinc para modular (por ejemplo, reducir o inhibir) la expresión o la actividad de NtMRP. En diversas modalidades, se modifica una secuencia genómica de polinucleótido que comprende una parte de, o toda, la secuencia codificante de un polinucleótido NtMRP mediante mutagénesis mediada por nucleasa de dedos de cinc. Se busca la secuencia genómica de polinucleótido para un sitio único para enlazamiento de proteína de dedos de cinc. De modo alternativo, se busca la secuencia genómica de polinucleótido para dos sitios únicos para enlazamiento de proteína de dedos de cinc en cuyo caso ambos sitios están en hebras opuestas y cerca conjuntamente, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más pares de bases separadas. Por consiguiente, se proporcionan proteínas de dedos de cinc que enlazan a los polinucleótidos NtMRP. Un dominio o motivo que enlaza a ADN por dedos de cinc consiste en aproximadamente 30 aminoácidos que se pliegan en una estructura beta-beta-alfa de la cual la hélice alfa (α -hélice) se inserta en la hélice doble de ADN. Un "hélice-alfa" se refiere a un motivo en la estructura secundaria de una proteína que está enrollada o bien hacia mano derecha o bien hacia mano izquierda, en la cual el hidrógeno de cada grupo N-H de un aminoácido está enlazado al grupo C=O de un aminoácido en una posición -4 relativo al primer aminoácido. Un "barril-beta" (β -barril) tal como se usa en la presente se refiere a un motivo en la estructura secundaria de una proteína que comprende dos hebras beta (β -hebras) en el cual la primera hebra es hidrógeno enlazado a una segunda hebra para formar una estructura cerrada. Una "estructura beta-beta-alfa" tal como se usa en la presente se refiere a una estructura en una proteína que consiste en un β -barril que comprende dos β -hebras anti-paralelas y una α -hélice. El término "dominio que enlaza ADN por dedos de cinc" se refiere a un dominio de proteína que comprende

un ion de cinc y es capaz de enlazarse a una secuencia de ADN de tres pares de bases específicas. El término "dominio que enlaza AND por dedos de cinc" se refiere a un dominio que enlaza ADN por dedos de cinc que no se presentan en la célula u organismo que comprende el AND que va a modificarse.

Los aminoácidos clave con un dominio o motivo que enlaza AND por dedos de cinc que enlazan la secuencia de tres pares de bases con el ADN diana son aminoácidos -1, +1, +2, +3, +4, +5 y +6 relativos al inicio de la hélice alfa (α -hélice). Los aminoácidos en posición -1, +1, +2, +3, +4, +5 y +6 relativos al inicio de la α -hélice de un dominio o motivo que enlaza ADN por dedos de cinc puede modificarse mientras se mantiene la espina dorsal del barril beta (β -barril) para generar nuevos dominios o motivos que enlazan ADN, que enlazan una secuencia diferente de pares de bases. Tal nuevo dominio que enlaza ADN puede ser un dominio no natural que enlaza ADN por dedos de cinc. Adicionalmente al reconocimiento de la secuencia de tres pares de bases por los aminoácidos en posición -1, +1, +2, +3, +4, +5 y +6 relativo al inicio de la α -hélice, algunos de estos aminoácidos también pueden interactuar con un par de bases afuera del sitio de reconocimiento de la secuencia de tres pares de bases. Combinando dos, tres, cuatro, cinco, seis o más dominios o motivos que enlazan ADN por dedos de cinc, puede generarse una proteína de dedos de cinc que enlace específicamente a una secuencia de ADN más larga. Por ejemplo, una proteína de dedos de cinc que comprende dos dominios o motivos que enlazan ADN por dedos de cinc zinc pueden reconocer una secuencia específica de seis pares de bases y una proteína de dedos de cinc que comprende cuatro dominios o motivos que enlazan AND por dedos de cinc pueden reconocer una secuencia específica de doce pares de bases. Una proteína de dedos de cinc puede comprender dos o más dominios o motivos que enlazan ADN por dedos de cinc o dos o más dominios o motivos, que enlazan ADN por dedos de cinc, derivados de una proteína de dedos de cinc de tipo silvestre mediante truncamiento o expansión o un proceso de mutagénesis dirigida a un sitio, acoplada a un método de selección tal como, pero sin limitarse a, selección de phage display (exposición de fagos), selección bacteriana de dos híbridos o selección bacteriana de un híbrido o cualquier combinación de dominios, naturales y no naturales, que enlazan ADN por dedos de cinc. "Truncamiento", tal como se usa en este contexto, se refiere a una proteína de dedos de cinc que contiene menos que el número completo de dominios o motivos que enlazan ADN por dedos de cinc, que se encuentran en la proteína natural de dedos de cinc. "Expansión", tal como se usa dentro de este contexto se refiere a una proteína de dedos de cinc que contiene más que el número de dominios o motivos que enlazan ADN por dedos de cinc, que se encuentran en la proteína natural de dedos de cinc. En el arte se conocen técnicas para seleccionar una secuencia de polinucleótido dentro de una secuencia genómica para la proteína de dedos de cinc enlazante. En el arte se conocen métodos para el diseño de dominios de proteína de dedos de cinc que enlaza secuencias específicas de nucleótidos que son únicas para un gen diana. Se ha calculado que una secuencia que comprende 18 nucleótidos es suficiente para especificar una locación única en el genoma de organismos superiores. Típicamente, por lo tanto, los dominios de proteína de dedos de cinc contienen 6 dedos de cinc, cada uno con su hélice alfa diseñada específicamente para interacción con un triplete particular. Sin embargo, en algunos casos, puede ser deseable una secuencia diana más corta o más larga. Así, los

dominios de dedos de cinc en las proteínas pueden contener de 2 a 12 dedos, como 3 a 8 dedos, 5 a 7 dedos, o 6 dedos.

Las proteínas de dedos de cinc de uso pueden comprender al menos un polipéptido de dedo de cinc ligado por medio de un ligante, preferiblemente un ligante flexible, a al menos un segundo dominio que enlaza ADN, que opcionalmente es un segundo polipéptido de dedos de cinc. La proteína de dedos de cinc puede contener más de dos dominios que enlazan ADN, así como también uno o varios dominios de regulador. Los polipéptidos de dedos de cinc pueden someterse a ingeniería para reconocer un sitio diana seleccionado en el gen de elección.

En una modalidad, la proteína de dedos de cinc comprende un marco (o espina dorsal) derivado de una proteína de dedos de cinc que se presenta en la naturaleza. Puede usarse el marco (o espina dorsal) derivado de cualquier proteína de dedos de cinc que se presenta en la naturaleza. Puede usarse, por ejemplo, la proteína de dedos de cinc que comprende un marco (o espina dorsal) derivado de una proteína de dedos de cinc que comprende un motivo C2H2.

En otra modalidad específica, la proteína de dedos de cinc comprende un marco (o espina dorsal) derivado de una proteína de dedos de cinc que es naturalmente funcional en células vegetales. Por ejemplo, la proteína de dedos de cinc puede comprender un dedo de cinc C3H, un motivo QALGGH, un motivo dedo de cinc RING-H2, un motivo C2H2 aminoácido, un motive dedo de cinc de Arabidopsis LSD1 y un motivo dedo de cinc de dominio BBF/Dof en proteínas.

La proteína de dedos de cinc puede proporcionarse a las células vegetales por medio de cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, la proteína de dedos de cinc puede adicionarse de modo exógeno a las células vegetales y las células vegetales se mantienen en condiciones tales que la proteína de dedos de cinc se enlaza a la secuencia diana de nucleótido y regula la expresión del gen diana en la célula vegetal.

De modo alternativo, una secuencia de nucleótido que codifica la proteína de dedos de cinc puede ser expresada en las células vegetales y las células vegetales se mantienen en condiciones tales que la proteína de dedos de cinc expresada se enlaza a la secuencia diana de nucleótido y regula la expresión del gen diana en las células vegetales.

El gen de dedo de cinc puede ser expresado en una planta usando cualquier vector de expresión vegetal adecuado.

Vectores típicos útiles para la expresión de genes en plantas superiores son bien conocidos en el arte. Adicionalmente a los dominios reguladores, con frecuencia la proteína de dedos de cinc puede ser expresada como una proteína de fusión con proteína que enlaza maltosa ("MBP"), glutatión transferasa S (GST), hexahistidina, cmc, o el epítipo FLAG, para facilidad de purificación, monitoreo de expresión, o monitoreo de localización celular y subcelular.

En una modalidad, una planta mutada o que no se presenta en la naturaleza o una célula vegetal mutada o que no se presenta en la naturaleza, son producidos mediante mutagénesis mediada por nucleasa de dedos de cinc.

En una modalidad específica, una secuencia genómica de ADN que comprende una parte de o toda la secuencia codificante del polinucleótido NtMRP se modifica por mutagénesis mediada por nucleasa de dedo de cinc.

La secuencia genómica de ADN es buscada para un sitio único para enlazamiento por proteína de dedos de cinc.

De modo alternativo, la secuencia genómica de ADN es buscada para dos sitios únicos para enlazamiento por proteína de dedos de cinc, en cuyo caso ambos sitios están en hebras opuestas y se acercan para unirse. Los dos sitios diana de proteína de dedo de cinc pueden ser 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más pares de bases separados. El sitio de enlazamiento por la proteína de dedos de cinc puede estar en la secuencia codificante de la secuencia de gen NtMRP o un elemento regulador que controla la expresión del gen NtMRP, tal como, pero no limitado a, la región promotora del gen NtMRP. Particularmente, una o ambas proteínas de dedos de cinc son proteínas no naturales de dedos de cinc.

Por consiguiente, la divulgación proporciona proteínas de dedos de cinc que enlazan al polinucleótido NtMRP.

Está contemplado que un método para mutar una secuencia de gen, tal como una secuencia de AND genómica que codifica el gen NtMRP por mutagénesis mediada por nucleasa de dedo de cinc comprende opcionalmente una o varias de las siguientes etapas: (i) proporcionar al menos dos proteínas de dedo de cinc que enlazan selectivamente diferentes sitios en la secuencia de gen; (ii) construir dos constructos de expresión cada uno de los cuales codifica una nucleasa diferente de dedo de cinc que comprende una de las dos proteínas no naturales diferentes de dedos de cinc de la etapa (i) y una nucleasa, ligada de modo operable a las secuencias de control de expresión operables en una célula vegetal; (iii) introducir los dos constructos de expresión dentro de una célula vegetal en cuyo caso se producen las dos nucleasas diferentes de dedo de cinc, de tal modo que se introduce una rotura a cadena doble a la secuencia genómica de ADN en el genoma de célula vegetal, en o cerca de al menos uno de los sitios diana. La introducción de los dos constructos de expresión dentro de la célula vegetal puede efectuarse de modo simultáneo o secuencial, opcionalmente incluyendo una selección de células que comienzan el primer constructo.

Una rotura a cadena doble (DSB por double stranded break), tal como se usa en la presente, se refiere a una rotura en ambas hebras del ADN o ARN. La rotura a cadena doble puede ocurrir en la secuencia genómica de ADN en un sitio que no es mayor al intervalo entre 5 pares de bases y 1500 pares de bases, particularmente no más que el intervalo entre 5 pares de bases y 200 pares de bases, particularmente no más que el intervalo entre 5 pares de bases y 20 pares de bases retirados de uno de los sitios diana. La rotura en cadena doble puede facilitar la unión del extremo no homólogo que conduce a una mutación en la secuencia genómica de ADN en o cerca del sitio diana. "Unión de extremo no homólogo (NHEJ por non homologous end joining)" tal como se usa en la presente se refiere a un mecanismo de reparación que repara una rotura en cadena doble mediante ligazón directa sin la necesidad de un modelo homólogo, y de esta manera puede ser mutagénico en relación con la secuencia antes de que ocurra la rotura a la cadena doble.

El método puede comprender además la etapa de (iv) introducir dentro de la célula vegetal un polinucleótido que comprende al menos una primera región de homología con una secuencia ascendente de nucleótido de la rotura en cadena doble y una segunda región de homología con una secuencia descendente de nucleótido de la rotura en cadena doble. El polinucleótido puede comprender una secuencia de nucleótido que corresponda a la secuencia del polinucleótido NtMRP que contiene una supresión o una inserción de la secuencia heteróloga de nucleótidos. El polinucleótido puede así facilitar la recombinación homóloga en o cerca del sitio diana lo que da lugar a la inserción de una secuencia heteróloga dentro del genoma o supresión de una secuencia genómica de ADN del genoma. La secuencia genómica resultante de ADN en la célula vegetal puede comprender una mutación que afecta la actividad de enzima de una proteína de NtMRP mutante expresada, un codón de detención de traducción temprana, o un motivo de secuencia que interfiere con el procesamiento apropiado de pre-ARNm dentro de un ARNm resultante en expresión reducida o inactivación del gen. Para aquellos versados en la materia son conocidos métodos para afectar la síntesis de proteína mutando una secuencia de gen codificante para una proteína. Una nucleasa de dedo de cinc puede estar construida haciendo una fusión de un primer polinucleótido que codifica para una proteína de dedos de cinc que enlaza a polinucleótido NtMRP, y un segundo polinucleótido que codifica para una endonucleasa no específica tal como, pero no limitada a, aquellas de una endonucleasa de tipo IIS. Una endonucleasa de tipo IIS es una enzima de restricción que tiene un dominio de reconocimiento separado y un dominio de escisión de endonucleasa en cuyo caso la enzima escinde el ADN en sitios que se retiran del sitio de reconocimiento. Ejemplos no limitantes de endonucleasa de tipo IIS pueden ser, pero no se limitan a, AarI, BaeI, CdiI, DrrII, EciI, FokI, FaeI, GdiI, HgaI, Ksp6321, MboI, Pfl11081, Rle1081, RleAI, SapI, TspDTI o UbaPI.

En la técnica son conocidos métodos para el diseño y la construcción de proteínas de fusión, métodos para la selección y separación del dominio de endonucleasa del dominio de reconocimiento de secuencia de una endonucleasa del tipo IIS, métodos para el diseño y construcción de una nucleasa de dedo de cinc que comprende una proteína de fusión de una proteína de dedos de cinc y una endonucleasa. En una modalidad específica, el dominio de nucleasa en una nucleasa de dedo de cinc es FokI. Una proteína de fusión entre una proteína de dedos de cinc y la nucleasa de FokI puede comprender un espaciador consistente en dos pares de bases, o alternativamente el espaciador puede consistir en tres, cuatro, cinco, seis o más pares de bases. En una modalidad, se describe una proteína de fusión con un espaciador de siete pares de bases tal que la endonucleasa de una primera nucleasa de dedo de cinc puede dimerizarse al poner en contacto una segunda nucleasa de dedo de cinc, en cuyo caso las dos proteínas de dedos de cinc que forman dichas nucleasas de dedo de cinc pueden enlazar en dirección ascendente y descendente de la secuencia diana de ADN. Al dimerizarse, una nucleasa de dedo de cinc puede introducir una rotura en cadena doble a una secuencia diana de nucleótido que puede ser seguida por una unión de extremo no homólogo o recombinación homóloga con una secuencia exógena de nucleótido que tiene homología con las regiones que flanquean ambos lados de la rotura en cadena doble.

En otra modalidad, se proporciona una proteína de fusión que comprende una proteína de dedos de cinc y una proteína potenciadora que da lugar a un activador de dedo de cinc.

Un activador de dedo de cinc puede usarse para regular hacia arriba o activar la transcripción del gen NtMRP, que comprende los pasos de (i) manipular por ingeniería una proteína de dedos de cinc que enlaza una región dentro de un promotor o una secuencia enlazada de manera operativa una secuencia codificante del gen NtMRP, (ii) hacer una proteína de fusión entre dicha proteína de dedos de cinc y un activador de transcripción, (iii) hacer un constructo de expresión que comprende una secuencia de polinucleótido que codifica para dicho activador de dedo de cinc bajo el control de un promotor activo en una célula, tal como una célula vegetal, (iv) introducir dicho constructo de gen a la célula, y (v) cultivar la célula y permitir la expresión del activador de dedo de cinc, y (vi) caracterizar la célula que tiene una expresión incrementada de la proteína NtMRP proteína.

En otra modalidad, la divulgación proporciona una proteína de fusión que comprende una proteína de dedo de cinc y un represor de gen que da lugar a un represor de dedo de cinc. Un represor de dedo de cinc puede usarse para regular hacia abajo o reprimir la transcripción de polinucleótido NtMRP, que comprende los pasos de (i) manipular por ingeniería una proteína de dedos de cinc que enlaza a una región dentro de un promotor o una secuencia enlazada de modo operativo al polinucleótido NtMRP, y (ii) hacer una proteína de fusión entre dicha proteína de dedos de cinc y un represor de transcripción, y (iii) desarrollar un constructo de gen que comprende una secuencia de polinucleótido que codifica para dicho represor de dedo de cinc bajo control de un promotor activo en una célula, tal como una célula vegetal, y (iv) introducir dicho constructo de gen a una célula, y (v) proporcionar para la expresión del represor de dedo de cinc, y (vi) caracterizar la célula que tiene transcripción reducida de polinucleótido NtMRP.

En otra modalidad, la divulgación proporciona una proteína de fusión que comprende una proteína de dedo de cinc y una metilasa que da lugar a una metilasa de dedo de cinc. La metilasa de dedo de cinc puede usarse para regular hacia abajo o inhibir la expresión de polinucleótido NtMRP en una célula, tal como una célula vegetal, metilando una región dentro del promotor de polinucleótido NtMRP, que comprende los pasos de (i) manipular mediante ingeniería una proteína de dedos de cinc que pueden enlazarse a una región dentro de un promotor de polinucleótido NtMRP, y (ii) hacer una proteína de fusión entre dicha proteína de dedos de cinc y una metilasa, y (iii) desarrollar un constructo de gen que contiene un polinucleótido que codifica dicha metilasa de dedo de cinc bajo el control de un promotor activo en la célula, y (iv) introducir dicho constructo de gen a la célula, y (v) permitir la expresión de la metilasa del dedo de cinc, y (vi) caracterizar la célula que tiene expresión reducida o esencialmente no tiene expresión, de proteína NtMRP en la célula. En diversas modalidades, una proteína de dedos de cinc puede ser seleccionada de acuerdo con los métodos descritos en la presente para enlazar a una secuencia reguladora de polinucleótido NtMRP. Más específicamente, la secuencia reguladora puede comprender un sitio de iniciación de transcripción, un codón de inicio, una región de un exón, un límite de un exón-intrón, un terminador, o un codón de detención. La proteína de dedos de cinc puede fusionarse a una nucleasa, un activador, o a una proteína de represor.

En diversas modalidades, una nucleasa de dedo de cinc introduce una ruptura bicatenaria a una región reguladora, una región codificante, o una región no codificante de una

secuencia genómica de ADN de polinucleótido NtMRP, y conduce a una reducción, una inhibición o una inhibición sustancial del nivel de expresión de polinucleótido NtMRP, o una reducción, una inhibición o una inhibición sustancial de la actividad de la proteína codificada por el mismo.

La divulgación también proporciona un método para modificar una célula, tal como una célula vegetal, en cuyo caso el genoma de la célula vegetal es modificado por mutagénesis mediada por nucleasa de dedo de cinc, que comprende (a) identificar y hacer al menos dos proteínas no naturales de dedos de cinc que enlazan selectivamente diferentes sitios diana para modificación en la secuencia genómica de nucleótido; (b) expresar al menos dos proteínas de fusión que comprenden, cada una, una nucleasa y una de al menos dos proteínas no naturales de dedo de cinc en la célula vegetal, de modo que se introduce una ruptura bicatenaria a la secuencia genómica de nucleótido en el genoma vegetal, particularmente en el, o cerca al, sitio diana en la secuencia genómica de nucleótido; y, opcionalmente, (c) introducir a la célula un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótido que comprende una primera región de homología con una secuencia en dirección ascendente de la ruptura bicatenaria y una segunda región de homología con una región en dirección descendente de la ruptura bicatenaria, de modo que el polinucleótido recombina con ADN en el genoma. También se describen células que comprenden uno o varios constructos de expresión que comprenden secuencias de nucleótido que codifican una o varias de las proteínas de fusión.

En otro aspecto, la divulgación proporciona además métodos para producir plantas mutantes, que no se presentan en la naturaleza, o transgénicas o modificadas genéticamente de otra manera, usando meganucleasas tales como I-Grel. Pueden usarse meganucleasas de ocurrencia natural así como también meganucleasas recombinantes para causar específicamente una ruptura bicatenaria en un solo sitio o en relativamente pocos sitios en el ADN genómico de un vegetal para permitir la alteración de un gen NtMRP. La meganucleasa puede ser manipulada por ingeniería con propiedades de reconocimiento de ADN alteradas. Las proteínas de meganucleasa pueden entregarse a células vegetales mediante una variedad de mecanismos diferentes conocidos en el arte.

La meganucleasa puede ser una meganucleasa manipulada por ingeniería con propiedades de reconocimiento de ADN alteradas. Esta cita describe métodos para la manipulación por ingeniería con base en la estructura de meganucleasas derivadas de la meganucleasa de ocurrencia natural I-Grel. Estas meganucleasas modificadas mediante ingeniería pueden hacerse para reconocer y cortar 22 secuencias de ADN de pares de bases encontradas en los genomas de los vegetales. Las proteínas de meganucleasa pueden entregarse a las células vegetales mediante una variedad de mecanismos diferentes conocidos en el arte.

Aspectos de la divulgación permiten el uso de meganucleasas para desactivar polinucleótido NtMRP en una célula vegetal o en una planta. Aspectos también se refieren a un método para desactivar polinucleótido NtMRP en una planta usando una meganucleasa, que comprende: (a) proporcionar una célula vegetal que comprende polinucleótido NtMRP; (b) introducir una meganucleasa o un constructo que codifican una

meganucleasa a dicha célula vegetal; y (c) permitir que la meganucleasa desactive polinucleótido NtMRP.

Las meganucleasas pueden usarse para escindir sitios de reconocimiento de meganucleasa dentro de las regiones codificantes del polinucleótido NtMRP. Tal escisión con frecuencia da lugar a supresión de ADN en el sitio de reconocimiento de meganucleasa que sigue a una reparación de ADN mutagénica juntando un extremo no homólogo. Tales mutaciones en la secuencia codificante del gen son típicamente suficientes para desactivar el gen. Este método incluye, primero, la entrega de un casete de expresión de meganucleasa a una célula vegetal usando un método de transformación adecuado. Para la eficiencia máxima, es deseable enlazar el casete de expresión de meganucleasa a un marcador seleccionable y seleccionar células transformadas exitosamente en presencia de un agente de selección. Este enfoque dará lugar a la integración del casete de expresión de meganucleasa con el genoma, sin embargo, puede no ser deseable si la planta probablemente requiere aprobación reguladora. En tales casos, el casete de expresión de meganucleasa (y los genes marcadores seleccionables enlazados) pueden ser separados en subsiguientes generaciones de la planta usando técnicas convencionales de cultivo. De manera alternativa, las células vegetales pueden ser transformadas inicialmente con un casete de expresión de meganucleasa que carece de marcadores seleccionables y pueden ser cultivados en medios que carecen de un agente de selección. En tales condiciones, una fracción de las células tratadas adquirirá el casete de expresión de meganucleasa y expresarán la meganucleasa modificada por ingeniería de manera transitoria sin integrar el casete de expresión de meganucleasa al genoma. Debido a que esto no cuenta para eficiencia de transformación, este último procedimiento de transformación requiere que un gran número de células tratadas sea tamizado para obtener la modificación de genoma deseada.

A continuación de la entrega del casete de expresión de meganucleasa, se cultivan células vegetales, inicialmente, en condiciones que son típicas para el procedimiento de transformación particular que fue usado. Esto puede significar el cultivo de células transformadas en medios a temperaturas por debajo de los 26 grados C, con frecuencia en la oscuridad. Tales condiciones estándar pueden usarse por un período de tiempo, preferiblemente 1-4 días, para permitir que célula vegetal se recobre del proceso de transformación. En cualquier punto siguiente a este período de recuperación inicial, puede incrementarse la temperatura de cultivo para estimular la actividad de la meganucleasa manipulada por ingeniería para escindir y mutar el sitio de reconocimiento de meganucleasa.

Para ciertas aplicaciones, puede ser deseable retirar precisamente el polinucleótido NtMRP del genoma de una planta. Tales aplicaciones son posibles usando un par de meganucleasas manipuladas por ingeniería, cada una de las cuales escinde un sitio de reconocimiento de meganucleasa a cada lado de la supresión pretendida.

Pueden usarse constructos recombinantes suministrados en la presente para transformar plantas o células vegetales con el fin de modular (por ejemplo, reducir o inhibir) niveles de expresión de proteína NtMRP. Un constructo de polinucleótido recombinante puede comprender un polinucleótido que codifica un polipéptido NtMRP tal como se describe en

la presente, que está enlazado de manera operable a una región reguladora adecuada para expresar el polipéptido NtMRP en la planta o en la célula. De este modo, un polinucleótido puede comprender una secuencia codificante que codifica el polipéptido NtMRP tal como se describe en la presente o una variante de las mismas.

El polipéptido NtMRP codificado por un polinucleótido recombinante puede ser un polipéptido NtMRP nativo, o puede ser heterólogo para la célula. En algunos casos, el constructo recombinante contiene un polinucleótido que reduce o inhibe la expresión de un(os) polipéptido(s) que modulan NtMRP, que están enlazados de modo operable a una región reguladora. En la presente se describen ejemplos de regiones reguladoras adecuadas.

También se proporcionan vectores que contienen constructos de polinucleótido recombinantes tales como los descritos en la presente. Las espigas dorsales de vector adecuadas incluyen, por ejemplo, aquellas usadas de modo rutinario en el arte, tales como plásmidos, virus, cromosomas artificiales, BACs, YACs, o PACs. Vectores de expresión adecuados incluyen, sin limitación, plásmidos y vectores virales derivados, por ejemplo, de bacteriófagos, baculovirus, y retrovirus. Comercialmente se encuentran disponibles numerosos vectores y sistemas de expresión.

Los vectores también pueden incluir, por ejemplo, orígenes de replicación, regiones de acoplamiento al andamiaje (SARs por scaffold attachment regions) o marcadores. Un gen marcador puede conferir un fenotipo seleccionable en una célula vegetal. Por ejemplo, un marcador puede conferir resistencia biocida, tal como la resistencia a un antibiótico (por ejemplo, kanamicina, G418, bleomicina, o higromicina), o a un herbicida (por ejemplo, glifosato, clorsulfurona o fosfinotricina). Adicionalmente, un vector de expresión puede incluir una secuencia de etiqueta diseñada para facilitar manipulación o detección (por ejemplo, purificación o localización) del polipéptido expresado. Secuencias de etiqueta, tales como las secuencias de luciferasa, beta-glucuronidasa (GUS), proteína fluorescente verde (GFP, por Green fluorescent protein), glutathione S-transferasa (GST), polihistidina, c-myc o hemaglutinina se expresan típicamente como una fusión con el polipéptido codificado. Tales etiquetas pueden insertarse en cualquier parte dentro del polipéptido, incluso en el terminal carboxilo o en el terminal amino.

Diversas modalidades están dirigidas a plantas mutantes, que no se presentan en la naturaleza, o transgénicas que se modifican para reducir el nivel de expresión del gen NtMRP mediante diversos métodos que pueden utilizarse para reducir o silenciar la expresión de gen NtMRP, y de esta manera, producir plantas en las que el nivel de expresión de los transportadores de NtMRP puede reducirse dentro de tejidos vegetales de interés. Las velocidades del transporte de metal pesado y los patrones de distribución del transporte de metal pesado, en particular, transporte de cadmio, pueden alterarse en plantas producidas de acuerdo con los métodos y composiciones divulgados.

Las plantas adecuadas para usar en modificaciones genéticas incluyen plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas y sistemas de células vegetales, incluyendo especies de una de las siguientes familias: Acanthaceae, Alliaceae, Alstroemeriaceae, Amaryllidaceae, Apocynaceae, Arecaceae, Asteraceae, Berberidaceae, Bixaceae, Brassicaceae, Bromeliaceae, Cannabaceae, Caryophyllaceae, Cephalotaxaceae,

Chenopodiaceae, Colchicaceae, Cucurbitaceae, Dioscoreaceae, Ephedraceae, Erythroxilaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Lamiaceae, Linaceae, Lycopodiaceae, Malvaceae, Melanthiaceae, Musaceae, Myrtaceae, Nyssaceae, Papaveraceae, Pinaceae, Plantaginaceae, Poaceae, Rosaceae, Rubiaceae, Salicaceae, Sapindaceae, Solanaceae, Taxaceae, Theaceae, o Vitaceae.

Especies adecuadas pueden incluir miembros de los géneros *Abelmoschus*, *Abies*, *Acer*, *Agrostis*, *Allium*, *Alstroemeria*, *Ananas*, *Andrographis*, *Andropogon*, *Artemisia*, *Arundo*, *Atropa*, *Berberis*, *Beta*, *Bixa*, *Brassica*, *Calendula*, *Camellia*, *Camptotheca*, *Cannabis*, *Capsicum*, *Carthamus*, *Catharanthus*, *Cephalotaxus*, *Chrysanthemum*, *Cinchona*, *Citrullus*, *Coffea*, *Colchicum*, *Coleus*, *Cucumis*, *Cucurbita*, *Cynodon*, *Datura*, *Dianthus*, *Digitalis*, *Dioscorea*, *Elaeis*, *Ephedra*, *Erianthus*, *Erythroxylum*, *Eucalyptus*, *Festuca*, *Fragaria*, *Galanthus*, *Glycine*, *Gossypium*, *Helianthus*, *Hevea*, *Hordeum*, *Hyoscyamus*, *Jatropha*, *Lactuca*, *Linum*, *Lolium*, *Lupinus*, *Lycopersicon*, *Lycopodium*, *Manihot*, *Medicago*, *Mentha*, *Miscanthus*, *Musa*, *Nicotiana*, *Oryza*, *Panicum*, *Papaver*, *Parthenium*, *Pennisetum*, *Petunia*, *Phalaris*, *Phleum*, *Pinus*, *Poa*, *Poinsettia*, *Populus*, *Rauwolfia*, *Ricinus*, *Rosa*, *Saccharum*, *Salix*, *Sanguinaria*, *Scopolia*, *Secale*, *Solanum*, *Sorghum*, *Spartina*, *Spinacea*, *Tanacetum*, *Taxus*, *Theobroma*, *Triticosecale*, *Triticum*, *Uniola*, *Veratrum*, *Vinca*, *Vitis*, y *Zea*.

Especies adecuadas pueden incluir *Panicum* spp., *Sorghum* spp., *Miscanthus* spp., *Saccharum* spp., *Erianthus* spp., *Populus* spp., *Andropogon gerardii* (tallo azul gigante), *Pennisetum purpureum* (pasto elefante), *Phalaris arundinacea* (alpiste arundináceo), *Cynodon dactylon* (pasto bermuda), *Festuca arundinacea* (festuca alta), *Spartina pectinata* (espartillo de la pradera), *Medicago sativa* (alfalfa), *Arundo donax* (junco gigante), *Secale cereale* (centeno), *Salix* spp. (sauce), *Eucalyptus* spp. (eucalipto), *Triticosecale* (triticale trigo por centeno), bambú, *Helianthus annuus* (girasol), *Carthamus tinctorius* (cártamo), *Jatropha curcas* (*Uatropa*), *Ricinus communis* (ricino), *Elaeis guineensis* (palma), *Linum usitatissimum* (lino), *Brassica juncea*, *Beta vulgaris* (remolacha), *Manihot esculenta* (yuca), *Lycopersicon esculentum* (tomate), *Lactuca sativa* (lechuga), *Musa paradisiaca* (banana), *Solanum tuberosum* (papa), *Brassica oleracea* (brócoli, coliflor,

Repollitos de Bruselas), *Camellia sinensis* (té), *Fragaria ananassa* (fresa), *Theobroma cacao* (cacao), *Coffea arabica* (café), *Vitis vinifera* (uva), *Ananas comosus* (piña), *Capsicum annum* (pimiento picante y pimentón), *Allium cepa* (cebolla), *Cucumis melo* (melón), *Cucumis sativus* (pepinillo), *Cucurbita maxima* (calabacín), *Cucurbita moschata* (calabacita), *Spinacea oleracea* (espinaca), *Citrullus lanatus* (sandía), *Abelmoschus esculentus* (quingombó), *Solanum melongena* (berenjena), *Rosa* spp. (rosa), *Dianthus caryophyllus* (clavel), *Petunia* spp. (petunia), *Poinsettia pulcherrima* (poinsetia), *Lupinus albus* (altramuz), *Uniola paniculata* (avena), *agrostis* (*Agrostis* spp.), *Populus tremuloides* (álamo temblón), *Pinus* spp. (pino), *Abies* spp. (abeto), *Acer* spp. (arce), *Hordeum vulgare* (cebada), *Poa pratensis* (poa), *Lolium* spp. (césped inglés) y *Phleum pratense* (fleo), *Panicum virgatum* (pasto aguja), *Sorghum bicolor* (sorgo, pasto sudán), *Miscanthus giganteus* (*miscanthus*), *Saccharum* sp. (caña energética), *Populus balsamifera* (álamo), *Zea mays* (maíz), *Glycine max* (soya), *Brassica napus* (canola), *Triticum aestivum* (trigo), *Gossypium hirsutum* (algodón), *Oryza sativa* (arroz), *Helianthus annuus* (girasol), *Medicago sativa* (alfalfa), *Beta vulgaris* (remolacha), o *Pennisetum glaucum* (mijo perla).

Diversas modalidades están dirigidas a plantas mutantes, plantas que no se presentan en la naturaleza o plantas transgénicas modificadas para modular (por ejemplo, reducir o inhibir) niveles de expresión de gen NtMRP por las mismas, plantas productoras tales como plantas de tabaco, en las que el nivel de expresión de NtMRP está reducido dentro de tejidos vegetales de interés en comparación con una planta de control. Las composiciones y métodos divulgados pueden aplicarse a especies cualesquiera del género *Nicotiana*, incluyendo *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* varo *multiflora*, *N. africana*, *N. alata*, *N. amplexicaulis*, *N. arentsii*, *N. attenuata*, *N. benavidesii*, *N. benthamiana*, *N. bigelovii*, *N. bonariensis*, *N. cavicola*, *N. clevelyi*, *N. cordifolia*, *N. corymbosa*, *N. debneyi*, *N. excelsior*, *N. forgetiana*, *N. fragrans*, *N. glauca*, *N. glutinosa*, *N. goodspeedii*, *N. gossei*, *N. hibrid*, *N. ingulba*, *N. kawakamii*, *N. knightiana*, *N. langsдорffii*, *N. linearis*, *N. longiflora*, *N. maritima*, *N. megalosifon*, *N. miersii*, *N. noctiflora*, *N. nudicaulis*, *N. obtusifolia*, *N. occidentalis*, *N. occidentalis* subsp. *hesperis*, *N. otopora*, *N. paniculata*, *N. pauciflora*, *N. petunioides*, *N. plumbaginifolia*, *N. quadrivalvis*, *N. raimondii*, *N. repya*, *N. rosulata*, *N. rosulata* subsp. *ingulba*, *N. rotundifolia*, *N. setchellii*, *N. simulans*, *N. solanifolia*, *N. spegazzinii*, *N. stocktonii*, *N. suaveolens*, *N. silvestris*, *N. thirsiflora*, *N. tomentosa*, *N. tomentosiformis*, *N. trigonophylla*, *N. umbratica*, *N. undulata*, *N. velutina*, *N. wigyioides*, y *N. x syerae*.

El uso de variedades cultivadas de Tabaco y de Tabaco élite también está contemplado en la presente. La planta transgénica, que no se presenta en la naturaleza, o mutante puede ser, por lo tanto, una variedad de tabaco o una variedad cultivada de tabaco élite que comprende uno o varios transgenes, o una o varias mutaciones genéticas o una combinación de las mismas. La(s) mutación(es) genética(s) (por ejemplo, uno o varios polimorfismos) pueden ser mutaciones que no existen naturalmente en la variedad de tabaco individual o la variedad cultivada de tabaco (por ejemplo, variedad de tabaco élite) o pueden ser mutación(es) genética(s) que no ocurren naturalmente siempre y cuando la mutación no ocurra naturalmente en la variedad de tabaco individual o la variedad cultivada de tabaco (por ejemplo, variedad cultivada de tabaco).

Variedades de *Nicotiana tabacum* particularmente útiles incluyen tabacos del tipo Burley, tipo oscuro, tipo curado al aire caliente, y tipo oriental. Ejemplos no limitantes de variedades o variedades cultivadas son: BO 64, CC 101, CC 200, CC 27, CC 301, CC 400, CC 500, CC 600, CC 700, CC 800, CC 900, Coker 176, Coker 319, Coker 371 Gold, Coker 48, CO 263, OF911, OT 538 LC Galpao tobacco, GL 26H, GL 350, GL 600, GL 737, GL 939, GL 973, HB 04P, HB 04P LC, HB3307PLC, Hibrid 403LC, híbrido 404LC, Híbrido 501 LC, K 149, K 326, K 346, K 358, K394, K 399, K 730, KOH 959, KT 200, KT204LC, KY10, KY14, KY 160, KY 17, KY 171, KY 907, KY907LC, KTY14xL8 LC, Little Crittenden, McNair 373, McNair 944, msKY 14xL8, Madole de hoja angosta, LC Madole de hoja angosta, NBH 98, N-126, N-777LC, N-7371LC, NC 100, NC 102, NC 2000, NC 291, NC 297, NC 299, NC 3, NC 4, NC 5, NC 6, NC7, NC 606, NC 71, NC 72, NC 810, NC BH 129, NC 2002, Neal Smith Madole, OXFORO 207, PO 7302 LC, PO 7309 LC, PO 7312 LC, tabaco 'Perique', PVH03, PVH09, PVH19, PVH50, PVH51, R 610, R 630, R 7-11, R 7-12, RG 17, RG 81, RG H51, RGH 4, RGH 51, RS 1410, Speight 168, Speight 172, Speight 179, Speight 210, Speight 220, Speight 225, Speight 227, Speight 234, Speight G-28, Speight G-70, Speight H-6, Speight H20, Speight NF3, TI 1406, TI 1269, TN 86,

TN86LC, TN 90, TN 97, TN97LC, TN 094, TN D950, TR (Tom Rosson) Madole, VA 309, VA359, AA 37-1, B 13P, Xanthi (Mitchell-Mor), 35 Bel-W3, 79-615, Samsun Holmes NN, KTROC número 2 Hhíbrido 49, Burley 21, KY 8959, KY9, MD609, PG01, PG04, P01, P02, P03, RG11, RG8, VA 509, AS44, Banket A1, Basma Drama B84/31, Basma I Zichna ZP4/B, Basma Xanthi BX 2A, Batek, Besuki Jember, C104, Coker 347, Criollo Misionero, Delcrest, Djebel81, DVH 405, Galpáo Comum, HB04P, Hicks de hoja ancha, Kabakulak Elassona, Kutsage E1, LA BU 21, NC 2326, NC 297, PVH 2110, ruso rojo, Samsun, Saplak, Simmaba, Talgar 28, Wislica, Yayaldag, Prilep HC-72, Prilep P23, Prilep PB 156/1, Prilep P12-2/1, Yaka JK-48, Yaka JB 125/3, TI-1068, KDH-960, TI-1070, TW136, Basma, TKF 4028, L8, TKF 2002, GR141, Basma xanthi, GR149, GR153, Petit Havana. También están contempladas las subvariedades bajo conversoras de arriba, incluso si no se identifican específicamente en la presente.

En otro aspecto, se proporciona una planta mutante, que no se presenta en la naturaleza, o transgénica, tal como se describe en la presente, la cual ha sido modificada además de tal modo que también está reducida la expresión de transportadores NtHMA lo cual puede reducir además el contenido de cadmio en la planta. El uso de transportadores NtHMA para reducir el contenido de cadmio en la planta está descrito en W02009074325.

Esto, de acuerdo con una modalidad, proporciona una célula vegetal mutante, que no se presenta en la naturaleza, o transgénica, que comprende un polinucleótido NtMRP aislado, un gen NtMRP quimérico, un constructo de polinucleótido NtMRP, un ARN NtMRP bicatenario, un conjugado NtMRP y/o un vector de expresión NtMRP junto con un polinucleótido NtHMA aislado, un gen NtHMA quimérico, un constructo de polinucleótido NtHMA, un ARN bicatenario NtHMA, un conjugado NtHMA y/o un vector de expresión NtHMA.

Las modalidades también están dirigidas a composiciones y métodos para producir plantas mutantes, plantas que no se presentan en la naturaleza, plantas híbridas o plantas transgénicas que han sido modificadas para modular (por ejemplo, reducir o inhibir) expresión o actividad de NtMRP de modo que allí se acumulen cantidades más bajas de cadmio en comparación con un control. En ciertas modalidades, las plantas que se obtienen son similares o sustancialmente las mismas en apariencia total (por ejemplo, fenotipo) a las plantas de control. Diversas características fenotípicas tales como el grado de madurez, el número de hojas por planta, la altura del tallo, el ángulo de inserción de la hoja, el tamaño de la hoja (anchura y longitud), la distancia internodos y la proporción lámina-nervadura principal puede evaluarse mediante observaciones de campo. En una modalidad preferida, la altura o el peso, o altura y peso de las plantas, son sustancialmente los mismos que la planta de control. En otra modalidad preferida, no se encuentran diferencias significativas en hojas recogidas de las plantas en comparación con un control, lo cual indica que la modulación de transcritos de NtMRP no tiene efecto estadísticamente relevante en la biomasa seca.

Un aspecto es una semilla de la planta mutante, la planta que no se presenta en la naturaleza, la planta híbrida o la planta transgénica. Preferiblemente, la semilla es una semilla de Tabaco. Un aspecto más es el polen u óvulo de la planta mutante, la planta que no se presenta en la naturaleza, la planta híbrida o la planta transgénica. En adición, se

describe una planta mutante, una planta que no se presenta en la naturaleza, una planta híbrida, una planta transgénica que comprende además un polinucleótido que confiere esterilidad masculina.

La divulgación también proporciona un cultivo tisular de células regenerables de la planta mutante, la planta que no se presenta en la naturaleza, planta híbrida, o planta transgénica o una parte de las mismas, cuyo cultivo regenera plantas capaces de expresar todas las características morfológicas y fisiológicas del progenitor. Las células regenerables incluyen, pero no se limitan a, células de hojas, polen, embriones, cotiledones, hipocótilos, raíces, puntas de raíz, anteras, flores y una parte de las mismas, óvulos, brotes, tallos, troncos, corteza y cápsulas o callo o protoplastos derivados de los mismos.

En algunas modalidades, una planta en la que la expresión de polinucleótido NtMRP es modulada (por ejemplo, reducida o inhibida) puede tener niveles disminuidos de metal pesado, tales como cadmio, especialmente en las hojas. El nivel de cadmio puede disminuir en al menos alrededor de 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% o más, como el 100%, 125%, 150% o 200% o más si se compara con el nivel de cadmio en una planta de control correspondiente en la que la expresión de polinucleótido NtMRP no ha sido modulada (por ejemplo, reducida o inhibida). En algunas modalidades, una planta en la que la expresión de polinucleótido NtMRP se modula (por ejemplo, se reduce o se inhibe) pueden tener niveles incrementados o disminuidos de cadmio en las raíces. En algunas modalidades, una planta en la que la expresión de polinucleótido NtMRP se modula (por ejemplo, se reduce o inhibe) puede tener niveles disminuidos o incrementados de cadmio en las raíces y niveles disminuidos de cadmio en las hojas. En algunas modalidades, una planta en la que la expresión de polinucleótido NtMRP es modulada (por ejemplo, reducida o inhibida) puede tener niveles disminuidos de cadmio en la biomasa cosechable.

La expresión puede evaluarse usando métodos que incluyen, por ejemplo, RT-PCR, Northern blots, protección de RNasa, extensiones de cebador, Western blots, electroforesis de proteína en gel, inmunoprecipitación, inmunoensayos enlazados a enzima, ensayos chip, y espectrometría de masas. Debe notarse que si un polipéptido es expresado bajo el control de un promotor preferencial por tejido o de expresión amplia, la expresión puede evaluarse en toda la planta o en un tejido seleccionado. De modo similar, si un polipéptido es expresado en un momento particular, por ejemplo, en un tiempo particular en desarrollo o después de una inducción, la expresión puede evaluarse selectivamente en un período de tiempo deseado. Una población de plantas mutantes, que no se presentan en la naturaleza, o plantas transgénicas, puede cribarse o seleccionarse para aquellos miembros de la población que tienen un atributo o fenotipo deseado. Por ejemplo, una población de progenie de un evento de transformación individual puede cribarse para aquellas plantas que tienen un nivel deseado de expresión de polipéptido o polinucleótido NtMRP. Pueden usarse métodos físicos y bioquímicos para identificar niveles de expresión. Estos incluyen análisis Southern o amplificación PCR para detección de un polinucleótido; Northern blots, protección de S1 RNasa, extensión de cebador, o amplificación de RT-PCR para detectar transcritos de ARN; ensayos

enzimáticos para detectar actividad de enzima o ribozima de polipéptidos y polinucleótidos; y electroforesis de proteína en gel, Western blots, inmunoprecipitación, e inmunoensayos enlazados a enzima para detectar polipéptidos. Otras técnicas tales como hibridación in situ, tinturado de enzima e inmuno-tinturado también pueden usarse para detectar la presencia o expresión de polipéptidos o polinucleótidos.

Una población de plantas puede cribarse para aquellas plantas que tienen un atributo deseado, tal como el nivel de cadmio modulado (por ejemplo, reducido o inhibido). La selección o cribado pueden llevarse a cabo por una o varias generaciones, o en más de una locación geográfica. En algunos casos, las plantas mutantes, que no se presentan en la naturaleza, o transgénicas pueden ser cultivadas y seleccionadas en condiciones que inducen un fenotipo deseado o sino son necesarios para producir un fenotipo deseado en una planta mutante que no se presenta en la naturaleza, o transgénica. Adicionalmente, la selección, o cribado (screening), puede aplicarse durante una etapa de desarrollo particular en la que se espera que el fenotipo sea exhibido por la planta. La selección, o cribado, puede llevarse a cabo para elegir aquellas plantas mutantes que no se presentan en la naturaleza, o plantas transgénicas que tienen una diferencia estadísticamente significativa en su contenido de cadmio respecto de una planta de control en la cual la expresión o la actividad de polinucleótido o proteína NtMRP no han sido moduladas (por ejemplo, reducidas o inhibidas).

Las células vegetales y plantas mutantes, que no se presentan en la naturaleza, o transgénicas, se describen en la presente y comprenden uno o varios polinucleótidos recombinantes, tales como el polinucleótido aislado, el gen quimérico, el constructo de polinucleótido, el ARN bicatenario, el conjugado o el vector de expresión. Una planta o célula vegetal puede transformarse teniendo el polinucleótido recombinante integrado a su genoma para volverse transformado de modo estable. Células transformadas de modo estable retienen típicamente el polinucleótido introducido con cada división celular. Una planta o una célula vegetal también pueden transformarse de modo transitorio de modo que el polinucleótido recombinante no esté integrado a su genoma. Las células transformadas transitoriamente pierden típicamente todo, o alguna porción, del polinucleótido recombinante introducido con cada división celular de modo que el polinucleótido recombinante introducido no puede detectarse en células hijas después de un número suficiente de divisiones celulares. En el arte son conocidas las técnicas para introducir polinucleótidos a plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas, e incluyen, por ejemplo, transformación mediada por *Agrobacterium*, transformación mediada por vector viral, electroporación y transformación con cañón de partículas. El sistema *Agrobacterium* para integración de polinucleótido ajeno a los cromosomas vegetales ha sido estudiado intensamente, modificado, y explotado para ingeniería genética en vegetales. Las moléculas desnudas de polinucleótido recombinante que comprenden secuencias de polinucleótidos correspondientes a la proteína purificada objeto enlazado de modo operable, en la orientación sentido o antisentido, a secuencias reguladoras están unidas a secuencias de ADN-T apropiadas mediante métodos convencionales. Estos se introducen a protoplastos de tabaco mediante técnicas de polietilenglicol o mediante técnicas de electroporación, y ambas son estándar. De modo alternativo, tales vectores que comprenden moléculas de polinucleótido recombinante que codifican la proteína purificada objeto se introducen a las células vivas de *Agrobacterium* que luego transfieren

el polinucleótido a las células vegetales. La transformación mediante polinucleótido desnudo sin secuencias de vector de ADN-T acompañantes puede realizarse por medio de fusión de protoplastos con liposomas que contienen polinucleótido o mediante electroporación. Polinucleótido desnudo no acompañado por secuencias de vector de AND-T también puede usarse para transformar células por medio de microproyectiles inertes de alta velocidad.

Si un célula o cultivo tisular se usan como tejido recipiente para la transformación, si se desea pueden regenerarse plantas a partir de cultivos transformados mediante técnicas conocidas por aquellos con habilidad en el arte. La elección de regiones reguladoras a ser incluidas en un constructo recombinante depende de varios factores, incluyendo pero no limitando la eficiencia, seleccionabilidad, inducibilidad, nivel de expresión deseado, y expresión referencial de célula o tejido. Para alguien versado en la materia es una cuestión rutinaria modular la expresión de una secuencia codificante seleccionando y posicionando apropiadamente regiones reguladoras relativas a la secuencia codificante. La transcripción de un polinucleótido puede modularse de una manera similar. Algunas regiones reguladoras adecuadas solo, o de modo predominante, inician transcripción, en ciertos tipos de células. Los métodos para identificar y caracterizar las regiones reguladoras en polinucleótidos genómicos vegetales son conocidos en el arte. Promotores adecuados incluyen promotores específicos de tejido reconocidos por factores específicos de tejido presentes en diferentes tipos de tejidos o células (por ejemplo, promotores específicos para raíces, promotores específicos para brotes, promotores específicos para xilema), o presentes durante diferentes etapas de desarrollo, o presentes en respuesta a diferentes condiciones ambientales. Algunos promotores incluyen promotores constitutivos que pueden activarse en la mayoría de tipos de células sin requerir inductores específicos. Ejemplos de promotores adecuados para controlar la producción de polipéptido iARN NtMRP incluyen el virus mosaico de coliflor 35S (CaMV/35S), SSU, OCS, lib4, usp, STLS1, 833, nos o promotores ubiquitina o phaSEQlin. Personas versadas en la material son capaces de generar múltiples variaciones de promotores recombinantes.

Promotores específicos para el tejido son elementos de control transcripcionales que solo son activos en células particulares en tiempos específicos durante el desarrollo de la planta, tales como tejidos vegetativos o tejidos reproductivos. La expresión específica de tejido puede ser ventajosa, por ejemplo, cuando la expresión de polinucleótidos se prefiere en ciertos tejidos. Ejemplos de promotores específicos para tejidos bajo control de desarrollo incluyen promotores que pueden solo (o principalmente) iniciar transcripción en ciertos tejidos, tales como tejidos vegetativos, por ejemplo, raíces u hojas, o tejidos reproductivos, tales como frutos, óvulos, semillas, polen, pistilos, flores, o cualquier tejido embrionario. Los promotores reproductivos específicos para tejido pueden ser, por ejemplo, específicos para anteras, específicos para óvulos, específicos para embriones, específicos para endosperma, específicos para integumento, específicos para semillas y recubrimiento de semillas, específicos para polen, específicos para pétalo, específicos para sépalo, o combinaciones de los mismos.

Promotores específicos para hoja adecuados incluyen promotor de piruvato ortofosfato dicianasa (PPDK) de planta C4 (maíz), promotor cab-m1 Ca²⁺ de maíz, el promotor de gen

relacionado con *Arabidopsis thaliana* myb (Atmyb5), los promotores de ribulosa bifosfato carboxilasa (RBCS) (por ejemplo, genes RBCS 1, RBCS2 y RBCS3A de tomate expresados en hojas y plántulas que han crecido ligeramente, RBCS1 y RBCS2 expresados en frutos de tomate que se desarrollan o promotor de ribulosa bisfosfato carboxilasa expresado casi exclusivamente en células mesofilicas en los limbos de hojas y vainas de hojas a niveles altos).

Promotores específicos para senescencia adecuados incluyen un promotor de tomate activo durante la maduración del fruto, la senescencia y la abscisión de hojas, un promotor de maíz de gen que codifica una proteasa de cisteína. Pueden usarse promotores específicos para anteras adecuados. Pueden seleccionarse promotores preferidos para raíces adecuados, conocidos para personas versadas en la materia.

Promotores preferidos para semillas, adecuados, incluyen promotores específicos para semillas (aquellos promotores activos durante el desarrollo de semillas tales como promotores de proteínas de almacenamiento de semillas) y también promotores de germinación de semilla (aquellos promotores activos durante la germinación de semilla). Aquellos promotores preferidos para semillas incluyen, pero no se limitan a, Cim1 (mensaje inducido por citoquinina); cZ19B1 (maíz 19 kDa zeína); milps (myo-inositol-1-fosfato sintasa); mZE40-2, también conocido como Zm-40; nuc1; y celA (celulosa sintasa). Gama-zeína es un promotor específico para endosperma. Glob-1 es un promotor específico para embrión. Para dicotiledóneas, los promotores específicos para semillas incluyen, pero no se limitan a, beta.-phaSEQlin de frijol, napina, β -conglucina, lecitina de soya, cruciferina, y similares. Para monocotiledóneas, los promotores específicos para semillas incluyen, pero no se limitan a, un promotor de maíz 15 kDa zeína, un promotor 22 kDa zeína, un promotor 27 kDa zeína, un promotor g-zeína, un promotor 27 kDa γ -zeína (tal como promotor gzw64A, véase número de acceso a banco genético Genbank S78780), un promotor de cera, un promotor encogido 1, un promotor encogido 2 promotor, un promotor de globulina 1 (véase número de acceso de banco genético L22344), un promotor ltp2, promotor cim1, promotores de maíz end1 y end2, promotor nuc1, promotor Zm40, eep1 y eep2; lec1, promotor tioredoxin H; promotor mlip15, promotor PCNA2; y el promotor encogido 2.

Ejemplos de promotores inducibles incluyen promotores que responden a ataque patógeno, condiciones anaeróbicas, temperatura elevada, luz, sequía, temperatura fría, o alta concentración de sal. Los promotores inducibles por patógenos incluyen aquellas de las proteínas relacionadas con patogénesis (proteínas PR), que se inducen siguiendo una infección por un patógeno (por ejemplo, proteínas PR, proteínas SAR, beta-1,3-glucanasa, quitinasa).

Adicionalmente a los promotores vegetales, otros promotores adecuados pueden derivarse de origen bacteriano, por ejemplo el promotor de octopina sintasa, el promotor de nopalina sintasa y otros promotores derivados de plásmidos Ti), o pueden derivarse de promotores virales (por ejemplo, promotores 35S y 19S ARN de virus de mosaico de coliflor (CaMV), promotores constitutivos de virus de mosaico de tabaco, virus de mosaico de coliflor (CaMV) promotores 19S y 35S, o promotor de virus de mosaico de escrofularia 35S).

Ejemplos de fracciones conjugadas incluyen compuestos macromoleculares tales como proteínas (por ejemplo, anticuerpos), cadenas de ácidos grasos, residuos de azúcar, glicoproteínas, polímeros (por ejemplo, polietilenglicol), o combinaciones de los mismos. Un oligonucleótido puede conjugarse con una fracción que incrementa la absorción celular del oligonucleótido. Ejemplos no limitantes de fracciones incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos, polipéptidos, fracciones de lípido tales como la fracción de colesterol, ácido cólico, un tioéter, por ejemplo, hexil-s-tritilol, un tiocolesterol, una cadena alifática, por ejemplo, residuos de dodecandiol o undecilo, un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o trietilamonio-1-di-o-hexadecil-rac-glicero-S-h-fosfonato, una poliamina o una cadena de polietilenglicol, un ácido acético de adamantano, una fracción de palmitilo, una fracción de octadecilamina o de hexilamino-carbonil-oxicolesterol.

La fracción puede ser un polímero cargado positivamente, tal como un péptido cargado positivamente, es decir, por ejemplo, alrededor de 1 a 50 residuos de aminoácido de longitud u óxidos de polialquileno tales como polietilenglicol (PEG) o polipropilenglicol. Adecuadamente, el polímero cargado de modo positivo, tal como un óxido de polialquileno puede unirse al oligómero mediante un enlazador tal como un enlazador capaz de liberarse. Cuando se está midiendo la expresión de polipéptido NtMRP, la detección de la cantidad de ARNm que codifica un polipéptido NtMRP en la célula puede cuantificarse mediante, por ejemplo, PCR o Northern blot. Cuando se está midiendo un cambio en la cantidad de polipéptido NtMRP en la muestra, puede usarse la detección de NtMRP usando anticuerpos anti-NtMRP para cuantificar la cantidad de polipéptido NtMRP en la célula usando técnicas conocidas. De modo alternativo puede medirse la actividad biológica (por ejemplo, transporte de metal pesado, como cadmio) antes y después del contacto con el agente de ensayo.

En otra modalidad, en la presente se proporcionan anticuerpos que son inmunoreactivos con los polipéptidos. Los polipéptidos NtMRP, fragmentos, variantes, polipéptidos de fusión y similares, tal como se describió en la presente, pueden emplearse como "inmunógenos" en la producción de anticuerpos inmunoreactivos con los mismos. Tales anticuerpos enlazan específicamente anticuerpos a los polipéptidos mediante sitios que enlazan antígenos del anticuerpo. Anticuerpos que enlazan específicamente son aquellos que reconocerán y se enlazarán específicamente con polipéptidos, homólogos y variantes de la familia NtMRP, pero no con otras moléculas. En una modalidad, los anticuerpos son específicos para polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos NtMRP tal como se describe en la presente y no reaccionan de manera cruzada con otros polipéptidos.

Más específicamente, los polipéptidos, fragmentos, variantes, polipéptidos de fusión, y similares contienen determinantes antigénicos o epítomos que obtienen la formación de anticuerpos. Estos determinantes antigénicos o epítomos pueden ser lineales o conformacionales (discontinuos). Los epítomos lineales están compuestos de una sección individual de aminoácidos del polipéptido, mientras que los epítomos conformacionales o discontinuos están compuestos de secciones de aminoácidos de regiones diferentes de la cadena de polipéptido que son traídas a proximidad cercana sobre el plegamiento de polipéptido. Los epítomos pueden identificarse por cualquiera de los métodos conocidos en el arte. Adicionalmente, pueden usarse epítomos de los polipéptidos como agentes de investigación, en ensayos, y para purificar anticuerpos, que se enlazan de modo

específico, de sustancias tales como sueros policlonales o sobrenadantes a partir de hibridomas cultivados. Tales epítomos o variantes de los mismos pueden ser producidos usando técnicas conocidas en el arte, tales como síntesis en fase sólida, escisión química o enzimática de un polipéptido, o usando tecnología de ADN recombinante.

Los anticuerpos policlonales y monoclonales a los polipéptidos pueden prepararse mediante técnicas convencionales. Las líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos monoclonales específicos para los polipéptidos también están contempladas en la presente. Tales hibridomas pueden ser producidos e identificados mediante técnicas convencionales. Para la producción de anticuerpos, pueden inmunizarse diversos animales hospederos mediante inyección con un polipéptido, fragmento, variante NtMRP, o mutantes de los mismos. Tales animales hospederos pueden incluir, pero no limitarse a, conejos, ratones y ratas, por mencionar algunos. Para incrementar la respuesta inmunológica pueden usarse diversos adyuvantes. Dependiendo de las especies hospederas, tales adyuvantes, pero no se limitan a, geles minerales de Freund (completos e incompletos), tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianina de lapa, dinitrofenol, y adyuvantes humanos potencialmente útiles tales como BCG (bacilo Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*. Los anticuerpos monoclonales pueden recuperarse mediante técnicas convencionales. Tales anticuerpos monoclonales pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina que incluye IgG, IgM, IgE, IgA, IgO, y cualquier subclase de las mismas.

Los anticuerpos también pueden usarse en ensayos para detectar la presencia de los polipéptidos o fragmentos, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Los anticuerpos también pueden emplearse en purificar polipéptidos o fragmentos mediante cromatografía de inmunoafinidad.

Diversas modalidades proporcionan plantas mutantes, que no se presentan en la naturaleza, o transgénicas, así como biomasa y semillas en las que el nivel de expresión de polinucleótido NtMRP es sustancialmente reducido para restringir o impedir el transporte de cadmio hacia la lámina de la hoja. La lámina de la hoja puede ser incorporada a diversos productos consumibles, tales como diversos artículos que pueden fumarse, como los cigarros, cigarrillos y productos de tabaco sin humo (es decir, no combustibles).

La reducción porcentual (%) de cadmio en estos artículos fumables y productos sin humo puede ser un valor de al menos alrededor de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100%, 200% o 300% más bajo cuando se compara con productos consumibles derivados de contrapartes no mutantes, que no se presentan en la naturaleza, o no transgénicas. En algunas modalidades, el contenido de cadmio de estos artículos fumables y productos sin humo es un valor desde un rango de alrededor de 0.01 a alrededor de 0.05 partes por millón (ppm), desde alrededor de 0.01 a alrededor de 0.1 ppm, desde alrededor de 0.01 a alrededor de 0.5 ppm, desde alrededor de 0.01 a alrededor de 1.0 ppm, o desde alrededor de 0.01 a alrededor de 5 ppm. En algunas modalidades, el contenido de cadmio de estos artículos fumables y productos sin humo es de alrededor de 0.001 ppm o menos,

alrededor de 0.01 ppm o menos o alrededor de 0.05 ppm o menos, o alrededor de 0.49 ppm o menos o alrededor de 0.5 ppm o menos.

El grado de acumulación de cadmio en plantas puede ser sustancialmente variable dependiendo de varios parámetros atribuidos a la complejidad del genotipo y el entorno de crecimiento. Por ejemplo, las concentraciones de cadmio en hojas de tabaco cultivado en campo pueden ser extremadamente variables dependiendo de factores tales como el agro-clima, la calidad del suelo, las variedades cultivadas, y el tipo y origen de fertilizador usado. Además, los patrones de distribución de cadmio relativos dentro de diferentes porciones de una planta de tabaco pueden variar de acuerdo con la especie, el órgano/tejido, y las condiciones de crecimiento (es decir, crecimiento en campo vs crecimiento hidropónico). En promedio, las concentraciones de cadmio medidas en hojas de tabaco cultivado en campo (incluyendo nervaduras principales y venas) pueden estar en el rango de aproximadamente 0.5 a 5 ppm (partes por millón, o microgramo/gramo de peso seco de hojas de tabaco). Sin embargo, muchos niveles de cadmio publicados típicamente no definen la madurez del tabaco, la variedad del tabaco, o las porciones de hoja particulares (es decir, remoción de posición de tallo de hoja) cosechadas para análisis. En algunas variedades, las hojas más bajas pueden acumular niveles de cadmio más altos que las hojas del medio o superiores. A nivel intracelular, el cadmio puede encontrarse en diversos componentes de célula de una célula vegetal, incluyendo la pared celular, el citoplasma, el cloroplasto, el núcleo y las vacuolas.

Además, el contenido de cadmio medido en hojas de tabaco puede variar sustancialmente dependiendo de los niveles de cadmio en el entorno del suelo donde las plantas se cultivaron. Las hojas de tabaco cultivado en áreas contaminadas con cadmio pueden acumular cadmio desde alrededor de 35 ppm o más, en comparación con las hojas de las contrapartes idénticas genéticamente cultivadas en áreas no contaminadas, que pueden acumular cadmio en un rango de aproximadamente 0.4 a aproximadamente 8 ppm. Las vacuolas dentro de las hojas de plantas cultivadas en áreas contaminadas pueden acumular concentraciones muy altas de cadmio. Para las personas versadas en la materia son conocidos los métodos para aplicar las composiciones divulgadas que son adecuadas para una especie de planta dada de interés. El contenido de metal pesado en plantas puede medirse usando diversos conocidos en la técnica. Un método preferido comprende el uso de espectrofotometría de masas acoplada con plasma acoplado inductivamente ("ICP-MS," Agilent 7500A; Agilent Technologies, Palo Alto, CA).

Las plantas mutantes, que no se presentan en la naturaleza, o transgénicas, que se describen en la presente pueden tener otros usos en agricultura, por ejemplo. Por ejemplo, las plantas mutantes, que no se presentan en la naturaleza o transgénicas, descritas en la presente, pueden usarse para hacer alimento para animales y productos de alimento humano. Las semillas de las plantas descritas en la presente pueden condicionarse y embolsarse en material para empacar, por medios conocidos en el arte para formar un artículo de manufactura. El material para empacar, tal como el papel o el paño, es bien conocido en el arte. Un paquete de semillas puede tener una marca, por ejemplo una etiqueta o marca asegurada al material para empacar o una etiqueta impresa en el material para empacar, o una marca insertada dentro del paquete, que describe la naturaleza de las semillas allí dentro. Una planta que porta un alelo NtMRP mutante

puede usarse en un programa de cultivo de planta para crear líneas, variedades e híbridos útiles. En particular, el alelo NtMRP mutante es sometido a introgresión a las variedades comercialmente importantes descritas arriba. De esta manera, se proporcionan métodos para cultivar plantas que comprenden cruzar una planta mutante, una planta que no se presenta en la naturaleza o una planta transgénica, tal como se describe en la presente, con una planta que comprende una identidad genética diferente. El método puede comprender además cruzar la planta progenitora con otra planta y opcionalmente repetir el cruce hasta obtener una progenie con los atributos genéticos deseables o el antecedente genético deseable. Un propósito servido por tales métodos de cultivo es introducir un atributo genético deseable a otras variedades, líneas de cultivo, híbridos o variedades cultivadas, particularmente aquellos que son de interés comercial. Otro propósito es facilitar apilar modificaciones genéticas de genes diferentes en una variedad vegetal, líneas, híbridos o variedades cultivadas individuales. Están contemplados cruces intraespecíficos así como también interespecíficos. Las plantas progenitoras que surgen de tales cruces, denominados también líneas de cultivo, son ejemplos de plantas que no se presentan en la naturaleza.

En una modalidad se proporciona un método para producir una planta que no se presenta en la naturaleza que comprende: (a) cruzar una planta mutante o transgénica con una segunda planta para producir semillas de progenie; (b) cultivar las semillas de progenie en condiciones de crecimiento de plantas, para producir la planta que no se presenta en la naturaleza. El método puede comprender además: (c) cruzar la generación previa de la planta que no se presenta en la naturaleza consigo misma o con otra planta para producir semillas de progenie; (d) cultivar semillas de progenie del paso (c) en condiciones de crecimiento de plantas, para proporcionar plantas adicionales que no se presentan en la naturaleza; y (e) repetir los pasos del cruce y del cultivo de (c) y (d) múltiples veces para generar más generaciones de plantas que no se presentan en la naturaleza. El método puede comprender opcionalmente antes del paso (a), un paso de proporcionar una planta progenitora que comprende una identidad genética que es caracterizada y que no es idéntica a la planta mutante o transgénica. En algunas modalidades, dependiendo del programa de cultivo, los pasos de cruce y de cultivo se repitan de 0 a 2 veces, de 0 a 3 veces, de 0 a 4 veces, 0 a 5 veces, de 0 a 6 veces, de 0 a 7 veces, de 0 a 8 veces, de 0 a 9 veces o de 0 a 10 veces, a fin de generar generaciones de plantas que no se presentan en la naturaleza. El retrocruce es un ejemplo de tal método en el que una progenie se cruza con una de sus progenitoras u otra planta genéticamente similar a su progenitora, a fin de obtener una planta de progenie en la siguiente generación que tiene una identidad genética que es más cercana a aquella de una de sus progenitoras. Son bien conocidas las técnicas para cultivar plantas, particularmente cultivo de plantas de tabaco y pueden usarse en los métodos descritos en la presente. La divulgación proporciona además plantas que no se presentan en la naturaleza producidas mediante estos métodos.

En algunas modalidades de los métodos descritos en la presente, se evalúan líneas que dan lugar a cultivo y cribado para genes NtMRP variantes en el campo usando procedimientos de campo estándar. Están incluidos genotipos de control que incluyen la progenitora original no mutagenizada y las entradas se disponen en el campo en un diseño de bloque aleatorio o en otro diseño de campo apropiado. Para el tabaco se usan prácticas agronómicas estándar; por ejemplo, se cosecha el tabaco, se pesa y se

muestrea para ensayos químicos y para otros comunes, antes y después del curado. Los análisis estadísticos de los datos se efectúan para confirmar el complemento de cromosoma y relaciones de emparejamiento de cromosoma.

Huellas dactilares de AND, polimorfismo nucleótido individual, marcadores microsatélite o tecnologías similares pueden usarse en un programa de cultivo de selección asistida por marcador (MAS, por marker-assisted selection) para transferir o cultivar alelos mutantes del (de los) gen(es) NtMRP a otros tabacos, tal como se describe en la presente. Por ejemplo, un cultivador puede crear poblaciones segregantes a partir de la hibridación de un genotipo que contiene un alelo mutante con un genotipo agronómicamente deseable. Las plantas en las generaciones F2 o de retrocruce pueden cribarse usando un marcador desarrollado a partir de una(s) secuencia(s) genómica(s) NtMRP o un(os) fragmento(s) de las mismas, usando una de las técnicas listadas en la presente. Las plantas identificadas por poseer el alelo mutante puede ser retrocruzada o auto-polinizada para crear una segunda población a ser cribada. Dependiendo del patrón de herencia esperado o la tecnología de MAS usada, puede ser necesario auto-polinizar las plantas seleccionadas antes de cada ciclo de retrocruce para ayudar a la identificación de las plantas individuales deseadas. El procedimiento de retrocruce u otro de cultivo pueden repetirse hasta que se recupere el fenotipo deseado de la progenitora recurrente.

De acuerdo con la divulgación, en un programa de cultivo, cruces exitosos producen plantas F1 que son fértiles. Las plantas F1 seleccionadas pueden cruzarse con una de las progenitoras, y las primeras plantas de retrocruce se auto-polinizan para producir una población que se criba nuevamente para expresión de gen NtMRP variante (por ejemplo, la versión nula del gen NtMRP). El proceso de retrocruce, auto-polinización y cribado se repite, por ejemplo, al menos 4 veces hasta que el cribado final produce una planta que es fértil y razonablemente similar a la progenitora recurrente. Esta planta, si se desea, se auto-poliniza y la progenie se criba a continuación una vez más para confirmar que la planta exhibe expresión de gen NtMRP variante. En algunas modalidades, una población de plantas en la generación F2 se criba para expresión de gen NtMRP variante, por ejemplo, se identifica una planta que falla al expresar NtMRP debido a la ausencia de un gen NtMRP de acuerdo con métodos estándar, por ejemplo, usando un método PCR con cebadores con base en la información de secuencia de nucleótido para NtMRP, descrita en la presente.

Pueden producirse variedades híbridas previniendo la autopolinización las plantas progenitoras femeninas (es decir, progenitoras de semillas) de una primera variedad, permitiendo que el polen de plantas progenitoras masculinas de una segunda variedad fertilice las plantas progenitoras femeninas, y permitiendo que las semillas híbridas F1 se formen en las plantas femeninas. Puede impedirse la auto-polinización de plantas femeninas masculinizando las flores en una etapa temprana del desarrollo de la flor. De modo alternativo, puede impedirse la formación de polen en plantas progenitoras femeninas usando una forma de esterilidad masculina. Por ejemplo, la esterilidad masculina puede producirse mediante esterilidad masculina citoplásmica (CMS, por cytoplasmic male sterility), o esterilidad masculina transgénica en cuyo caso un transgén inhibe la microesporogénesis y/o la formación de polen, o la auto-incompatibilidad. Las plantas progenitoras femeninas que contienen CMS son particularmente útiles. En

modalidades en las que las plantas progenitoras femeninas son CMS, se cosecha polen de las plantas fértiles masculinas y se aplica manualmente a los estigmas de plantas progenitoras femeninas de CMS, y la semilla F1 resultante se cosecha. Las variedades y líneas descritas en la presente pueden usarse para formas híbridos F1 de cruce individual. En tales modalidades, las plantas de las variedades progenitoras pueden cultivarse como poblaciones colindantes sustancialmente homogéneas para facilitar polinización cruzada natural desde las plantas progenitoras masculinas a las plantas progenitoras femeninas. La semilla F1 formada en las plantas progenitoras femeninas se cosecha selectivamente por medios convencionales. También pueden cultivarse las dos variedades de plantas progenitoras en masa y cosechar una mezcla de semillas híbridas F1 formadas en la progenitora femenina y semillas formadas en la progenitora masculina como resultado de la auto-polinización. De modo alternativo, pueden llevarse a cabo cruces de tres modos en cuyo caso se usa una progenitora femenina y se cruza con una progenitora masculina diferente. Como otra alternativa pueden crearse híbridos de doble cruce en cuyo caso la progenie F1 de dos cruces individuales diferentes se cruzan ellos mismos. Una población de plantas mutantes, que no se presentan en la naturaleza, o transgénicas, puede cribarse o seleccionarse para aquellos miembros de la población que tienen un atributo o fenotipo deseado. Por ejemplo, una población de progenie de un solo evento de transformación puede cribarse para aquellas plantas que tienen un nivel deseado de expresión de polipéptido o polinucleótido NtMRP. Pueden usarse métodos físicos o bioquímicos para identificar niveles de expresión. Estos incluyen análisis Southern o amplificación PCR para detección de un polinucleótido; Northern blots, protección S1 RNasa, extensión de cebador, o amplificación RT-PCR para detectar transcritos de ARN; ensayos enzimáticos para detectar actividad de enzima o ribozima de polipéptidos y polinucleótidos; y electroforesis de proteína en gel, Western blots, inmunoprecipitación, e inmunoensayos ligados con enzima para detectar polipéptidos. Otras técnicas tales como la hibridación in situ, tinturado de enzima, e inmunotinturado también pueden usarse para detectar la presencia o la expresión de polipéptidos o polinucleótidos.

Las células vegetales y las plantas mutantes, que no se presentan en la naturaleza, o transgénicas, son descritas en la presente y comprenden uno o varios polinucleótidos recombinantes, tales como uno o varios polinucleótidos NtMRP aislados, uno o varios constructos de polinucleótido, uno o varios ARNs bicatenarios, uno o varios conjugados o uno o varios vectores/vectores de expresión.

La expresión de NtMRP puede evaluarse usando métodos que incluyen, por ejemplo, RT-PCR, Northern blots, protección de RNasa, extensiones de cebadores, Western blots, electroforesis de proteína en gel, inmunoprecipitación, inmunoensayos ligados a enzima, ensayos chip, y espectrometría de masas. Debe notarse que si un polipéptido es expresado bajo el control de un preferencial de tejido o promotor de expresión amplia, la expresión puede evaluarse en toda la planta o en un tejido seleccionad. De modo similar, si un polipéptido es expresado en un tiempo particular, por ejemplo, en un tiempo particular en el desarrollo o al cabo de la inducción, la expresión puede evaluarse selectivamente en un período de tiempo deseado.

Sin limitación, las plantas descritas en la presente pueden modificarse para otros propósitos ya sea antes o después de que la expresión o actividad de NtMRP haya sido modulada (por ejemplo, reducida o inhibida). Una o varias de las siguientes modificaciones genéticas pueden estar presentes en las plantas mutantes, que no se presentan en la naturaleza, o transgénicas. En una modalidad, uno o varios genes más que están involucrados en la absorción de metal pesado o en el transporte de metal pesado se modifican dando lugar a plantas o partes de plantas (tales como hojas) que tienen un contenido más bajo de metal pesado que las plantas de control o partes de las mismas sin la(s) modificación(es). Ejemplos no limitantes incluyen genes en la familia de facilitadores de difusión de catión (CDF por cation diffusion facilitators), la familia de proteínas de tipo Zrt, Irt (ZIP), la familia de intercambiadores de catión (CAX), la familia de transportadores de cobre (COPT), la familia de ATPasas del tipo P de metal pesado (HMAs, tal como se describe en WO2009074325), la familia de homólogos de proteínas macrófagas asociadas a la resistencia natural (NRAMP), y otro miembro de la familia de transportadores del casete que enlaza ATP (ABC), los cuales participan en el transporte de metales pesados, tal como cadmio. El término metal pesado tal como se usa en la presente incluye metales de transición. En otra modalidad, uno o varios genes que están involucrados en la conversión de intermediarios metabólicos nitrogenados se modifican dando lugar a plantas o a partes de plantas (tales como hojas) que cuando se calientan producen niveles más bajos de al menos una nitrosoamina específica del tabaco (por ejemplo, 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona, N-nitrosonornicotina, N-nitrosoanatabina, y N-nitrosoanabasina) que las plantas de control o partes de las mismas. Ejemplos no limitantes de genes que pueden modificarse incluyen genes que codifican una demetilasa de nicotina, tal como CYP82E4, CYP82E5 y CYP82E10 que participan en la conversión de nicotina a nornicotina y se describen en WO2006091194, WO2008070274, WO2009064771 y PCT/US2011/021088.

Ejemplos de otras modificaciones incluyen tolerancia herbicida, por ejemplo, glifosato es un ingrediente activo de muchos herbicidas de amplio espectro. Han sido desarrolladas plantas transgénicas resistentes al glifosato transfiriendo el gen *aroA* (una sintetasa EPSP de glifosato a partir de *Salmonella typhimurium* y *E.coli*). Plantas resistentes a sulfonilureas han sido producidas transformando el gen ALS (acetolactato sintetasa) mutante de *Arabidopsis*. Proteína OB de fotosistema 11 a partir *Amaranthus hybridus* mutante ha sido transferido a plantas para producir plantas transgénicas resistentes a atrazina; y plantas transgénicas resistentes a bromoxinilo han sido producidas incorporando el gen *bxn* de la bacteria *Klebsiella pneumoniae*. Otra modificación ejemplar da lugar a plantas que son resistentes a los insectos. Las toxinas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) pueden proporcionar una forma efectiva de retardar la emergencia de pestes resistentes a Bt, tal como recientemente se ilustró en brócoli donde los genes *cry1Ac* y *cry1C* Bt con forma de pirámide controlaron polillas espalda de diamante, resistentes a proteína individual y retardaron significativamente la evolución de insectos resistentes. Otra modificación ejemplar da lugar a plantas que son resistentes a enfermedades causadas por patógenos (por ejemplo, virus, bacterias, hongos). Plantas que expresan el gen *Xa21* (resistencia a plaga bacteriana) han sido manipuladas mediante ingeniería con plantas que expresan tanto un gen de fusión Bt como un gen de quitinasa (resistencia a perforador de tallo amarillo y tolerancia a vaina). Otra modificación ejemplar da lugar a

capacidad reproductiva alterada, tal como la esterilidad masculina. Otra modificación ejemplar da lugar a plantas que son tolerantes a estrés abiótico (por ejemplo, sequía, temperatura, salinidad) y han sido producidas plantas transgénicas tolerantes transfiriendo enzima de acil glicerol fosfato a partir de *Arabidopsis*; los genes que codifican manitol dehidrogenasa y sorbitol dehidrogenasa que participan en la síntesis de manitol y sorbitol mejoran la resistencia a la sequía. Otra modificación ejemplar da lugar a plantas que producen proteínas que tienen propiedades inmunogénicas favorables para usar en humanos. Por ejemplo, pueden ser útiles plantas capaces de producir proteínas sustancialmente con falta de residuos de fucosa enlazada alfa-1,3, residuos de xilosa enlazada beta-1,2, o ambos, en su N-glicano. Otras modificaciones ejemplares pueden dar lugar a plantas con proteínas y aceites de almacenamiento mejorado, plantas con eficiencia fotosintética mejorada, plantas con tiempo de almacenamiento prolongado, plantas con contenido de carbohidrato mejorado, y plantas resistentes a hongos; plantas que codifican una enzima involucrada en la biosíntesis de alcaloides.

También están contempladas plantas transgénicas en las que la expresión de S-adenosil-L-metionina (SAM) y/o cistationina gama-sintasa (CGS) ha sido modulada.

Sin limitación, las plantas descritas en la presente pueden ser modificadas aún más. Ejemplos tales modificaciones adicionales incluyen, pero no se limitan a: (a) plantas que pueden tolerar herbicidas. Por ejemplo, glifosato es un ingrediente activo de muchos herbicidas de amplio espectro. Han sido desarrolladas plantas transgénicas resistentes transfiriendo el gen *aroA* (una sintetasa EPSP de glifosato a partir de *Salmonella typhimurium* y *E.coli*); han sido producidas plantas resistentes a sulfonilurea transformando el gen *ALS* (sintetasa de acetolactato) mutante a partir de *Arabidopsis*; Proteína OB de fotosistema 11 a partir de *Amaranthus hybridus* mutante ha sido transferido a plantas para producir plantas transgénicas resistentes a atrazina; y plantas transgénicas resistentes a bromoxinilo han sido producidas incorporando el gen *bxn* a partir la bacteria *Klebsiella pneumoniae*; (b) plantas son resistentes a insectos. Las toxinas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) pueden proporcionar una manera efectiva de retardar la emergencia de plagas resistentes a Bt, tal como recientemente se ha ilustrado en brócoli donde genes *cry1Ac* y *cry1C* de Bt con forma de pirámide controlaron polillas espalda de diamante resistentes a cualquier proteína individual y retardaron significativamente la evolución de insectos resistentes; (c) plantas que son resistentes a virus de mosaico de tabaco. Han sido producidas plantas introduciendo proteínas de recubrimiento viral. Otras plantas transgénicas resistentes a virus incluyen plantas de papa resistente al virus de la papa, arroz resistente a RSV, y lenteja negra y poroto chino resistentes a YMV; (d) plantas que son resistentes a bacterias. Han sido manipuladas mediante ingeniería plantas que expresan el gen *Xa21* (resistencia a plaga bacteriana) con plantas que expresan tanto un gen de fusión Bt como un gen quitinasa (resistencia a perforador de tallo amarillo y tolerancia a vaina); (e) plantas transgénicas tolerantes al estrés: han sido producidas plantas transgénicas tolerantes al frío transfiriendo enzima de acil glicerol fosfato desde *Arabidopsis*; los genes que codifican dehidrogenasa de manitol y dehidrogenasa de sorbitol que participan en la síntesis de manitol y sorbitol mejoran la resistencia a la sequía; (f) plantas que producen proteínas que tienen propiedades inmunogénicas favorables para usar en humanos. Por ejemplo, pueden ser útiles plantas capaces de producir proteínas que sustancialmente carecen de residuos de fucosa

enlazada por alfa-1,3, residuos de xilosa enlazada por beta-1,2, o ambos, en su N-glicano; y (g) otros ejemplos de plantas transgénicas son plantas con proteínas y aceites de almacenamiento, plantas con eficiencia fotosintética mejorada, plantas con vida útil de almacenamiento prolongada, plantas con contenido mejorado de carbohidrato y plantas resistentes a hongos; plantas que codifican una enzima involucrada en la biosíntesis de alquiloides; genes para una vía de detoxificación orgánica bacteriana de mercurio (reductasa mercúrica, *merA*) y liasa organomercúrica, *merB* se combinaron por cruce en *Arabidopsis*, y plantas que expresan ambos genes fueron capaces de crecer en concentraciones de metilmercurio 50 veces más altas que las plantas de tipo silvestre. Uno o varios de tales atributos pueden someterse a introgresión a las plantas de tabaco mutantes, que no se presentan en la naturaleza o transgénicas desde otras variedades cultivadas de tabaco o pueden transformarse directamente en ellas.

La introgresión del(los) atributos a las plantas de tabaco mutantes, que no se presentan en la naturaleza, o transgénicas puede lograrse por cualquier método de cultivo de plantas conocido en el arte, por ejemplo, cultivo genealógico, retrocruzamiento, cultivo doble haploide, y similares (véase, Wernsman, E. A, y Rufty, R. C. 1987. Capítulo diecisiete. Tabaco. Páginas 669-698 en: Desarrollo de variedades de cultivo. *Especies de cosecha*. W. H. Fehr (ed.), MacMillan Publishing Co, Inc., New York, N.Y 761 pp.).

Las técnicas con base en biología molecular arriba descritas, en particular RFLP y marcadores microsatélite, pueden usarse en tales retrocruces para identificar las progenies que tiene el más alto grado de identidad genética con la progenitora recurrente. Esto permite acelerar la producción de variedades que tienen al menos 90%, preferiblemente al menos 95%, más preferiblemente al menos 99% de identidad genética con la progenitora recurrente, incluso más preferiblemente genéticamente idéntica a la progenitora recurrente y además comprenden el(los) atributo(s) sometidos a introgresión desde la progenitora donante. Tal determinación de identidad genética puede basarse en marcadores moleculares conocidos en el arte. La última generación de retrocruce puede ser auto-sembrada para dar progenie de cultivo puro para el(los) polinucleótido(s) a ser transferidos. Las plantas resultantes tienen en términos generales, esencialmente, todas las características morfológicas y fisiológicas de las plantas mutantes, que no se presentan en la naturaleza, o transgénicas, en adición al (los) atributo(s) (por ejemplo, uno o varios atributos de gen individuales). El protocolo de retrocruzamiento exacto dependerá del atributo que es alterado para determinar un protocolo de ensayo apropiado. Aunque los métodos de retrocruzamiento son simplificados cuando el atributo que se transfiere es un alelo dominante, también puede transferirse un alelo recesivo. En este caso puede ser necesario introducir un ensayo de la progenie para determinar si el atributo deseado ha sido transferido exitosamente.

Diversas modalidades proporcionan plantas mutantes, plantas que no se presentan en la naturaleza o plantas transgénicas, así como biomasa en la que el nivel de expresión de polinucleótido NtMRP se reduce de modo que allí se acumulan cantidades más bajas de cadmio. Partes de tales plantas, particularmente plantas de tabaco, y más particularmente la lámina y la nervadura principal de la hoja de las plantas de tabaco, pueden incorporarse o usarse para hacer diversos productos consumibles que incluyen, pero no se limitan a, materiales que forman aerosoles, dispositivos que forman aerosoles, artículos para fumar,

artículos fumables, productos sin humo y productos de tabaco. Ejemplos de materiales que forman aerosoles incluyen pero no se limitan a composiciones de tabaco, tabacos, extracto de tabaco, Tabaco cortado, relleno cortado, tabaco curado, tabaco expandido, tabaco homogenizado, tabaco reconstituido, y tabacos para pipa. Artículos para fumar y artículos fumables son tipos de dispositivos que forman aerosol. Ejemplos de artículos para fumar o artículos fumables incluyen pero no se limitan a cigarrillos, puros y cigarros. Ejemplos de productos sin humo comprenden tabacos masticables, y rapé. En ciertos dispositivos que forman aerosol, en lugar de la combustión, se calienta una composición de tabaco u otro material que forma aerosol mediante uno o varios elementos de calentamiento eléctrico para producir un aerosol. En otro tipo de dispositivo que forma aerosol, que se calienta, se produce un aerosol mediante transferencia de calor desde un elemento de combustible o fuente de calor a un material físicamente separado que forma aerosol, que puede estar localizado dentro, alrededor o corriente abajo de la fuente de calor. Productos de tabaco sin humo y diversos materiales que forman aerosol, que contienen tabaco, pueden contener tabaco en cualquier forma, incluyendo partículas secas, tiras, gránulos, polvos o una pasta en suspensión, depositados en, mezclados con, rodeados por, o combinados de alguna otra manera con otros ingredientes en cualquier formato, tal como hojuelas, películas, barras, espumas o cuentas. Tal como se usa en la presente, el término 'humo' se usa para describir un tipo de aerosol que se produce fumando artículos tales como cigarrillos, o por combustión de un material que forma aerosol. En una modalidad, también se proporciona material curado a partir de las plantas mutantes, transgénicas y que no se presentan en la naturaleza descritas en la presente. Las personas versadas en la materia conocen procesos para curar hojas de tabaco verde; estos incluyen, sin limitación, curado al aire, curado al fuego, curado a fuego indirecto (en chimenea) y curado al sol. El proceso de curado de hojas de tabaco verde depende del tipo de tabaco cosechado. Por ejemplo, el tabaco Virginia de chimenea (iluminada) se cura típicamente en chimenea; las cepas Burley y ciertas cepas oscuras se curan usualmente al aire; y el tabaco de pipa, tabaco para mascar y el rapé usualmente se curan al fuego.

En otra modalidad, se describen productos de Tabaco que incluyen materiales que forman aerosol, que comprenden hojas, preferiblemente hojas curadas, de las plantas de tabaco mutantes, plantas de tabaco transgénicas o plantas de tabaco que no se presentan en la naturaleza, descritas en la presente.

Los productos de tabaco descritos en la presente pueden ser productos de tabaco mezclado que además pueden comprender tabaco no modificado.

Las plantas mutantes, que no se presentan en la naturaleza o transgénicas pueden tener otros usos, por ejemplo en la agricultura. Por ejemplo, las plantas mutantes, que no se presentan en la naturaleza, o transgénicas descritas en la presente pueden usarse para hacer alimento para animales y productos alimenticios para humanos. La divulgación también proporciona métodos para producir semillas que comprenden cultivar la planta mutante, la planta que no se presenta en la naturaleza, o la planta transgénica descrita en la presente, y recoger las semillas de las plantas cultivadas. Las semillas de las plantas descritas en la presente pueden acondicionarse y embolsarse en material para empacar por medios conocidos en la técnica para formar un artículo de manufactura. El material

para empacar, como el papel o el paño, es bien conocido en la técnica, un paquete de semillas puede tener una marca, por ejemplo, una etiqueta o marca asegurada al material para empacar, una marca impresa sobre el material para empacar o una marca insertada con el paquete, que describe la naturaleza de las semillas dentro. Composiciones, métodos y kits para plantas genotipificadas para identificación, selección, o cultivo están comprendidos en la divulgación y pueden comprender un medio para detectar la presencia de un polinucleótido NtMRP en una muestra de polinucleótido. Por consiguiente, se describe una composición que comprende uno o más cebadores para amplificar específicamente al menos una porción de polinucleótido NtMRP y opcionalmente una o varias sondas y opcionalmente uno o varios reactivos para efectuar la amplificación o detección.

Por consiguiente, se divulgan cebadores o sondas de oligonucleótidos específicos de gen que comprenden alrededor de 10 o más polinucleótidos contiguos que corresponden al polinucleótido NtMRP. Dichos cebadores o sondas pueden comprender o consistir en alrededor de 15, 20, 25, 30, 40, 45 o 50 polinucleótidos más contiguos que hibridan (por ejemplo, hibridan específicamente) al polinucleótido NtMRP. En algunas modalidades, los cebadores o sondas pueden comprender o consistir en alrededor de 10 a 50 nucleótidos contiguos, alrededor de 10 a 40 nucleótidos contiguos, alrededor de 10 a 30 nucleótidos contiguos o alrededor de 15 a 30 nucleótidos contiguos que pueden usarse en métodos dependientes de secuencia para identificación de genes (por ejemplo, hibridación Southern) o aislamiento (por ejemplo, hibridación *in situ* de colonias bacterianas o placas bacteriófagas) o detección de gen (por ejemplo, como uno o varios cebadores de amplificación en amplificación o detección de polinucleótido). Los cebadores o sondas, uno o varios, pueden diseñarse y usarse para amplificar o detectar una parte o todo el polinucleótido NtMRP. A manera de ejemplo específico, pueden usarse dos cebadores en un protocolo de reacción en cadena de polimerasa para amplificar un fragmento de polinucleótido que codifica polinucleótido NtMRP – tal como ADN o ARN. La reacción en cadena de polimerasa también puede realizarse usando un cebador que se deriva de la secuencia de polinucleótido NtMRP y un segundo cebador que hibrida a una secuencia en dirección ascendente o descendente de la secuencia de polinucleótido NtMRP, tal como una secuencia de promotor de NtMRP, el extremo 3' del precursor de ARNm o una secuencia derivada de un vector. Ejemplos de técnicas térmicas e isotérmicas útiles para amplificación *in vitro* de polinucleótidos son bien conocidos en la técnica. La muestra puede ser o puede derivarse de una planta, una célula vegetal o material vegetal o un producto hecho o derivado de la planta, la célula vegetal o el material vegetal tal como se describe en la presente.

De esta manera, en otro aspecto, también se proporciona un método de detección de un polinucleótido NtMRP en una muestra que comprende el paso de: (a) proporcionar una muestra que comprende, o se sospecha que comprende, un polinucleótido; (b) poner en contacto dicha muestra con uno o varios cebadores o una o varias sondas para detectar específicamente al menos una porción del polinucleótido NtMRP; y (c) detectar la presencia de un producto de amplificación, en cuyo caso la presencia de un producto de amplificación es indicativa de la presencia del polinucleótido NtMRP en la muestra. En un aspecto más, también se proporciona el uso de uno o más cebadores o sondas para detectar específicamente al menos una porción de polinucleótido NtMRP. También se

proporcionan kits para detectar al menos una porción del polinucleótido NtMRP, que comprenden uno o varios cebadores o sondas para detectar específicamente al menos una porción de polinucleótido NtMRP. El kit puede comprender reactivos para amplificación de polinucleótido – tales como reactivos para reacción en cadena de polimerasa (PCR por *polymerase chain reaction*) - o reactivos para tecnología de detección de hibridación de sonda de polinucleótido – tal como Southern Blots, Northern Blots, hibridación in-situ, o micro selección. El kit puede comprender reactivos para tecnología de detección de enlace de anticuerpo, tal como Western Blots, ELISAs, espectrometría de masas SELDI o tiras para ensayos. El kit puede comprender reactivos para secuenciación de ADN. El kit puede comprender reactivos y/o instrucciones para determinar el contenido de metal pesado, tal como cadmio. En algunas modalidades, un kit puede comprender instrucciones para uno o varios de los métodos descritos. Los kits descritos pueden ser útiles para determinación de identidad genética, estudios filogenéticos, genotipificación, haplotipificación, análisis genealógico o cultivos de plantas particularmente con puntaje co-dominante.

La presente divulgación también proporciona un método de genotipificación de una planta, una célula vegetal o material vegetal que comprende un polinucleótido NtMRP. La genotipificación proporciona un medio para distinguir homólogos de un par de cromosoma y puede usarse para diferenciar segregantes en una población de plantas. Pueden usarse métodos de marcador molecular para estudios filogenéticos que caracterizan relaciones genéticas entre variedades de cultivos, identifican cruzamientos o híbridos somáticos, localizan segmentos cromosómicos que afectan atributos monogénicos, clonan a base de mapas y el estudio de herencia cuantitativa. El método específico de genotipificación puede emplear cualquier número de técnicas analíticas de marcador molecular que incluyen polimorfismos de longitud de fragmento por amplificación (AFLPs, por *amplification fragment length polymorphisms*). AFLPs son el producto de diferencias alélicas entre fragmentos de amplificación causados por la secuencia de variabilidad del nucleótido. De esta manera, se describe un medio para seguir la segregación de NtMRP así como también secuencias cromosómicas enlazadas genéticamente a estos genes o polinucleótidos usando tales técnicas como análisis de AFLP.

La invención se describirá además en los siguientes ejemplos, que no pretenden limitar el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se proporcionan como una ilustración y no como una limitación. A menos que se indique algo distinto, se emplean técnicas convencionales y métodos de biología molecular, biología vegetal, bioinformática, y cultivo de plantas.

Ejemplo 1: Identificación de la secuencia genómica de ADN NtMRP3

Librería BAC de tabaco BAC. Una librería de cromosoma artificial bacteriano (BAC por *Bacterial Artificial Chromosome*) se prepara como sigue: se aíslan los núcleos de las hojas de plantas de la variedad *Nicotiana tabacum*, de hoja ancha de Hicks, cultivadas en invernaderos. Se aísla ADN de alto peso molecular de los núcleos de acuerdo con protocolos estándar y se digiere parcialmente con BamHI y HindIII y se clona en los sitios

BamHI o HindIII del vector BAC pINDIG05. Se obtienen más de 320,000 clones con una longitud de inserto promedio de 135 mega pares de bases que cubren aproximadamente 9.7 veces el genoma del tabaco.

Ensamblaje de la secuencia de genoma de tabaco. Se somete a secuenciación un gran número de clones BAC elegidos al azar usando el método de Sanger que genera más de 1,780,000 secuencias crudas de una longitud promedio de 550 pares de bases. Se aplica filtro de metilo usando una cepa Mcr⁺ de *Escherichia coli* para transformación y se aísla solo ADN hipometilado. Todas las secuencias se ensamblan usando ensamblador de genoma CELERA produciendo más de 800,000 secuencias que comprenden más de 200,000 clones solapados y 596,970 secuencias individuales. Los tamaños de clones solapados están entre 120 y 15,300 pares de bases con una longitud promedio de 1,100 pares de bases.

La secuencia genómica de ADN NtMRP3 es identificada mediante secuenciación de una parte del genoma que contiene BAC la cual incluye ADN NtMRP3. Las secuencias se describen en la figura 6.

Ejemplo 2: Transformación de variedades de tabaco con vectores de expresión de iARN NtMRP3

Se esterilizan semillas de Tabaco y se germinan en una caja de Petri que contiene medios basales MS suplementados con 5 ml/L de mezcla preservativa de planta (PPM por plant preservative mixture). Las plántulas, aproximadamente a los 7 a 10 días después de la germinación, se seleccionan para la transformación con diversos vectores de expresión de iARN NtMRP3. Una sola colonia de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 es inoculada a un medio LB líquido que contiene 50 mg l⁻¹ de kanamicina (monosulfato de kanamicina), y se incuba por 48 h a 28°C con agitación recíproca (150 ciclos min⁻¹). Las células cultivadas se recogen mediante centrifugación (6000x g, 10 min), y se suspenden hasta una densidad final de 0.4-0.7 OD₆₀₀, con 20 ml de medio MS líquido que contiene 20g⁻¹ de sacarosa. Los explantes de plántulas de 7-10 días se sumergen en suspensión bacteriana por 5 minutos y se someten a blot sobre papeles de filtro estériles. Se colocan cincuenta explantes en alícuotas de 40 ml de medio REG agar (medio basal MS suplementado con 0.1 mg l⁻¹ de ácido 1-naftalinoacético (NAA) y 1 mg l⁻¹ de bencilaminopurina (BAP)) en cajas de petri de 100 mm X 20 mm. Los explantes se cultivan conjuntamente con *Agrobacterium* a 25°C. Después de 3 días de cultivo conjunto, los explantes se lavan y se transfieren a medio RCPK (medio REG con 100 mg⁻¹ kanamicina, 500 mg l⁻¹ de carbenicilina, y 5ml de PPM) para seleccionar transformantes. Los explantes se sub-cultivan cada 2 semanas. Después de 8-12 semanas de crecimiento en condiciones selectivas, las plantas sobrevivientes que representan transformantes que tienen los constructos de expresión de iARN NtMRP3 integrados a sus genomas se transfieren a un medio de arraigamiento (medio basal MS suplementado con 100 mg l⁻¹ de kanamicina). Las plantas arraigadas se transfieren a materas para promover el crecimiento ulterior.

Ejemplo 3: Expresión de polinucleótido NtMRP3 en plantas de tabaco

Para determinar la expresión de polinucleótido NtMRP3, se aísla ARN celular total de diversas partes de las plantas. El ARN total se aísla usando reactivo TRI® (Sigma-Aldrich,

St. Louis, MO). Para retirar impurezas de ADN, se trata ARN purificado con DNasa libre de RNasa (libre de ADN TURBO, Ambion, Austin TX). Para sintetizar la primera hebra de ADNc, aproximadamente 10 µg de ARN total se transcribe de modo inverso utilizando el kit de High Capacity cDNA Archive (Applied Biosystems, Foster City, CA). Para medir el nivel de transcritos de NtMRP3 en las muestras, se efectúa un paso 2 cuantitativo RT-PCR de acuerdo con la química con base en sonda de Taqman MGB. La mezcla RT contiene 4 µM de mezcla de dNTP, 1X cebadores aleatorios, 1X RT búfer, 10 g de ADNc, 50U de Multiscribe Reverse transcriptase (transcriptasa inversa) (Applied Biosystems), 2U de inhibidor de RNasa Superase-In (Ambion), y agua libre de nucleasa. La mezcla PCR contiene 1X Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), 400 nM de cebador avanzado, 400 nM de cebador inverso, 250 nM de sonda Taqman MGB, 2 ng de ADNc, y agua libre de nucleasa. RT-PCR se efectúa utilizando un sistema en tiempo real ABI 7500 Real-Time System (Applied Biosystems, Foster City, CA) y en condiciones de amplificación: 50°C por 2 min.; 95°C por 10 min.; 40 ciclos de 95°C por 15 segundos.; y 60°C por 1 min.

Ejemplo 4: Silenciamiento de expresión de polinucleótido NtMRP3 en plantas de tabaco

Una primera secuencia parcial que codifica para un transcrito de NtMRP3 putativo se encuentra usando anotaciones de iniciativa de genoma de tabaco (TGI por Tobacco Genome Initiative). Desde esta secuencia particular se generan cebadores para silenciar expresión de polinucleótido NtMRP3 en tabaco usando un enfoque iARN. La secuencia de iARN NtMRP3 correspondiente se amplifica desde ADNc mediante RT-PCR y luego se inserta al vector de entrada pB7GWIWG2(1) por medio de un vector de entrada, exactamente como se detalla por parte del fabricante (Invitrogen). Este vector contiene un promotor para expresión constitutiva (promotor del virus de mosaico de coliflor CaMV 35S) del transgén en todos los tejidos de la planta y el gen bar para selección de herbicida con Basta en placas de agar (30 mg/ml). El constructo se inserta luego al genoma del tabaco Burley KY14 por medio de *Agrobacterium tumefaciens* usando un procedimiento de disco de hoja clásico. De los callos se regeneran líneas individuales y se seleccionan en Basta. Las líneas de silenciamiento de iARN se monitorean luego mediante RT-PCR y se cultivan para producción de semillas. Se recogen semillas T1, se re cultivan en placas de agar que contienen Basta para selección y las plantas resistentes se cultivan en bandejas flotantes antes de cultiva en el campo.

Aproximadamente 500 mg de la planta se pesa y se digiere en 10 ml de HNO₃ mediante un sistema de reacción 6, sistema de digestión (CEM corporación, Mathews, NC) acelerado por microondas. Se analizan concentraciones de metal pesado utilizando espectrometría de masas- plasma acoplado de modo inductivo ("ICP-MS," Agilent 7500A; Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Como control de tabaco no transgénico, se prepara en condiciones comparables una muestra consistente en hojas de tabaco Virginia, certificado polaco, CTA-VTL-2.

Ejemplo 5: Identificación de la secuencia genómica de ADN NtMRP4

La secuencia genómica de AND NtMRP4 es identificada secuenciando una parte que contiene BAC del genoma el cual incluye ADN NtMRP4. La secuencia se describe en la figura 1.

Ejemplo 6: Transformación de variedades de tabaco con vector de expresión de iARN NtMRP4

Se esterilizan semillas de tabaco y se germinan en una caja de petri que contiene medios basales suplementados con 5 ml/L de mezcla preservativa de planta (PPM por plant preservative mixture). Se seleccionan plántulas a los aproximadamente 7 a 10 días después de la germinación para la transformación con diversos vectores de expresión de iARN NtMRP4. Una sola colonia de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 es inoculada a un medio LB líquido que contiene 50 mg l⁻¹ de kanamicina (monosulfato de kanamicina), y se incuba por 48 h a 28°C con agitación recíproca (150 ciclos min⁻¹). Se recogen células cultivadas mediante centrifugación (6000 x g, 10 min), y se suspenden hasta una densidad final de 0.4-0.7 OD₆₀₀, con 20 ml de medio MS líquido que contiene 20g⁻¹ de sacarosa. Las plántulas de 7-10 días se sumergen en una suspensión bacteriana por 5 minutos y se someten a blot en papeles de filtro estériles. Se colocan cincuenta explantes en alícuotas de 40 ml de medio agar REG (medio basal MS suplementado con 0.1 mg l⁻¹ de ácido 1-naftalinoacético (NAA) y 1 mg l⁻¹ de bencilaminopurina (BAP)) en caja de petri de 100 mm X 20 mm. Los explantes se cultivan conjuntamente con *Agrobacterium* a 25°C, después de 3 días de cultivo conjunto se lavan los explantes y se transfieren a medio RCPK (medio REG con 100 mg⁻¹ de kanamicina, 500 mg l⁻¹ de carbenicilina, y 5 ml de PPM) para seleccionar los transformantes. Los explantes se sub-cultivaron cada 2 semanas. Después de 8-12 semanas de crecimiento en condiciones selectivas, las plantas sobrevivientes que representan los transformantes que han integrado los constructos de expresión de iARN NtMRP4 a sus genomas, se transfieren a un medio de arraigamiento (medio basal MS suplementado con 10 mg l⁻¹ de kanamicina). Las plantas arraigadas se transfieren a materas para promover el crecimiento ulterior.

Ejemplo 7: Expresión de polinucleótido NtMRP4 en plantas de tabaco

Para determinar la expresión de polinucleótido NtMRP4, se aísla ARN celular total desde varias partes de las plantas. El ARN total se aísla usando reactivo TRI® (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Para retirar impurezas de AND se trata ARN purificado con DNasa libre de RNasa (ADN libre de TURBO, Ambion, Austin TX). Para sintetizar la primera hebra de ADNc, aproximadamente 10 µg de ARN total se transcribe de modo inverso utilizando el kit High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Para medir el nivel de transcritos de NtMRP4 en las muestras se efectúa un 2-paso cuantitativo RT-PCR de acuerdo con la química a base de sonda Taqman MGB. La mezcla RT contiene 4 µM de mezcla dNTP, 1X cebadores aleatorios, 1X búfer RT, 10 g de ADNc, 50U de transcriptasa inversa Multiscribe (Applied Biosystems), 2U de inhibidor de RNasa Superase-In (Ambion), y agua libre de nucleasa. La mezcla PCR contiene 1X Taqman Universal PCR Master Mix (mezcla maestro) (Applied Biosystems, Foster City, CA), 400 nM de cebador adelantado, 400 nM de cebador inverso, 250 nM de sonda MGB Taqman, 2 ng de ADNc, y agua libre de nucleasa. RT-PCR se efectúa utilizando un sistema en tiempo real ABI 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA) y en condiciones de amplificación: 50°C por 2 min.; 95°C por 10 min.; 40 ciclos de 95°C por 15 segundos.; y 60°C por 1 min.

Polinucleótido NtMRP4 es expresado en tejidos de tabaco, como se determina mediante RT-PCR usando ADNc de pétalos, troncos, pistilos, sépalos, cápsula, tallos, hojas y raíces. Cuando se cultivan plantas de tabaco en una solución hidropónica, la expresión de polinucleótido NtMRP4 es ligeramente regulada hacia arriba por cadmio en plántulas tanto en la raíz como en las hojas de *N. tabacum* (TN90, véase figura 2). Sin embargo, aunque el polinucleótido NtMRP4 se encuentra que también se ha inducido en la hoja de *N. rustica*, se observan datos opuestos en las raíces de *N. rustica* (regulación hacia abajo) en comparación con *N. tabacum*, por lo mismo sugiriendo que polinucleótido NtMRP4 puede desempeñar un papel en la acumulación de cadmio en la raíz y la tolerancia al cadmio de *N. rustica*.

Ejemplo 8: Silenciamiento de expresión de polinucleótido NtMRP4 en plantas de tabaco

Una primera secuencia parcial (CHO_SL022xb24f1.ab1) que codifica para un transcrito NtMRP4 putativo (no mostrado) se ha encontrado usando anotaciones de iniciativa de genoma de tabaco (TGI). Desde esta secuencia particular se generan cebadores para silenciar la expresión de polinucleótido NtMRP4 en tabaco usando un enfoque de iARN (figura 1). La secuencia iARN MRP4 correspondientes se amplifica desde ADNc mediante RT-PCR y luego se inserta al vector de entrada pB7GWIWG2(II) por medio de un vector de entrada, exactamente como se detalla por el fabricante (Invitrogen). Este vector contiene un promotor para la expresión constitutiva (el promotor CaMV 35S del virus de mosaico de coliflor) del transgén en todos los tejidos de la planta y el gen bar para selección de herbicida con Basta sobre placas de agar (30 mg/ml). El constructo se inserta luego al genoma del tabaco Burley KY14 por medio de *Agrobacterium tumefaciens* usando un procedimiento de disco de hoja clásico. De los callos se regeneran líneas individuales y se seleccionan en Basta. Las líneas de silenciamiento de iARN se monitorean luego mediante RT-PCR y se cultivan para producción de semillas. La figura 3 muestra que el silenciamiento de NtMRP4 es efectivo en líneas transgénicas, incluyendo líneas 1 y 2. Se recogen semillas T1, se re-cultivan en placas de agar que contienen Basta para selección y se cultivan plantas resistentes en bandejas flotantes antes de cultivarlas en el campo.

Aproximadamente 500 mg de las plantas se pesan y se digieren en 10 ml de HNO₃ concentrado mediante sistema de reacción 5 sistema de digestión (CEM corporación, Mathews, NC) acelerado por microondas. Se analizan las concentraciones de metal pesado utilizando espectrofotometría de masas – plasma acoplado de modo inductivo ("ICP-MS," Agilent 7500A; Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Como control de tabaco no transgénico se prepara en condiciones comparables una muestra consistente en hojas de tabaco Virginia, certificado polaco, CTA-VTL-2.

La figura 4 muestra una reducción de cadmio en la hoja cercano al 20% en las dos líneas de iARN NtMRP4 ensayadas (líneas 1 y 2) siguiendo dos experimentos de campo sucesivos en dos años consecutivos. En cada caso, las unidades experimentales consisten en cuatro replicados independientes de 4 plantas recolectadas (wt, líneas 1 y 2 y plantas de control de vector en el experimento de campo de segundo año) las cuales se vuelven aleatorias dentro de los bloques. Adicionalmente, se adicionan muestras de control a los bloques a fin de controlar las tendencias espaciales. Los análisis de líneas

de iARN NtMRP4 demuestran un efecto fuerte y estadísticamente significativo en la reducción del nivel medio de cadmio.

Ejemplo 9: análisis de altura y peso en plantas derivadas de plantas de tabaco en las que se silenció la expresión de polinucleótido NtMRP4.

La altura y el peso de líneas NtMRP4 silenciadas se afecta ligeramente en comparación con las plantas de control. Sin embargo, no se han encontrado diferencias significativas en las hojas recogidas secas entre plantas de iARN NtMRP4 y las plantas de tipo silvestre o plantas de control de vector, lo cual indica que la degradación de transcritos de NtMRP4 no tiene un efecto estadísticamente relevante sobre la biomasa seca. Estos datos se confirman por otro experimento de campo que muestra que AtMRP4 (homólogo al polinucleótido NtMRP4) que se sobre expresa en el mismo fondo de tabaco (KY14) conduce a 10-30% más de acumulación de cadmio en las hojas (dependiendo de líneas transgénicas). Es evidente que la degradación de ARNm que codifica para proteína NtMRP4 reduce significativamente el nivel de cadmio en la hoja de tabaco.

Ejemplo 10: Identificación de mutantes inducidos por EMS en NtMRP4

Una librería de ADN es hecha de plantas de *Nicotiana tabacum* que han sido expuestas a etil metanosulfonato (EMS) y son cribadas para mutantes en exón 1 y exón 2 de polinucleótido NtMRP4 mediante secuenciación de la parte relevante del gen NtMRP4 de plantas individuales.

Para el exón 1

NtMRP4Exón1FW (5'-CATCTCCTTACGAAGGATACTACC-3') y

NtMRP4Exón1 REV (5'-GCTGCAAGCTCTCCTTTTCTAA-3')

Se usan para secuenciación, y para exón 2,

NtMRP4Exón2FW (5'-GTGCAATCTGGCAAATATAGTGAG-3') y

NtMRP4Exón2REV (5'-AAAA TGACATAGGAGCA TGCAAGTA-3')

se usan para secuenciación.

En la tabla 1 se presenta un resumen de todos los mutantes encontrados para exón 1 y exón 2 del polinucleótido NtMRP4. Se indican el codón original (codón ori) y el codón mutado (codón mut) como también la sustitución de aminoácido original (AS ori) y la sustitución de aminoácido (AS mut) o codón de detención (stopcodon).

Ejemplo 11: Protocolo de búsqueda para la selección de sitios diana de nucleasa de dedo de cinc

Este ejemplo ilustra cómo buscar el gen NtMRP4 gene para cribar para la ocurrencia de sitios diana únicos dentro de la secuencia de gen dada en comparación con una base de datos de genoma dada para desarrollar herramientas para modificar la expresión del gen. Los sitios diana identificados mediante métodos de la divulgación, incluyendo aquellos divulgados abajo, los motivos de secuencia, y el uso de cualquiera de los sitios o motivos en la modificación de la secuencia de gen correspondiente en una planta como el tabaco, están comprendidos en la divulgación.

Algoritmo de búsqueda.

Se desarrolló un programa de computador que permite cribar una secuencia de nucleótido (diana) de consulta de entrada para la ocurrencia de dos motivos de ADN de subcadena con longitud fija, separados por un tamaño de espaciador dado usando un sistema de sufijo dentro de una base de datos de ADN, tal como por ejemplo el ensamblaje de secuencia de genoma de tabaco del ejemplo 1. La construcción de sistema de sufijo y la búsqueda usan la fuente abierta libdivsufsort library-2.0.0 (<http://code.google.com/p/libdivsufsort/>) que convierte cualquier cadena de entrada directamente en una cadena transformada de Burrows-Wheeler. El programa escanea la secuencia de nucleótido (diana) de entrada completa y devuelve todas las combinaciones de subcadena que ocurren menos que un número seleccionado de veces en la base de datos de ADN seleccionada

5 Selección de sitio diana para mutagénesis mediada por nucleasa de dedo de cinc de una secuencia de consulta.

Un dominio que enlaza AND de dedo de cinc reconoce una secuencia de nucleótido de tres pares de bases. Una nucleasa de dedo de cinc comprende una proteína de dedos de cinc que comprenden uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más dominios que enlazan ADN de dedo de cinc, y la nucleasa no específica de una enzima de restricción de tipo II. Pueden usarse nucleasas de dedo de cinc para introducir una ruptura bicatenaria a una secuencia diana. Para introducir una ruptura bicatenaria, se requiere un par de nucleasas de dedos de cinc, una de las cuales se enlaza a la hebra más (superior) de la secuencia diana y la otra a la hebra menos (inferior) de la misma secuencia diana separada por 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más nucleótidos. Usando plurales de 3 para cada uno de los dos motivos de AND de subcadena con longitud fijada, puede usarse el programa para identificar dos sitios diana de proteína de dedos de cinc separados por una longitud de espaciador dada.

Parámetros de entrada del programa:

1. La secuencia de ADN de consulta diana
2. La base de datos de AND a buscarse
3. El tamaño fijado del primer motivo de ADN de subcadena
4. El tamaño fijado del espaciador
5. El tamaño fijado del segundo motivo de ADN de subcadena
6. El número de umbral de ocurrencias de la combinación de los parámetros de entrada del programa 3 y 5 separados por el parámetro de entrada de programa 4 en la base de datos de ADN elegida del parámetro de entrada de programa 2

Salida de programa:

1. Un listado de secuencias de nucleótidos con el número de veces para cada secuencia que la secuencia ocurre en la base de datos de ADN con un umbral máximo de salida de programa 6.

Ejemplo 12: Perfil de expresión de transcritos NtMRP3 y NtMRP4 en tabaco

Desarrollo y análisis de selección de exones de tabaco. Usando los clones de BAC obtenidos tal como se describe en el ejemplo 1, se identifican 272,342 exones combinando y comparando datos EST de tabaco y las secuencias filtradas por metilo obtenidas de la secuenciación de BAC. Para cada uno de estos exones, se diseñan cuatro oligonucleótidos 25-meros y se usan para construir una selección de exones de tabaco. La selección de exones se hace mediante Affymetrix (Santa Clara, USA) usando protocolos estándar.

Expresión de NtMRP3 y NtMRP4 en tabaco. Se aísla ARN de especies de *Nicotiana* cultivadas en suelos de Cd⁺ (contaminados con Cd) y Cd⁻ (deficientes de Cd), y se analizan usando protocolos de hibridación estándar e instrumentos analíticos. El perfil de expresión se efectúa para identificar conjuntos de genes relacionados con la acumulación de Cd y para determinar la influencia del Cd del suelo en la variación de los transcritos de NtMRP3 y NtMRP4. Las sondas NtMRP3 y NtMRP4 usadas se localizan en el primer y último exones así como en la región 3'UTR. Los resultados mostrados en la tabla 2 indican que las hojas de las plantas de *N. tabacum* cultivadas en suelo contaminado con Cd acumulan más Cd que las plantas de *N. rustica* cultivadas en el mismo suelo. Las raíces de plantas de *N. tabacum* acumulan menos Cd que las raíces de las plantas de *N. rustica*. De modo interesante, tanto NtMRP3 como NtMRP4 no están regulado por Cd pero su expresión es diferente en las dos especies de *Nicotiana* lo que sugiere que ambos genes realizan de manera diferente la absorción, translocación y acumulación de Cd en la adhesiones de *Nicotiana* (los datos están en log 2 correspondientes a la media de tres replicados biológicos). Como controles, se muestra la expresión de tres genes constitutivos (UBP12, exones 1 y 2), α -tubulina y la proteína ribosómica S16.

Cualquier publicación citada o descrita en la presente proporciona información relevante divulgada previamente a la fecha de presentación de la presente solicitud. Las declaraciones en la presente no deben interpretarse como admisión de que los inventores no tienen derecho de preceder tales divulgaciones. Todas las publicaciones mencionadas en la especificación de arriba están incorporadas a la presente mediante referencia. Diversas modificaciones y variaciones de la divulgación serán evidentes para aquellas personas versadas en la materia sin apartarse del alcance y del espíritu de la invención. Aunque la invención ha sido descrita en conexión con modalidades específicas preferidas, debe entenderse que la invención, tal como se reivindica, no debe limitarse indebidamente a tales modalidades específicas. En realidad, las diversas modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención que son obvias para aquellos versados en biología celular, molecular y biología vegetal o campos relacionados, están destinadas a estar dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

	TABLA 1						
	Amplico n	f seq	r seq	Codón ori	AS ori	Codó n mut	AS mut
Exón 1	NtMRP4 -1	gaagctgga atg	attttaaagag	gau	asp	aau	asn
Exón 1	NtMRP4 -1	atgcttatt	gatcgacact	cga	arg	uga	stop
Exón 1	NtMRP4 -1	aggttgcat g	tcagctagac	ugc	cys	ugu	cys
Exón 1	NtMRP4 -1	tgctcagcta	acaggctcatg	aga	arg	aaa	lys
Exón 1	NtMRP4 -1	acaggctcat g	tgttggacag	ggg	gly	gau	asp
Exón 1	NtMRP4 -1	caggctcatg	tgttggacag	ggg	gly	gau	asp
Exón 1	NtMRP4 -1	tgttggaca	attgtaaattat	cag	gln	caa	gln
Exón 1	NtMRP4 -1	ccgtagatgc t	agcagctttc	cag	gln	uag	stop
Exón 1	NtMRP4 -1	gcagctgtcc	atatgatgcta	gau	asp	aau	asn
Exón 1	NtMRP4 -1	gctacagcta	attccatttg	cau	his	uau	tyr
Exón 1	NtMRP4 -1	attccatttg	ctcatgccatt	ugg	trp	uga	stop
Exón 1	NtMRP4 -1	tgccattgca a	tttctgtggc	guu	val	auu	lle
Exón 1	NtMRP4 -1	ctttagccatc	tttatactta	cuu	leu	uuu	phe
Exón 1	NtMRP4 -1	ttcaactgtt	taacactagc	gua	val	aua	ile
Exón 1	NtMRP4 -1	tggaactgca	cagtgatggta	gca	ala	aca	thr
Exón 1	NtMRP4 -1	aggcaaca aat	agatgctta	gag	glu	aag	lys
Exón 1	NtMRP4 -1	ttataaagtt	caggcatggg	uuc	phe	uuu	phe
Exón 1	NtMRP4 -1	ttataaagtt	caggcatggga	uuc	phe	uuu	cys
Exón 1	NtMRP4 -1	attgaatcttt	cgcgagtccga	uuc	phe	uuu	phe
Exón 1	NtMRP4 -1	aatctttccgc	agtccgagt	gag	glu	aag	lys

Exón 1	NtMRP4 -1	agtacggat g	ttgtccaagtt	ugg	trp	uga	stop
Exón 1	NtMRP4 -1	agttctgtac t	aatagctggt	uca	ser	uua	leu
Exón 1	NtMRP4 -1	cattgtctgt	gagcactcct	ugg	trp	uag	stop
Exón 1	NtMRP4 -1	ttgtcttg	agcactcctc	ugg	trp	uga	stop
Exón 1	NtMRP4 -1	tggagcactc	tcttctagt	ccu	pro	cuu	leu
Exón 1	NtMRP4 -1	tcttctagt	tacgctcactt	gcu	ala	guu	val
Exón 1	NtMRP4 -1	atcccgttg	cgcaggaaca	gcg	ala	acg	thr
Exón 1	NtMRP4 -1	atcccgttg	cgcaggaaca	gug	val	aug	met
Exón 1	NtMRP4 -1	gaaccgatc a	ggctttccct	agg	arg	aag	lys
Exón 1	NtMRP4 -1	aaccgatca g	gctttccctc	agg	arg	aga	arg
Exón 1	NtMRP4 -1	catgatctca	ttcacaagca	cuu	leu	uuu	cys
Exón 1	NtMRP4 -1	atctctgata	attggacaaat	aga	arg	aaa	lys
Exón 2	NtMRP4 -2	tattagaagc t	gaatggatttt	gga	gly	aga	arg
Exón 2	NtMRP4 -2	ttcaccgcca	atctctcttc	aca	thr	aua	ile
Exón 2	NtMRP4 -2	aaacaacca aa	agagcaatgc	gag	gly	aag	lys
Exón 2	NtMRP4 -2	ccttgaaga at	aaaatctctc	uca	ser	uua	leu
Exón 2	NtMRP4 -2	agaatcaaa at	ttctgaagat	ucu	ser	uuu	phe
Exón 2	NtMRP4 -2	tatctaagga a	aaaacggaga	gaa	glu	aaa	lys
Exón 2	NtMRP4 -2	tcaacagtct a	atctga	aca	thr	aua	ile
Exón 2	NtMRP4 -2	atctgatagg	gggattctaaa	ggg	gly	agg	arg
Exón 2	NtMRP4 -2	acttataaag	aagaagaaag	gaa	glu	aaa	lys
Exón 2	NtMRP4 -2	aacttataaa g	aagaagaaag	gaa	glu	aaa	lys
Exón	NtMRP4	aaggaaga	aaagagaaact	gaa	glu	aaa	lys

2	-2	a	g				
Exón 2	NtMRP4 -2	gctatatatta	tgaagcttttg	acu	thr	auu	ile
Exón 2	NtMRP4 -2	gctatatatta	tgaagcttttg	acu	thr	auu	ile
Exón 2	NtMRP4 -2	gaagcttttg	atggtgggg	gga	gly	gaa	glu
Exón 2	NtMRP4 -2	ttggatggtg	ggcgtagtgc	ugg	trp	uga	stop
Exón 2	NtMRP4 -2	ttgtggcaaa	ttctctaag	agu	ser	aau	asn
Exón 2	NtMRP4 -2	gttctctaag	gcaagtga	aug	leu	aau	leu
Exón 2	NtMRP4 -2	gcaaagttct	taatggcaag	cua	leu	uua	leu
Exón 2	NtMRP4 -2	tattggctg	catatgaaac	gca	ala	aca	thr
Exón 2	NtMRP4 -2	caacaaatg a	atgcttaatt	gag	glu	gaa	glu
Exón 2	NtMRP4 -2	cttcagcrga y	gtgccatgtcct	cgu	arg	ugu	cys
Exón 2	NtMRP4 -2	tgctctcaat	cttctctgtt	ccu	pro	ucu	ser
Exón 2	NtMRP4 -2	ggcatggga a	aacatttta	gaa	glu	aaa	lys

Tabla 2

	Raíz N. rustica		Raíz TN90		Hoja N. rustica		Hoja TN90	
	Bajo Cd	Alto Cd	Bajo Cd	Alto Cd	Bajo Cd	Alto Cd	Bajo Cd	Alto Cd
NtMRP3_exón1	5.9	4.9	7.5	7.7	5.6	5.8	7.5	7.9
NtMRP3_exón2	1.6	1.7	7.0	7.1	2.2	2.0	5.5	6.5
NtMRP3 _ exón2	6.1	5.6	9.6	9.6	4.1	4.5	9.0	9.6
NtMRP3 exones 8&10	5.3	5.4	7.5	7.4	5.3	5.1	6.5	7.1
NtMRP4 exón 1	6.4	6.4	5.1	4.5	7.6	8.2	7.6	7.3
NtMRP4 3'UTR	6.2	6.4	3.9	3.8	7.9	7.9	5.9	6.5
N1MRP4 exón 1	7.5	7.7	5.9	5.4	9.3	9.1	9.1	9.4
NtMRP4 exón 11 (último exón)	6.2	6.1	5.0	4.8	7.6	7.6	7.2	7.2
Proteasa específica de ubiquitina 12 (UBP12) exón 1	6.7	6.6	6.3	5.7	6.2	5.4	5.8	6.1
Proteasa específica de ubiquitina 12 (UBP12) exón 2	6.5	6.9	6.0	6.0	6.3	6.6	5.9	5.7
Beta-tubulina	5.8	5.6	5.7	6.0	5.4	5.5	5.6	5.6
Proteína ribosómica S16	9.9	10.1	9.9	10.5	11.7	11.7	11.3	11.3

SECUENCIAS

SECUENCIAS (el sombreado indica la posición de exones)

SEQ ID No. 1 (secuencia de ADN de NtMRP4 con 5' y 3' UTR)

atggataatgaggaacagtatgtcttcagaatcttgttttagcatcactttcttgttctgc
ctccacatttcaatcgtcagaggattcagcagttgttaaagggttaagattcattttcct
ctctccatgtccacaaaggactcttctatcttccattgatgtgctgcttttgcttacttt
cattgtatttgcagtacaaaagttgtactcaaagttgaggtccaatgagcactctacttc
tagcattgataagcctctaattgcacacaacaggacttctgttagaaccaatctttgggt
taagctgtctctgattttgtcagctattttagccttatcttctatagttttatgcatttt
ggttattgtgggaaattcccagtcgccttggaagtcatagatggactgtattgggtgtt
tcaggcgattacacatgttgtaactactataactaatagttcatgagaaaagatttcacgc
tatttcccatccactgtccctgcgcgtgttttggttgcaaaactttgtagttatgagttt
gttctttgggtgtgggatcacaaggcttgtgtcacttaaggaaattgatcctaatttaag
aatggatgatataagttcatttagtttcatttccctatttctgttgttctcttcattgttgc
cattaaaggttcgaccggagttgctgtaatttagtgattctgaatctcacttaagtga
aaccaatggttatgaactcctggataaatccagtgtagtggtgttgccttcagcttctct
aatatcgaagccttttggtttggatgaaccctttactgcaaaaagggttacaagtcacc
tctcaagattgatgaagttccttccactttccctactgcatagagcagagaaaatgtctca
acttttcgaagaaattggcctaaccctgaagaaatatcaaagcatcctgtccgaacaac
attgctgcgttgcttttggaaggaagttattttactgccattcttgcagtaattaggggt
atgtgttatgtatgtagggccaacactcatacaaagatttgttgattacacagcaggaaa
gaggacatctccttatgaaggatactaccttataggaactctcctaatagccaaatttgt
ggaagttctaacctctcatcagttcaactttaactccaaaagccttggcatgcttattcg
agcgacacttctcacttctttgtataagaaggggttaagggtgtcatgctcagctagaca
ggctcatgggtgttgacagattgtaaattatatggccgtcgatgctcagcagctgtccga
tatgatgctacagctacattccatttggtcatgccattgcaagtttctgtggctttagg
catcctttatacttacctcggtgcttcaactgttgtaacgctagctggacttgcagcagt
gatggtatttgtggtgtttggaactaaaagaaacaacagggttcaatttaacatcatgaa
gaatcgtagttctagaatgaaagcgacaaatgagatgcttaattatatgcgcgttataaa
gttccaggcatgggaagaacattttaacaaaagaattgaatccttccgcgaatccgagta
tggatggttgtccaagttcttgtactcaatcgctgggaatatcattgtcttgtggagcac
tcctcttctagtggctacactcacttttggaagtgaatcttgttggaatcccgcttgg
tgcagggacagtggtcactgcaacatctctcttcaagatgttgcaggaaccgatcagggc
tttccctcaatccatgatctcactttcacaagcaatgatatctcttgatagattggacaa
atatatgatgagtaaggagttagtgataaagctgtggaaagactagaaggttgtggggg
tacaattgctatgcagggtgaaagatggagctttttgctgggatgatgaaaacagtaaga
agaattgaaaaatgtaaactttgagattagaaaaggagagcttgcagcagtagtggggac
agttggggcggggaagtcttccctccttgcacatctgtacttgggtgagatgcacaagttgtc
gggtcaggtatggctctcatccttctgtttgtttgattaatacaaactttgctgccatt
accttttgccttctgttgcacctcttttctgtggtataaaaaattaatgtaggctaattg
ttagagtgagggtatttatatgcagaacaattgcaatcaagcaattacctgtgagatact
attttgttttcatattagtgactggtacattctcattgggtgtatcgtttgatctccacc
aaagcagaggttttactggccgacagagtcaaactactgtgcttcactccttttactcca
atccttagtagtctttgcttctaataacttcaagcgtgtaatagaaacaccattatatt
attagctgattagttactttacaattccagagcatatttacattttctgcttgggtgtct
attactctggataacagtcctaataatgcaagcaaaatcaactgtgttttcagtcttgagct
gaccaattagttcatgatgtcctcagcttgtccaagctgggtgcctcaccggaattatgtg
ggaccttcgtacttaataactagttcaccttcttcttaaaaaatattgaatgatttgatt

ggttaatagttccttaaatgtagtaattatttgctaacttactttaccaaccccttggtcc
aacaggtcacaattttgtgggttcaactgcctatggtgcacaaacatcgtggattcagaatg
gcacgatacaagaaaatatcctgtttggtatgccaatgaacagagacagatacaaggaag
tgatccgggtttgctgcttggaaggaacttggaataatggagtttgagaccagactg
aataggagaacgtggcatcaacctcagtggtggtcagaagcagcgaatccagcttgcaa
gagctgtttaccaggactgtgatatttatcttctagatgatgtattcagtgagttgatg
ctcacactggctctgaaatcttcaaggttagaagtcacaaatgtcatgtgtcattgaaga
tttaatttaagatagaaattacattgtttcattctgcaaattatggacctatcagagaaa
aatcatggattttgaatggctactttccccagtgagacacatatcatttcctgggagga
agatgtgaaagtggaagctatttactccaaaaagtataatctaaaagacttttattaag
tttggaaggcttaatccatcatttggtatctgttctacttgtctttattaaaattctt
cttagtccaatcactttcgatgaagttgactagtcttagtcacctgaatactttaaatct
ttgccttgggtgtctctatatattttcagccatctcaattccgaagctcatatttgttttctc
tttgtaatgtccatctgaaagtttcatgcttttttgagggaatgtgtgaggggaattctt
aaagataaaaccattttgcttgtcacacaccaagttgacttcttgcataatgttgacctg
atccttgtaagtttcagagtggtttatcaacccctttggaaccaagtgcaagagtagtg
tttcttgggtgttaaatgattcacatgtgtgttggtttctataaaacctgaactttatgt
tttatcagagtggtttgctttcttgaaggtcatgagagatgggatgatcgtgcaatctgg
caaatataatgagatattagaagctggaatggatttttaagagctagtagctgcacatga
gacctctttagaacttggtgacgtggaacaaccaaagagagcaatgcctcccttgaaga
atcaaaatcttctcgaagattatctaaggaagaaaacggagatgataaatctcaacagtc
tacatctgataggggggattctaaacttataaaggaagaagaaagagaaactggaaaagt
cagtcctcgtgtgtacaagctatatattactgaagcttttggtggtgggtgtagtgt
agttatcttgttttctgttcttggcaagttctctaattggcaagtgattattggctggc
atatgaaacttcagcggatcgtgccatgtccttcaatccttctctgtttattgggatata
cgggtgttattgcagttgtttcttctgtgtgatagtgatcaggatgtattttgtgacact
tatggggctcaagactgccaaatatttttcggacagattctttacagcatactgcatgc
tcctatgtcattttttgacacaacaccttcggaagaattctgagtcgggttaaatttctg
aggacaagtttttcttttgcatgtaaattcaaactttgctgcttagatgattaaataat
gaaaaatatccattgcatgttttaattgtgtatgacatgttagaattttgaatagaagttc
attcactgatgttgagatgttttgtttttttctgcaggcatctaattgatcagaccaaca
ttgatgtcttctcccggttttttatgaatctcactttggccatgtttatcacactgctcg
gcatcatcatcatcacatgccaatattcttggcctaccgtactacttttgattcctctgg
gttggcttaatatctggtaccgggtatgagcactgtttataacagccgtccttttttctt
ttcttgtctgaactcaaatttgaatcctttgttttagaggcaattagtctgctctgagcat
tttggctgacagttattatgtatatataaaggcaacttttttattcgttctgtccagcta
aaactttttacttaaaatgtggttaactgcatatttctgtgtctcctattttttgattat
ttgcaactctgatcaatctagattttggggaaggcttgttgttagttgatgactagatact
aagctcacatctaatttggttgcaagtagaattttcaagttgtcattcacttatattgtt
tgaactaggagattagcattcttctgcaaggagccctgaatgcttgaaaagttaaacaga
aaagaaaaagttcagggcagatagacataatgtgttaaagtaattcaattggagcacaga
tatatgacatgtgttattttgggagctacgaaaaagataaggactattatgtagactacaa
ttgaaataacaggtaattcatttctggtttacagggatattatcttgcaacatctcgtga
attgactcggcttgactcaattacaaaagcacctgttattcatcatttctctgaaagcat
ctcaggtgttatgactatacgttgcttttaggaagcaggagatgttttgtaacgagaatgt
aaaccgagtgaattccaatctgcgaatggatttccacaacaatggatccaatgaatggtt
gggctttcagctggaattgatgggaagcttacttctttgtgtttctgcaatgttcatgat
tgtcttacctagcagcatcatcaagccaggtataacaccgtccaatgctcatttatggga
attataaattctagtatttgataatccttctgtacttttagatctacctgctctactgaaa
aatgaaatgagtatgaggaaatagaatatccgttgagcatttatgtctttctattaaaaa
tttgcatctatcttcttgtttcaagtcaaaatcttgaacaactatatctagagaatttt

ccttcttgtgaagtaatgcatatatacatcaagagaagtcagagttgctgaatgaaatag
tagatcaaatttaagtggttgctataaagaattgtatggtagattgaatatagtgg
catattatcttcaatcttagtgattaaagtattccatacaaacagacaagcatttagt
cgtgcattcattggcactacaaaattatcaaccaagagtaatatctttcagctttctc
tgtatatgtgtgttctattctggagctgaagataactaatattcttttttatttctacag
aaaatgttggtttgtcactatcatatggcttgtctcttaatagtgtcctattctggcca
tctttgtgagttgctttgtgaaaataaaatggtttctgtcgaaagattaaaacagttct
cagaaataccatcagaagcagagtgagaaagatggattttctcccaccttcaagttggc
caagccgtgggaatgttgagcttgaaaacgtgcaggtataatcttaactaattctgtgg
ttgctatttgctagcatttgacaaaaggaaaactataaaaagttcatagtaagggaagag
agggtagctgtattaacaagcctacagattctttaatttcaaatagtttacgttgaatct
ctatattgtttgttctactgggtcaacaggttagatatcggtccgaacactcctctagtgt
taaaggagttactctcagcattagagggggagagaagatagggtgttgttggtcgtacagg
gggtggaaaatcaacattaattcaagttttctttcggttggtggagcctgcagctggaag
aataatcattgatgacgtagatatatccagacttgggcttcatgatcttagatctcgctt
cgggatcattccccaagagccagtcctttttgaaggaaactgtgagaagcaacattgaccc
cattggacaatattcagatgatgaaatttggaaggtaatctaacttgctgactgaaataa
tttacaaaaatctcaaaatatagtacagagttagccaaacatgtcttctgagtgtgaga
tctttttggattataaattctgtaagagcaacataactatttgttagtgagaagaaaagca
tatactccagtggtttgttatctcccagaatgtctctaacatgaaatcgtgtacattgca
gagcctcgaacgctgccaactcaaagatgtggtgtctttaaaccgaaaaacttgattc
accaggtaaatcttctcctctacgtcatccttgtggttctttgcggaattatgcaacca
actttttatgtgtttcaaataatatatactgataactgaatactgtcattggtaaatcata
gttgttgataacggagataaactggagtggtgcggacagaggcagcttctttgcttggaaga
gtgatgctaaaacgtagcagacttctatttatggatgaggcaactgcctctgttgattca
cagacagatgcagtgattcagaaaatcatccgcgaggactttgcggcctgtactataatc
agcattgcccacagaataccaacagtcattgactgtgatagagttcttgttatagatgca
gggtgctgatttctctccttttactttgtaccttattttgaatctggtaaatgattattta
tctgtatgtgatggtttccaaccaatcatagtcagtacctttatgaagaaattgccta
gttagccaagtagtagtaaatgcatga

SEQ ID No. 2 (Secuencia de ADN de NtMRP4 sin 5' y 3' UTR)

atggatatgaggaacagtatgtcttcagaatcttgttttagcatcactttcttgttctgc
ctccacatttcaatcgtcagaggattcagcagttgttaaattggtaagattcattttcct
ctctcagtgccacaaaggactcttctatcttccattgatgtgctgcttttgcttacttt
cattgtatttgagtagacaaaagttgtactcaaagttgaggtccaatgagcactctacttc
tagcattgataagcctctaattgcacacaacaggacttctgttagaaccaatctttggtt
taagctgtctctgattttgtcagctattttagccttatcttctatagttttatgcatttt
ggttattgtgggaaattcccagtcgccttggaagtcatagatggactgtattggttgtt
tcaggcgattacacatgttgtaatcactataactaatagttcatgagaaaagatttcacgc
tatttcccatccactgtccctgcgcgtgttttggttgaaactttgtagttaggtt
gttctttggttgtgggatcacaaggcttgtgtcacttaaggaaattgatcctaatttaag
aatggatgatataagttcatttagtttcatttccctatttctgttgttctcttcattgttgc
cattaaagggttcgaccggagttgctgtaattagtgttctgaatctcacttaagtgtga
aaccaatgggttatgaactcctggataaatccagtggtgagtggttgccttcagcttctct
aatatcgaaagccttttggtttggatgaaccctttactgcaaaaagggttacaagtcacc
tctcaagattgatgaagttccttcaactttccccactgcatagagcagagaaaatgtctca
acttttcgaaagaaattggcctaaccctgaagaaatatcaaagcatcctgtccgaacaac
attgctgcgttgccttttggaagggaagttatttttactgccattcttgcagtaattagggt
atgtgttatgtatgtagggccaacactcatacaaagatttgttgattacacagcaggaaa
gaggacatctccttatgaaggatactaccttataggaactctcctaataagccaaatttgt

ggaagttctaacctctcatcagttcaactttaactcccaaaagcttggcatgcttattcg
agcgacacttctcacttctttgtataagaaggggttaaggttgatgctcagctagaca
ggctcatgggtgttgacagattgtaaattatatggccgtcgatgctcagcagctgtccga
tatgatgctacagctacattccatttggctcatgccattgcaagtttctgtggctttagg
catcctttatacttacctcgggtgcttcaactgttgtaacgctagctggacttgcagcagt
gatggatatttgtggtgtttggaactaaaagaacaacaggtttcaatttaacatcatgaa
gaatcgtgattctagaatgaaagcgacaaatgagatgcttaattatatgcgcgttataaa
gttccaggcatgggaagaacattttaacaaaagaattgaatccttccggaatccgagta
tggatgggtgtccaagttcttgtactcaatcgctgggaatatcattgtcttgtggagcac
tctcttcttagtggctacactcacttttggagtgcaatcttgttgggaatcccgttgg
tgcagggacagtggttcaactgcaacatctctcttcaagatgttgcaggaaccgatcagggc
tttccctcaatccatgatctcactttcacaagcaatgatatctcttgatagattggacaa
atatatgatgagtaaggagtttagtggataaagctgtggaaagactagaaggttgtggggg
tacaattgctatgcaggtgaaagatggagctttttgtctgggatgatgaaaacagtaaaga
agaattgaaaaatgtaaactttgagattagaaaaggagagcttgcagcagtagtggggac
agttggggcggggaagtcttccctccttgcacatctgtacttggtagatgcacaagttgtc
gggtcaggtatggctctcatccttctgtttgtttgattaatacaaacctttgctgccaatt
accttttggcccttgttgcacactcttttctgtggtataaaaaattaatgtaggctaattg
tgtagagtggaggtattatatgcagaacaattgcaatcaagcaattacctgtgagatact
attttgttttcatattagtggtactggtacattctcattgggtgatcgtttgatctccacc
aaagcagaggttttactggccgacagagtcaaactactgtgcttcaactccttttactcca
atccttagtagtctttgcttctaatagaacttcaagcgtgtaatagaaacaccattatatt
attagctgattagttactttacaattccagagcatattttacatttttctgcttgggtgtct
attactctggataacagtcctaaatgcaagcaaaatcaactgtgttttcagtcttgagct
gaccaattagttcatgatgtcctcagcttgtccaagctgggtgcctcaccggaattatgtg
ggacttctgacttaatacaactagttcaccttcttcttaaaaaatattgaatgatttgatt
ggttaatagttccttaaatgtagtaattatttgctaacttactttaccaacccttgtcc
aacaggtcacaatttgtggttcaactgcctatgttgcaaaacatcggtgattcagaatg
gcagatacaagaaaatatcctgtttgggtatgccaatgaacagagacagatacaaggaag
tgatccgggtttgctgcttggagaaggacttggaaataatggagtttggagaccagactg
aaataggagaacgtggcatcaacctcagtggtgtcagaagcagcgaatccagcttgcaa
gagctgtttaccaggactgtgatatttatcttctagatgatgtattcagtgcagttgatg
ctcacactggctctgaaatcttcaaggttagaagtcacaatgtcatgtgtcattgaaga
tttaatttaagatagaaattacattgtttcattctgcaaattatggacctatcagagaaa
aatcatggattttgaatggctactttccccagtggaagacacatatcatttctgggagga
agatgtgaaagtggaagctatttactccaaaaagtataatctaaaagacttttattaag
tttggaaaggcttaatccatcatttgttatctgttgtctacttgtctttattaaaattctt
cttagtccaatcactttcgatgaagttgactagtcttagtcacctgaatactttaaatct
ttgccttgggtgtctctatatattttcagccatctcaattccgaagctcatatttgttttctc
tttgtaatgtccatctgaaagtttcatgcttttttgcaggaatgtgtgaggggaattctt
aaagataaaaaccattttgcttgtcacacaccaagttgacttcttgcataatgttgacctg
atccttgtaaagtttcagagtggtttatcaacccttttgaaccaagtggtcaagagtagtg
tttcttgggtgttaaatgattcacatgtgtgttgggttctataaaacctgaactttatgt
tttatcagagtgttttgccttcttgaaggtcatgcgagatgggatgatcggtgcaatctgg
caaatataatgagatattagaagctggaatggatttttaagagctagtagctgcacatga
gacctctttagaacttgttgacgtggaaacaaccaaagagagcaatgcctcccttgaaga
atcaaaatcttctcgaagattatctaaggaagaaaacggagatgataaatctcaacagtc
tacatctgataggggggattctaaacttataaaggaagaagaagagaaactggaaaagt
cagtcctcgtgtgtacaagctatatattactgaagcttttggatgggtgggtgtagtgt
agttatcttgttttctgttcttgtggcaaagttctctaattggcaagtgattattggctggc
atatgaaacttcagcggatcgtgccatgtccttcaatccttctctgtttattgggatata

cggtgttattgcagttgtttcttcgttgctgatagtgatcaggatgtattttgtgacact
tatggggctcaagactgccccaaatatttttcggacagattctttacagcatactgcatgc
tcctatgtcattttttgacacaacaccttccggaagaattctgagtcgggtaaatttctg
aggacaagtttttccttttgcatgtaaattcaaactttgctgcttagatgattaaataat
gaaaaatatccattgcatgttttaattgtgtatgacatgttagaattttgaatagaagttc
attcactgatgttgagatgttttgtttttttctgcaggcatctaataatgatcagaccaaca
ttgatgtcttctcccgttttttatgaatctcactttggccatgtttatcacactgctcg
gcatcatcatcatcacatgccaatattcttggcctaccgtactacttttgattcctctgg
gttggcttaatatctgggtaccgggtatgagcactgtttataacagccgtcctttttctt
ttcttgtctgaactcaaatttgaatcctttgttttagaggcaattagtctgctctgagcat
tttggctgacagttattatgtatattaaaaggcaactttttattcgttctgtccagcta
aaactttttacttaaaatgtggtaactgcatatttctgtgtctcctattttttgattat
ttgcaactctgatcaatctagatttggggaaggcttgttgttagttgatgactagatact
aagctcacatctacattgggtgcaagtagaattttcaagttgtcattcacttatattgtt
tgaactaggagattagcattcttctgcaaggagccctgaatgcttgaaggttaaacaga
aaagaaaaagttcagggcagatagacataatgtgttaaagtaattcaattggagcacaga
tatatgacatgtgttatttgggagctacgaaaaagataaggactattatgtagactacaa
ttgaaataacaggtaattcatttctgggttacagggatattatcttgcaacatctcgtga
attgactcggcttgactcaattacaaaagcacctgttattcatcatttctctgaaagcat
ctcaggtgttatgactatacgttgcttttaggaagcaggagatgttttgtaacgagaatgt
aaaccgagtgaattccaatctgcgaatggatttccacaacaatggatccaatgaatggtt
gggctttcgaactggaattgatgggaagcttacttctttgtgtttctgcaatgttcatgat
tgtcttacctagcagcatcatcaagccaggtataacaccgtccaatgctcatttatggga
attataaattctagtatttgataatccttctgtacttttagatctacctgctctactgaaa
aatgaaatgagtatgaggaaatagaatatccgttgagcatttatgtctttctattaaaaa
tttgattctatcttcttgtttcaagtcaaaatcttgaacaactatatctagagaatttt
ccttcttgtgaagtaatgcatatatacatcaagagaagtgcagagttgctgaatgaaatag
tagatcaaatttaagtgttgtgcctataaagaattgtatgggtgagattgaatatagtggt
catattattttctcaatcttagtgattaaagtattccatacaaacagacaagcatttagt
cgtgcattcattggcactacaaaattatcaaccaagagtaatatctttcagctttcctc
tgtatatgtgtgttctattctggagctgaagataactaatattcttttttatttctacag
aaaatgttggtttgtcactatcatatggcttgtctcttaatagtgtcctattctggtcca
tctttgtgagttgctttgtggaaaataaaatggtttctgtcgaaagattaaaacagttct
cagaaataccatcagaagcagagtgagagaaagatggattttctcccaccttcaagttggc
caagccgtgggaatgttgagcttgaaaacgtgcaggttaataattctaactaattctgtgg
ttgctatttgctagcatttgcacaaaaggaaaactataaaaagttcatagtaagggaagag
agggtagctgtattaacaagcctacagattctttaatttcaaatatgttacgttgaatct
ctatattgtttgttctactggtcaacaggttagatatcgtccgaacactcctctagtgtc
taaaggagttactctcagcattagagggggagagaagataggtgttgttggctcgtaagg
gggtggaaaatcaacattaattcaagttttcttctggttggagcctgcagctggaag
aataatcattgatgacgtagatatatccagacttgggcttcatgatcttagatctcgctt
cgggatcattccccaagagccagtcctttttgaagggaactgtgagaagcaacattgaccc
cattggacaatattcagatgatgaaatttggaaggtaatctaacttgctgactgaaataa
tttacaaaaatctcaaaatatagtacagagttagccaaacatgtcttctgagtgtgaga
tctttttggattataaattctgtaagagcaacatactatttgttagtgagaagaaaagca
tatactccagtggtttgttatctcccagaatgtctctaacatgaaatcgtgtacattgca
gagcctcgaacgctgccaactcaaagatgtggtgtctttaaaccgaaaaacttgattc
accaggtaaattttcctcctctacgtcatccttgtggttctttgcggaattatgcaacca
actttttatgtgtttcaaataataatactgataactgaatactgtcattggtaaatcata
gttgttgataacggagataaactggagtgtcggacagaggcagcttctttgcttgggaaga
gtgatgctaaaacgtagcagacttctatttatggatgaggcaactgcctctgttgattca

cagacagatgcagtgattcagaaaatcatccgcgaggactttgcggcctgtactataatc
 agcattgcccacagaataccaacagtcattggactgtgatagagttcttgttatagatgca
 ggtgctgatttctctccttttactttgtaccttattttgaatctggtaaattgattttta
 tctgtatgtgatggtttccaaccaatcatagtcagtcacctttatgaagaaattgcctaatt
 gtttagccaagtagtagtaaattgcagagtcattagcctatttgttttggtttgtgag
 tttcatacttcaaactggaagcttatgctatactatctgatcccttgtttgtatagattg
 ctttcttttctttttctcggatttatcttatatataagcggacagagtaaaagaattgta
 aacatgcgtaatttgacctattatagcagattatttgtcttattttccaggctcgtgatt
 ccacttattaggagtagttacacgtatttatcttttaagtgaataatagtgtaaagttt
 cttttggcactgtcgggtgtaaagaagttaaactcctttctttaaccccggcatttcttat
 tcatgcaggaatagcaaaagagtttgacaaaccatctcgtttgcttgaaaggccttcact
 ttttggggccttgggttcaagaatatgccaacccgatcctctgagctctaac

SEQ ID NO: 3 (Intrón 1)

gtatggctctcatccttctgtttgtttgattaatacaaactttgctgccaaattaccttttggcccttgttgc
 acctcttttctgtggtataaaaaattaatgtaggctaattgtgtagagtgagggtatttatgcagaacaattg
 caatcaagcaattacctgtgagatactattttgttttcatattagtggaactggtacattctcattgggtgtatc
 gtttgatctccaccaaagcagaggttttactggccgacagagtcaaaactactgtgcttcactccttttactcc
 aatccttagtagtctttgcttctaataaactcaagcgtgtaatagaaacaccattatattattagctgatta
 gttactttacaattccagagcatattttacattttctgcttgggtgtctattactctggataacagtcctaaat
 gcaagcaaaatcaactgtgttttcagtcttgagctgaccaattagttcatgatgtcctcagcttgtccaagct
 ggtgcctcaccggaattatgtgggaccttcgtacttaatacaactagttcaccttcttcttaaaaaatattgaat
 gatttgattgggttaatagttccttaaatgtagtaattatttgctaacttactttaccaaccccttgtccaaca
 g

SEQ ID NO: 4 (Intrón 2)

gttagaagtccacaatgtcatgtgtcattgaagattttaatttaagatagaaattacattgtttcattctgcaa
 attatggacctatcagagaaaaatcatggattttgaatggctactttcccagtggaagacacatatcatttcc
 tgggaggaagatgtgaaagtggcaagctatttactccaaaaagtataatctaaaagacttttattaagtgttg
 aaggcttaatccatcatttgttatctgttgtctacttgtctttattaaaattcttcttagtccaatcactttc
 gatgaagttgactagtcttagtcacctgaatactttaaatctttgccttgggtgtctctatattttcagccatc
 tcaattccgaagctcatatttgttttctctttgtaatgtccatctgaaagtttcatgcttttttgcag

SEQ ID NO: 5 (Intrón 3)

gtaagtttcagagtgttttatcaacccctttggaaccaagtgtcaagagtagtgtttcttgggtgttaaattga
 ttcacatgtgtgttgggtttctataaaacctgaactttatgttttatcagagtgttttgctttcttgaag

SEQ ID NO: 6 (Intrón 4)

gtaaatttctgaggacaagtttttcttttgcattgtaaattcaaactttgctgcttagatgattaaataatga
 aaaatatccattgcatgttttaattgtgtatgacatgttagaattttgaatagaagttcattcactgatgttga
 gatgttttgttttttttctgcag

SEQ ID NO: 7 (Intrón 5)

gtatgagcactgtttataacagccgtccttttttcttttcttgtctgaactcaaatttgaatcctttgttttag
 aggcaattagctgtctgtgagcattttggctgacagttattatgtatattaaaaggcaacttttttattcggt
 ctgtccagctaaaactttttacttaaaatgtgggttaactgcatatttctgtgtctcctattttttgattattt
 gcaactctgatcaatctagatttggggaaggcttgttgttagttgatgactagataactaagctcacatctaca
 ttggttgcaagtagaattttcaagttgtcattcacttatattgtttgaactaggagatttagcattcttctgca
 aggagccctgaatgcttgaaaagttaaacagaaaagaaaagttcagggcagatagacataatgtgttaaagt

aattcaattggagcacagatatatgacatgtgttatttgggagctacgaaaaagataaggactattatgtaga
ctacaattgaaataacaggtaattcatttctggtttacag

SEQ ID NO: 8 (Intrón 6)

gtataacaccgtccaatgctcatttatgggaattataaattctagtatttgataatccttctgtacttttagat
ctacctgctctactgaaaaatgaaatgagtatgaggaaatagaatatccgttgagcatttatgtctttctatt
aaaaatttgcattctatcttctgtttcaagtcaaaatcttgaacaactatatctagagaattttccttcttg
tgaagtaatgcatatatacatcaagagaagtcagagttgctgaatgaaatagtagatcaaatttaagtgttg
gcctataaagaattgtatggtagattgaatatagtggtcatatttttctcaatcttagtgattaaagtat
tccatacaaacagacaagcatttagtcgtgcattcattggcactacaaaattatcaaccaagagtaatttct
ttcagctttcctctgtatatgtgtgttctattctggagctgaagataactaatattcttttttatttctacag

SEQ ID NO: 9 (Intrón 7)

gtaataattctaactaattctgtggttgctatttgctagcatttgcacaaaaggaaaactataaaaagtccat
agtaaggaagagagggtagctgtattaacaagcctacagattctttaatttcaaatatgttacggttgaatctc
tatattgtttgttctactgggtcaacag

SEQ ID NO: 10 (Intrón 8)

gtaatctaacttgctgactgaaataatttacaaaaatctcaaaatatagtacagagttagccaaacatgtctt
ctgagtgctgagatctttttggattataaattctgtaagagcaacatactatttgtttagtgagaagaaaagca
tatactccagtgttttgttatctccagaatgtctctaactgaaatcgtgtacattgca

SEQ ID NO: 11 (Intrón 9)

agtcattagcctatttgttttgattttgtgagtttcatacttcaaactggaagcttatgctatactatctga
tcccttgtttgtagattgctttcttttcttttctcgatttatcttatatataagcggacagagtaaaa

SEQ ID NO: 12 (Intrón 10)

agtcattagcctatttgttttgattttgtgagtttcatacttcaaactggaagcttatgctatactatctga
tcccttgtttgtagattgctttcttttcttttctcgatttatcttatatataagcggacagagtaaaa

SEQ ID NO: 13 (Exón 1)

tggatatgaggaacagtatgtcttcagaatcttgtttagcatcactttcttgttctgcctccacatttcaatc
gtcagaggattcagcagttgttaaattggtaagattcattttcctctctccatgtccacaaaggactcttcta
tcttccattgatgtgctgcttttgcttactttcattgtatttgcagtacaaaagttgtactcaaagttgaggt
ccaatgagcactctacttctagcattgataagcctctaattgcacacaacaggacttctgttagaaccaatct
ttggtttaagctgtctctgattttgtcagctattttagccttatcttctatagttttatgcattttggttatt
gtgggaaattcccagtcgccttggaagtcataagtgactgtattggttgtttcaggcgattacacatgttg
taatcactataactaatagttcatgagaaaagatttcacgctatttcccatccactgtccctgcgcgtgttttg
gattgcaaactttgtagttatgagtttgttctttggttgtgggatacacaaggcttggtgcacttaaggaaatt
gatcctaatttaagaatggatgatataagttcatttagtttcatttcttatttctgttggttcttctcattgttg
ccattaaaggttcgaccggagttgctgtaattagtgattctgaatctcacttaagtgatgaaaccaatggtta
tgaactcctggataaatccagtggtgagtggtttgcttcagcttctctaataatcgaaagccttttgatttgg
atgaaccctttactgcaaaaagggttacaagtcacctctcaagattgatgaagttccttcactttccctactgc
atagagcagagaaaatgtctcaacttttgcgaagaaattggcctaaacctgaagaaatatcaaagcatcctgt
ccgaacaacattgctgcgttgcttttggaaaggaagttatttttactgccattcttgtagtaattagggtagt
gttatgtatgtagggccaacactcatacaaagatttgttgattacacagcaggaaagaggacatctccttatg
aaggatactaccttataggaactctcctaataagccaaatttgtggaagttctaacctctcatcagttcaactt
taactcccaaaagcttggcatgcttattcgagcgacacttctcacttctttgtataagaaggggttaagggttg
tcatgctcagctagacaggctcatgggtgttgacagattgtaaattatatggccgtcgatgctcagcagctgt
ccgatatgatgctacagctacattccatttggctcatgccattgcaagtttctgtggcttttaggcaccttta

tacttacctcgggtgcttcaactggtgtaacgctagctggacttgacgagtgatgggtatttgggtgttggga
actaaaagaaacaacaggtttcaatttaacatcatgaagaatcgtgattctagaatgaaagcgacaaatgaga
tgcttaattatatgcgcggtataaaagttccaggcatgggaagaacattttaacaaaagaattgaatccttcg
cgaatccgagtatggatgggtgtccaagttcttgactcaatcgctgggaatatcattgtcttgtggagcact
cctcttctagtggtacactcacttttgaagtgaatcttgttgggaatcccgcttgggtgcagggacagtgt
tcactgcaacatctctcttcaagatggtgcaggaaccgatcagggctttccctcaatccatgatctcactttc
acaagcaatgatatctcttgatagattggacaaatatatgatgagtaaggagttagtggataaagctgtggaa
agactagaaggttgtgggggtacaattgctatgcaggtgaaagatggagctttttgctgggatgatgaaaaca
gtaaagaagaattgaaaaatgtaaactttgagattagaaaaggagagcttgacgagtagtggggacagttgg
ggcggggaagtcttccctccttgcatctgtacttgggtgagatgcacaagttgtcgggtcag

SEQ ID NO: 14 (Exón 2)

gtcacaatttgtggttcaactgcctatggtgcacaacatcgtggattcagaatggcacgatacaagaaaatat
cctgtttgggatgccaatgaacagagacagatacaaggaagtgatccgggtttgctgcttggagaaggacttg
gaaataatggagtttggagaccagactgaaataggagaacgtggcatcaacctcagtgggtggtcagaagcagc
gaatccagcttgcaagagctgtttaccaggactgtgatatttatcttctagatgatgtattcagtgcagttga
tgctcacactggctctgaaatcttcaag

SEQ ID NO: 15 (Exón 3)

gaatgtgtgaggggaattcttaaagataaaaaccattttgcttgtcacacaccaagttgacttcttgcataatg
ttgacctgatcctt

SEQ ID NO: 16 (Exón 4)

gtcatgagagatgggatgatcgtgcaatctggcaaatataatgagatattagaagctggaatggattttaaag
agctagtagctgcacatgagacctctttagaacttgttgacgtggaaacaaccaaagagagcaatgcctccct
tgaagaatcaaaatcttctcgaagattatctaaggaagaaaacggagatgataaatctcaacagtctacatct
gataggggggattctaaacttataaaggaagaagaaagagaaactggaaaagtcagtcctcgtgtgtacaagc
tatataattactgaagcttttggatgggtgggtgtagtgttagttatcttgttttcgcttcttgtggcaaagttc
tctaattggcaagtgattattggctggcatatgaaacttcagcggatcgtgccatgtccttcaatccttctctg
tttattgggatatacgggtgttattgcagttgtttcttcgttgctgatagtgtcaggatgtattttgtgacac
ttatggggctcaagactgcccaaatatttttcggacagattctttacagcatactgcatgctcctatgtcatt
ttttgacacaacaccttccggaagaattctgagtcgg

SEQ ID NO: 17 (Exón 5)

gcatctaattgatcagaccaacattgatgtcttctcccggttttttatgaatctcactttggccatgtttatca
cactgctcggcatcatcatcatcacatgccaatattcttggcctaccgtactacttttgattcctctgggttg
gcttaatatctggtaccgg

SEQ ID NO: 18 (Exón 6)

ggatattatcttgaacatctcgtgaattgactcggcttgactcaattacaaaagcacctgttattcatcatt
tctctgaaagcatctcaggtgttatgactatacgttgcttttaggaagcaggagatgttttgaacgagaatgt
aaaccgagtgaattccaatctgcgaatggatttccacaacaatggatccaatgaatgggtgggctttcgactg
gaattgatgggaagcttacttcttctgtgttctgcaatgttcatgattgtcttacctagcagcatcatcaagc
cag

SEQ ID NO: 19 (Exón 7)

aaaatgttggtttgtcactatcatatggcttgtctcttaatagtgtcctattctgggtccatctttgtgagttg
ctttgtggaaaataaaatggtttctgtcgaaagattaaaacagttctcagaaataccatcagaagcagagtgg
agaaagatggattttctccaccttcaagttggccaagccgtgggaatgttgagcttgaaaacgtgcag

SEQ ID NO: 20 (Exón 8)

gttagatatcgtccgaacactcctctagtgccttaaaggagttactctcagcattagagggggagagaagatag
gtgttggttggtcgtagaggggtggaaaatcaacattaattcaagttttctttcgtttggtggagcctgcagc
tggaagaataatcattgatgacgtagatatatccagacttgggcttcatgatcttagatctcgcttcgggatc
attccccaagagccagtcctttttgaaggaactgtgagaagcaacattgacccattggacaatattcagatg
atgaaatttggaag

SEQ ID NO: 21 (Exón 9)

agcctcgaacgctgccaaactcaaagatgtggtgtctttaaaacccgaaaaacttgattcaccag

SEQ ID NO: 21 (Exón 10)

ttgttgataacggagataactggagtgtcggacagaggcagcttctttgcttggaagagtgatgctaaaacg
tagcagacttctatttatggatgaggcaactgcctctgttgattcacagacagatgcagtgattcagaaaatc
atccgcgaggactttgcggcctgtactataatcagcattgccacagaataccaacagtcattggactgtgata
gagttcttggttatagatgcag

SEQ ID NO: 22 (Exón 11)

gaatagcaaaagagtttgacaaaccatctcgtttgcttgaaaggccttcactttttggggctttggttcaaga
atatgccaaaccgatcctctgagctctaa

SEQ ID NO: 23 (Secuencia de iARN)

aagagccagtcctttttgaaggaactgtgagaagcaacattgaccc
cattggacaatattcagatgatgaaatttggaagtaatctaacttgctgactgaaataa
tttacaanaaatctcaaaatatagtagcagagttagccaaacatgtcttctgagtgtgaga
tctttttggattataaattctgtaagagcaacataactatgtttagtgagaagaaaagca
tatactccagtggtttgttatctccagaatgtctctaactgaaatcgtgtacattgca
gagcctcgaacgctgccaaactcaaagatgtggtgtctttaaaacccgaaaaacttgattc
accaggtaaattttcctcctctacgtcatccttggtgtctttgcggaattatgcaacca
actttttatgtgtttcaaataatataactgataactgaatactgtcattggtaaatacata
gttggttgataacggagataactggagtgtcggacagaggcagcttctttgcttggaaga
gtgatgctaaaacgtagcagacttctatttatggatgaggcaactgcctctgttgattca
cagacagatgcagtgattcagaaaatcatccgcgaggactttgcggcctgtactataatc
agcattgccacagaataccaacagtcattggactgtgatagagttcttggttatagatgca
ggtgctgatttctctccttttactttgtaccttattttgaatctggtaaatgattattta
tctgtatgtgatggtttccaaccaatcatagtcagtagctttatgaagaaattgccta
gttagccaagtagtagtaaatgcatgaagtcattagcctatttggtttggattttgtgag
tttcatacttcaaactggaagcttatgtctatactatctgatcccttggttgatagattg
ctttcttttctttttctcggtttatcttatataaagcggacagagtaaaagaatgta
aacatgcgtaatttgacctattatagcagattatttgccttattttccaggtcgctgatt
ccacttattaggagtagttacacgtatttatcttttaagtgaataatagtgtaaagttt
cttttggcactgtcgggtgaaagaagttaaactcctttctttaaccccggcatttcttat
tcatgcaggaatagcaaaagagtttgacaaaccatctcgtttgcttgaaaggccttcact
ttttggggctttggttcaagaatatgccaaaccgat

SEQ ID NO: 24 (secuencia de proteína de NtMRP4; 5'-3' marco 1; - denota codón de detención putativo)

MDMRNSMSSESLASLSCSASTFQSSSEDSAVVKWLRFLSPCPQRTLSSIDVLLLLTF
IVFAVQKLYSKLRSNEHSTSSIDKPLIAHNRTSSPWKVIDGLYWLFQAITHVVITILIV
EKRFHAISHPLSLRVFWIANFVMSLFFGCGITRLVSLKEIDPNLRMDDISSLVSPISV
VLFIVAIGSGTGVAVISDSSEHLSDETNGYELLDKSSVSGFASASLISKAFWIWMNPLLQ

KGYKSPLKIDEVPSLSPLHRAEKMSQLFERNWPKPEEISKHPVRTTLLRCFWKEVIFTAI
 LAVIRVCVMYVGPTLIQRFDVDTAGKRTSPYEGYYLIGTLLIAKFVEVLTSHQFNFSQK
 LGMLIRATLLTSLYKKGLRLSCSARQAHGVGQIVNYMAVDAQQLSDMMLQLHSIWLMPLQ
 VSVALGILYTYLGASTVVTLAGLAAMVVFVFGTKRNNRFQFNIMKNRDSRMKATNEMLN
 YMRVIKFQAWEEHFNKRIESFRESEYGWLSKFLYSIAGNIIVLWSTPLLATLTFGSAIL
 LGIPLGAGTVFTATSLFKMLQEPIDRAFQSMISLSQAMISLDRLDKYMMSKELVDKAVER
 LEGCGGTIAMQVKDGAFCWDDENSKEELKNVNFIEIRKGELAAVVGTVGAGKSSLLASVLG
 EMHKLSGQVTCIGSTAYVAQTSWIQNGTIQENILFGMPMNRDRYKEVIRVCCLEKDLEIM
 EFGDQTEIGERGINLSGGQKQRIQLARAVYQDCDIYLLDDVFSAVDAHTGSEIFKECVRG
 ILKDKTILLVTHQVDFLHNVDLILVMRDGMIVQSGKYNEILEAGMDFKELVAAHETSLEL
 VDVETTKESNASLEESKSSRRLSKEENGDDKSQQSTSDRGDSKLIKEERETGKVSPRVY
 KLYITEAFGWGVLVILFSFLWQSSLMASDYWLAYETSADRAMSFNPSLFIGIYGVIAV
 VSSLLIVIRMYFVTLMGLKTAQIFFGQILYSILHAPMSFFDTPSGRILSRASNDQTNID
 VELPFFMNLTLAMFITLLGIIITCQYSWPTVLLLIPLGWLNIWYRGYYLATSRELTRL
 SITKAPVIHHFSESISGVMTIRCFRKQEMFCNENVNVRVNSNLRMDFHNNGSNEWLGFRLE
 LMGSLLLCVSAMFIVLPSSIIKPENVGLSLSYGLSLNSVLFWISFVSCFVENKMVSVER
 LKQFSEIPSEAERKMDFLPSSWPSRGNVELENVQVRYRPNTPLVLKGVTLISIRGGEKI
 GVGRTGGGKSTLIQVFFRLVEPAAGRIIIDDVDISRLGLHDLRSRFGIIPQEPVLFEGT
 VRSNIDPIGQYSDEIWKERTLTPTQRCGVFKTRKT-FTSC--RR-LECRTEAASLLGKS
 DAKT-QTSIYG-GNCLC-FTDRCSDSENHPRGLCGLYYNQHCPQNTNSHGL--SSCYRCR
 C-FLSFYFVPYFESGK-LFICM-WFPTNHSQYLYEEIA-C-PSSSKCM

SEQ ID NO: 25 (secuencia de proteína de NtMRP4; 5'-3' marco 2; - denota codón de detención putativo)

WI-GTVCLQNLV-HHFLVLPPHFNRQRIQQLLNG-DSFSSLHVHKGLFYLPMLCCFCLLS
 LYLYQKSCQS-GPMSTLLLALISL-LHTTGLLRLGKS-MDCIGCFRRLHML-SLY--FM
 RKDFTLFPFIHPCACFGLQTL-L-VCSLVVGSQGLCHLRKLILI-EWMI-VH-FHFLFLL
 FSSLLPLKVRPELL-LVILNLT-VMKPMVMNSWINPV-VALLQLL-YRKPFQFG-TLYCK
 KVTSHLSRLMKFLHFPHCIEQRKCLNFSKEIGLNLKKYQSILSEQHCCVAFGRKLFLLPF
 LQ-LGYVLCM-GQHSYKDLLITQQERGHLLMKDTTL-ELS--PNLWKF-PLISSTLTPKS
 LACLFERHFSLLCIRRG-GCHAQLDRMLVLDRL-IIWPSMLSSCPI-CYSYIPFGSCHCK
 FLWL-ASFILTSVLQLL-R-LDLQQ-WYLCLELKETTGFNLT-RIVILE-KRQMRCLI
 ICAL-SSRHGKNILTKELNPSANPSMDGCPSSCTQSLGISLSCGALLF-WLHSLLEVQSC
 WESRLVQGCQSLQHLSSRCCNRNRSGLSLNP-SHFHKQ-YLLIDWTNI--VRS-WIKLWKD
 -KVVGVQLLKR-KMELFAGMMKTVKKN-KM-TLRLEKESLQQ-WGQLGRGSLPSLHLYLV
 RCTSCRVRQFVVQLPMLHKHGRGFRMARYKKISCLVCQ-TETDTRK-SGFAAWRRTWK-W
 SLETRK-ENVAHSVVRSSSESLQELFTRTVIFIF-MMYSVQLMLTLALKSSRNV-GE
 FLKIKPFCLSHTKLTSCIMLT-SLSCMG-SCNLANIMRY-KLEWILKS--LHMRPL-NL
 LTKWQPKRAMPLKNQNLLEDYLRKKTEMINLSLHLIGGILNL-RKKKEKLEKSVLVCT
 SYILLKLLDGGV-C-LSCFRSCGKVL-WQVIIGWHMKLQRIVPCPSILLCLLGYTVLLQL
 FLRC---SGCIL-HLWGSRLPKYFSDRFFTAYCMLLCHFLTQHLPEEF-VGHLMIRPTLM
 SSSRFL-TSLWPCLSHCSASSSSHANILGLPYF-FLWVGLISGTGDIILQHLVN-LGLT
 QLQKHLLFIISLKASQVL-LYVALGSRRCFVTRM-TE-IPICEWISTTMDPMNGWAFDWN
 -WEAYFFVFLQCS-LSYLAASSSQMLVCHYHMACLLIVSYSGPSL-VALWKIKWFLSKD
 -NSSQKYHQKQSGERWIFSHLQVGQAVGMLSLKTCRLDIVRTLL-CLKELLSALEGERR-
 VLLVVQGVENQH-FKFSFVWWSLQLEE-SLMT-IYPDLGFMILDASGSFPKSQSFLKEL
 -EATLTPLDNIQMMKFGRSLERCQLKDVVSLKPEKLDSPVVDNGDNWSVGQRQLLCLGRV
 MLKRSRLLFMDEATASVDSQTDVAVIQKI IREDFAACTIISIAHRIPTVMDCDRVLVIDAG
 ADFSPFTLYLILNLVNDYLSVCDGFQPIIVSTFMKKLPNVSQVVVNA-

SEQ ID NO: 26 (secuencia de proteína de NtMRP4; 5'-3' marco 3; - denota codón de detención putativo)

GYEEQYVFRILFSITFLFCLHISIVRGFSSC-MVKIHFPLSMSTKDSSIFH-CAAFAYFH
CICSTKVVLKVEVQ-ALYF-H--ASNCTQQDFFALESHRWTVLVVSVDYTCNHYTNSS-
EKISRYFPSTVPARVLDCKLCSYEFVLWLWDHKACVT-GN-S-FKNG-YKFISFISYFCC
SLHCCH-RFDRSCCN--F-ISLK--NQWL-TPG-IQCEWLCFSFSNIESLLDLDEPFTAK
RLQVTSQD--SSFTFPTA-SRENVSTFRKKLA-T-RNIKASCPNNIAALLLEGSYFYCHS
CSN-GMCYVCRANTHTKIC-LHSRKEDISL-RILPYRNSPNSQICGSSNLSSVQL-LPKA
WHAYSSDTSHEFFV-EGVKVVMLS-TGSWCWTDCKLYGRRCSAAVRYDATATFHLAHAIAS
FCGFRHPLYLPRCFNCCNASWTCSSDGICGVWN-KKQQVSI-HHEES-F-NESDK-DA-L
YARYKVPGMGRTF-QKN-ILPRIRVWMVQVLVLNRWEYHCLVEHSSSSGYTHFWKCNLV
GNPAWCRDSVHCNISLQDVAGTDQGFPSIHDLTFTSNDIS--IGQIYDE-GVSG-SCGKT
RRLWGYNCYAGERWSFLLG--KQ-RRIEKCKL-D-KRRACSSSGDSWGGEVFPPCICTW-
DAQVVGSGHNLWFNCLCCTNIVDSEWHDTRKYPVWYANEQRQIQGSDPGLLLGEGLGNG
VWRPD-NRRTWHQPQWWEAANPACKSCLPGL-YLSSR-CIQCS-CSHWL-NLQGMCEGN
S-R-NHFACHTPS-LLA-C-PDPCHARWDDRAIWQI--DIRSWNGF-RASSCT-DLFRTC
+RGNNQREQCLP-RIKIFSKII-GRKRR--ISTVYI--GGF-TYKGRRKRWNWKSQSSCVQ
AIYY-SFWMVGCSASYLVFVLVAKFSNGK-LLAGI-NFSGSCHVLQSFVYWDIRCYCSC
EFVADSDQDVFCDTYGAQDCPNIFRTDSLQHTACSIVIF-HNTFRKNSESGI--SDQH-C
LPPVFYESHFGHVYHTARHHHHMPIFLAYRTTFDSSGLA-YLVPGILSCNIS-IDSA-L
NYKSTCYSSFL-KHLRCYDYTLL-EAGDVL-RECKPSEFQSANGFPQQWIQ-MVGLSTGI
DGKLTSLCFCNVHDCLT-QHHQARKCWFVTIIWLVS--CPILVHLCELLCGK-NGFCRKI
KTVLRNTIRSRVEKDGFSPTFKLAKPWEC-A-KRAG-ISSEHSSSA-RSYSQH-RGREDR
CCWSYRGWKININSSFLSFGGACSWKNNH--RRYIQTWAS-S-ISLRDHSPRASPF-RNC
EKQH-PHWTIFR--NLEGASNAANSKMWCL-NPKNLIHQLLITEITGVSDRGSFFAWEE-
C-NVADFYLWMRQLPLLIHRQMQ-FRKSSARTLRPVL-SALPTEYQQSWTVIEFLL-MQV
LISLLLLCTLF-IW-MIIYLYVMVSNQS-SVPL-RNCLMLAK---MH

SEQ ID NO: 27 (Secuencia de ADNc de NtMRP4 tal como se deriva de la secuenciación directa de ADNc)

atggatatgaggaacagtatgtcttcagaatcttggttagcatcactttcttggtctgcctccacatttcaat
cgtcagaggattcagcagttgttaaattggttaagattcattttcctctctccatgtccacaaaggactcttct
atcttcattgatgtgctgcttttgcttactttcattgtatttgtagtataaaagttgtactcaaagttgagg
tccaatgagcactctacttctagcattgataagcctctaattgcacacaacaggacttctgttagaaccaatc
tttggtttaagctgtctctgattttgtcagctattttagccttatcttctatagttttatgcattttggttat
tgtgggaaattcccagtcgccttgaaagtcatagatggactgtattggttggttcaggcgattacacatggt
gtaatcactatactaataagttcatgagaaaagatttcacgctatttcccatccactgtccctgcgcgtgtttt
ggattgcaaactttgtagttatgagtttggtctttggttggtgggatcacaaggcttggtgtcacttaaggaaat
tgatcctaatttaagaatggatgatataagttcattagtttcatttcctatttctgttggttctcttcattggt
gccattaaagggttcgaccggagttgctgtaattagtgattctgaatctcacttaagtgtgaaaccaatggtt
atgaactcctggataaatccagtgtagtggtgctttgcttcagcttctctaataatcgaaagccttttggtttg
gatgaaccctttactgcaaaaagggttacaagtcacctctcaagattgatgaagttccttcactttccccactg
catagagcagagaaaatgtctcaacttttcgaaagaaattggcctaaacctgaagaaatatcaaagcatcctg
tccgaacaacattgctgcgttgcttttggaaggaagttatttttactgcc
ttcttgtagtaattagggatgtgttatgtatgtagggccaaactcatacaaagatttggtgattacacagc
aggaaagaggacatctccttatgaaggatactaccttataggaactctcctaatagccaaatttggtggaagtt
ctaacctctcatcagttcaactttaactccaaaagcttggtcatgcttattcgagcgacacttctcacttctt
tgtataagaaggggttaagggtgtcatgctcagctagacaggctcatgggtgttgacagattgtaaattatat
ggcgtcgatgctcagcagctgtccgatgatgctacagctacattccatttggtcatgccattgcaagtt
tctgtggctttaggcatcctttatacttacctcggtgcttcaactgttgtaacgctagctggacttgacagcag
tgatggtatttggtgtttggaactaaaagaaacaacaggtttcaatttaacatcatgaagaatcgtgattc

tagaatgaaagcgacaaatgagatgcttaattatatgcgcgttataaagttccaggcatgggaagaacatttt
 aacaaaagaattgaatccttccgcgaatccgagatggatgggtgtccaagttcttgtactcaatcgctggga
 atatcattgtcttgtggagcactcctcttctagtggctacactcacttttgaagtgaatcttgttgggaat
 cccgcttgggtgcaggacagtggtcactgcaacatctctcttcaagatggtgcaggaaccgatcagggtttc
 cctcaatccatgatctcactttcacaagcaatgatatctcttgatagattggacaaatataatgatgagtaagg
 agttagtggataaagctgtggaaagactagaaggttgtgggggtacaattgctatgcaggtgaaagatggagc
 tttttgctgggatgatgaaaacagtaagaagaattgaaaaatgtaaactttgagattagaaaaggagagctt
 gcagcagtagtggggacagttggggcggggaagtcttccctccttgcatctgtacttgggtgagatgcacaagt
 tgtcgggtcaggtcacaatttgtggttcaactgcctatggtgcacaaacatcgtggattcagaatggcacgat
 acaagaaaatatcctgtttggtatgccaatgaacagagacagatacaaggaagtgatccgggtttgctgcttg
 gagaaggacttggaaataatggagtttggagaccagactgaaataggagaacgtggcatcaacctcagtggtg
 gtcagaagcagcgaatccagcttgaagagctgtttaccaggactgtgatatttatcttctagatgatgtatt
 cagtgcagttgatgctcacactggctctgaaatcttcaaggaatgtgtgaggggaattcttaaagataaaacc
 attttgcttgtcacacaccaagttgacttcttgcataatgttgacctgatccttgtcatgcgagatgggatga
 tcgtgcaatctggcaaatataatgagatattagaagctggaatggatttttaaagagctagtagctgcacatga
 gacctctttagaacttgttgacgtggaaacaaccaagagagcaatgcctccctgaagaatcaaatcttct
 cgaagattatctaaggaagaaaacggagatgataaatctcaacagctctacatctgataggggggattctaaac
 ttataaaggaagaagaaagagaaactggaaaagtgcgtcctcgtgtgtacaagctatatattactgaagcttt
 tggatgggtgggtgtagtgttagttatcttgttttcttctgtggcaaagttctctaattggcaagtattat
 tggctggcatatgaaacttcagcggatcgtgccatgtccttcaatccttctctgtttatttgggatatacgggtg
 ttattgcagttgtttcttctgttgctgatagtgatcaggatgtattttgtgacacttatggggctcaagactgc
 ccaaataatttttcggacagattctttacagcatactgcacgtcctatgtcattttttgacacaacaccttcc
 ggaagaattctgagtcgggcacatcaatgatcagaccaacattgatgtcttctcccggttttttatgaatctca
 ctttggccatgtttatcacactgctcggcatcatcatcatcacatgccaatattcttggcctaccgtactact
 tttgattcctctgggttggcttaatatctgggtaccggggatattatcttgcaacatctcgtgaattgactcgg
 cttgactcaattacaaaagcacctgttattcatcatttctctgaaagcatctcaggtgttatgactatacgtt
 gcttttaggaagcaggagatgttttgaacgagaatgtaaaccgagtgaaatccaatctgcgaatggatttcca
 caacaatggatccaatgaatgggttgggtcttgcactggaattgatgggaagcttacttcttctgtgttctgca
 atgttcatgattgtcttacctagcagcatcatcaagccagaaaatgttgggttgtcactatcatatggcttgt
 ctcttaatagtgtcctattctgggtccatcttctgtgagttgcttctgtgaaaataaaaatggtttctgtcgaaag
 attaaaacagttctcagaaataccatcagaagcagagtgagagaagatggattttctccaccttcaagttgg
 ccaagccgtgggaatgttgagcttgaaaacgtgcaggttagatatcgtccgaacactcctctagtgtttaaag
 gagttactctcagcattagagggggagagaagataggtgttgggtcgtacaggggggtgaaaatcaacatt
 aattcaagttttcttctgttgggtggagcctgcagctggaagaataatcattgatgacgtagatatatccaga
 cttgggttcatgatcttagatctcgttccggatcattcccccaagagccagtccttttgaaggaaactgtga
 gaagcaacattgacccattggacaatatcagatgatgaaatttgggaagagcctcgaacgctgccaaactcaa
 agatgtgggtgtctttaaaccggaaaaacttgattcaccagttgttgataacggagataaactggagtgtcgga
 cagaggcagcttcttctgttgggaagagtgtgctaaaacgtagcagacttctatttatggatgaggcaactg
 cctctgttgattcacagacagatgcagtgattcagaaaatcatccgcgaggactttgcgccctgtactataat
 cagcattgcccacagaataccaacagtcagtgactgtgatagagttcttgttatagatgcaggaatagcaaaa
 gagtttgacaaaccatctcgtttgcttgaaaggccttacttttggggcttgggttcaagaatatgccaacc
 gatcctctgagctctaa

SEQ ID No. 28 (Secuencia de ADN de NtMRP3 con 5' y 3' UTR)

ccgtcaaccagtccttggccaccacataaacacagctttgacttgtctctcccttttccctatttttaccacc
 cttttcaatttccaccttatattcattattatatttaataatcaatcaaagttggaaaaaaaggagtaa
 taatcaaagtagtagtatatacataccagaacaatgaaagagcactcataagctaaagcccataattcatca
 cgaaccacaatatagaggaaacctgacgtgtcccttaaaatctaaccttgaacctctgagacctcaaaaaa
 aacatc**atgggaattgcaaggggcatgtctgtgtttcaatcttggag**gtatgttggcgttgatgaatccctcc
 gaaacccattttcttacgtgtcattagttgttcttgcacctgggattgttcccttgtaattcttgggttgtg
 ttgttggaaatacaatcag**gagggacaataatgctggccacaaacagagtagtactaggaatgctaggttctt**

tactacaaatcaacctgttttgggtcaataggcttagccatcttttagctttgtgttatgtttgttagctcatt
ttattgggtatagaaatgggtgggtcagaagaaaaaattataacccttttggattttgcattaaagttgctagc
tgggtgtcaatctctgttttcttgcacacccagttcccttaattcttgtgaaaccaaatacc
tcttgttttaagagtttgggtggggcttttcttcttcttgtttcttgttatgttgccttgttatagacctgtttat
ggggaaaagaaccaatctttaccaactcaattttgtalacctgatgttgttttcaactcttatggggttattct
tctgttttgttgggtttattgtttaaacagagagttagggagaatatgttccaggaacccctcttaaatggttag
tgttggcaatggcatggactcaaagaagttactgtgggatcaaactgtcacccttatgtccaatgttaacatt
tttagtctctttactttcttcttggatgggtcccttaatttctgttggcaacaagaaccatttagaccttagg
atgttctcagcttcactttgatgatagtgtcaaagggagtttctctattttagagaaaaactagaatctgt
gggtgggggaaatagtaaccgtgtgactaccttcatgctgggtgaaggctttgttttccacagcacggaaggag
atagtgttatcggtctcttctgtgttcttcttaccgtctgtgggtcttttgttggcccgtagctcattgatacct
tagttcagtatctgaatggaaaacgagactttgataatgaaggttatgtcttagtggctgcattcttctgttgc
aaagtgggtggagtgtttggcgcaaaggcattgggttttcaagggtgcagcagggagggtatcgggcacgggca
gcactgggtttccaaaatctacaacaagggtttaaccctctctctgtcagtcaaaagcaaagccacactagtggag
agatcatcaattttatgacagttgatgccgagaggattgggtgacttccggttgggtatgtcatgatccttggat
ggtaatcatacaagttgtcttggcaltgggtgatactclataaaaaatcttggcctagctgctatcgccgcttt
gttgcatacaataatagtgtgttggcaaaccatccctttagggtgttgcaggagaagtttcaggagaaactca
tggaaatcgaaagatagaaggatgaaggctacatctgaagttttaagggaatatgagaataactcaagcttcaagc
ttggggagatgaagtttctgtctaggatcttggacctcaggactacagagggcaggatgggttgatgaaatatgtg
tacacatcagctatgactacttttgtcttcttgggttgcctctacatttgtttctgtgacgacctttggcgctg
caatgcttatgggaatccacttgaatctgggaagatattgtctgcacttgcgacattttagaatttctcaaga
gccatctacaatctccagatacaatttcaatgattgctcaaaccaaagtttctcttgatcgtatttgcact
ttcttttctcttgatgacttgcagcctgatgtcatagagaagcttccaaaaggtagttctgatgaagcaattg
agattgtagggtgggaacttgcgttgggatgcattccacctgcactccacttctaaaggatgtaaatcttagagt
gcttaatggcatgagagttgccatttgtgttacagtttgggttcaggaaaaatcaagcttactgtctagcatttta
ggagagatgcccaaattatcagggaactattaaacttagtggaaacgaaggcttatgttgcacagtcgacctgga
lacagagtggaagatagaggagaacatatttgggtaagagatgcagagggagaagatgataaagttct
tgaagcgtgtctttaaagaaagacctggaaattctctcttgggatcaaacagaaatagggggagaggggc
attaatttgagcgggtggacagaagcagagaatacagattgtctgtctcttaccagatgctgatgtttacc
tatttgatgatccgttcagtgtgtggatgctcataccggatcccatctcttcagtgtgaagtcctttcatata
tatgctttattttcatgcttgatataattttacctagccacttgattgacctatcctttaattgcaggaatgta
taatggggctattgaattcaaaaacagttttatatgttacacatcaagtggagtttttgcctgtgtgggattt
gatcttctgactctttcctttcagtaattatggtttgtttaatatcatatatagacttaactcatttaactat
gatatttctcttcaggtcatgaaagatggaaggatcagtgaaactgggaaatacaatgatcttctcaaattag
gtagtgaactcatggaacttgggtgctcaccaagaagctttaacagcaattgacacagtttaagggagaagc
attgagaaagagtgaggaatgaactgggtgataatacaaatgtacagaaggataaaaaatatttcagatggccaa
aatggtaaaagtggatgatattgttggaaacaaagggacaaattgttcaggaggaggaaagagagaaggttagtg
ttgggttttccagtttactggaaataataacaactgcataatggagggtgtcttctgtgccatttatgtgttggc
acaagttgggtttcagctccttcaaattgggaagcaattattggatggcgtgggcaactccggtctcaaagagt
gagccacctctgttgggagttctactctcatcattgtctatgttgcctttagggaattgcaagtgcctttatgca
tccttgcatagaaccatgtttcttgttaccgctggatataagacagcctcttctgttttccataaaatgcact
ttgcattttccgtgtctccaatgtcttcttctgatgccacacccagtggtggcgatttctaaacagagtaagtga
tgattacattttctttatttagcccttttttttcttatttagtgtcaatctttctgttacatgactaatcaa
tgttttgtgaaaattagctagtaatttcagaattaactcaaatgtactttgggtatgaaaacaggtcatcgacag
atcaaagtgcattgatctgaatgttcccatcaagtggatcctttgccttcacaataatacagcttttagg
gattattggagtaatgtcacaagttgcatggcagggtcttcattgtctttattccggtcattgcaagtttgcac
tgggtggaggttgcacgaccacctttttctgttcttcttgccttcacaattattctactatatgctttttcac
aaagtgagtcataactttagcgacattcataaacgtgagttacatttaagtgggtgagtttgttttcattgcag
caatattacataccatcagcacgagaactggcagggctaaatgggacatgcaaagctccagtaatacagcact
ttgccgagacaatttcaggatcaagcacaattagaagtttgcagcaggaatctagattccaggacacaagtat
gaaattgatagacaattattctcgccctaagtttcacatcgtgtgtcaatggagtggtttgtttgcgtttg

gatatgttatctctgatcacttttgcctttctctttaattttcttgatctctcttctcgttggacaattgacc
caagtaagttctctatcttcatgttttctttccttgaagtttgttgtgtgaataactcttaagagcacattt
tctccgtttcttgatttacagggtgttgctggcttagctgttaccataagggttaactctgaacataatacaagc
tcgggttgttgggaatctttgtatgatggaaaataaaattttctgttgaagaataacttcagtatactgct
cttccaagtgaatctcctcttatcatagaatccaacagaccagaccctaactggccatcttgtggagagggtt
attttagcaatcttcaggtaaattaagttattctctggtgttaattatgcagggttaatttgttggatgggtt
ggtatatctgaaaacttttaatatgtccgatatgctcctcacatgcctctcgtgttgcgaggccttacatgca
ctttctttgggtggaaagaagaactggaattgtcggtaggacaggcagcggtaaatctactctaatacagaccct
cttccgcatagttgaaccagctgctggacaaaataaaaatagatggtatcagcatctcctcaattgggttgc
gatctacgggtctagattgagtataattccacaggatccaactatgtttgagggaaacagttcgcagcaaccta
accggttgaagagtattcagatgaacaaatttgggaagtgacagcttgggttttgcctatttttggatttatt
ttgtttcagataggaaaatgacaaattttattttattgagaaactttgtttgatgttatgcttcagggctcc
ataagtgtcagctaggagaagaagtgaggaagaaagaaggcaactttattctacaggttaacttcaagaacca
catcattttctgatgatttccacttttagagctgtaataatcatcttcattgcttgcgttgcaglatctgagaa
tggagagaactggagtgtaggccaaaggcagctggctgcttggccgtgtgctactgaaaaagagcaaggct
ctggctccttgacgaggctacagcatctgtgcacactgcaactgataatcttaltcagcaaaactctaaggctgc
acttctctgattccacgggtataaccattgtcataggattacatctgtgcttgacagtgatgtgctcact
attagatcatgtaagaatcatcgtttatgttctggagcaagcggagaaggaaattcttggtagttacctttt
ttttatgctatgctgcagggctcattgctgaatacggcactccagccagggttggtagagaacgaatcctcatt
gttggctaagctcgtggcagagtatagtatgaggtcaaattcaagttttgagaatgtttcagacatgtgagtc
tcagaaactaatcttcgttaataatgttacacgacgatgatgatgaaaattaggggactctagactagtacct
tagtcgatagtgttttgagtttccatctgtggacaccatagcttgaacaagaaccagcgaaatgcaggctatg
cctgtggcttgagggaactgcaacaatcctatggcagggaaagaaacctacatctagtgatcaatattgat
tgtgaagtggcatttgtttttgttttagactttttgatgagaaaatgtatacgttaactttgtgtttacaataat
ttgaatgtatgttgagtcaagtgattagtttagttaagagtgcacggattttgctacttctgggtaaaagaagt
aaaccttgttgttgagagttgaaagtgaattactagtgtcgaattttgccgcataagctaaatgaaacactt
ttacgataaaactcctagtgcacaaaggaaaaattcattggcaagactagctgtttatgtttcacgac

SEQ ID No. 29 (Secuencia de ADN de NtMRP3 sin 5' y 3' UTR)

atggaaattgcaaaaggcatgtctgtgtttcaatctttgaggtatgttggcgttgatgaatccctccgaaacc
ccattttcttacgtgtcattagttgttctttgcacctgggattgttccttgaattcttgggttgtgttgtg
gaatacaatcagggggacaataatgctggccacaaacagagtagtactaggaatgctaggttcttgtactac
aatcaacctgttttgttcaataggcttagccatctttagctttgttgaatgtttgttagctcatttttatt
tgatagaaatgttggtcagaagaaaaaattataacccttttggattttgcattaaagttgctagcttgggt
gtcaatctctgttttcttgcacacccagttcottaattctgtgaaaccaaataccctcttgttttaagagtt
tgggtgggggtttttcttctttgtttcttgttattgccttgttatagacottgtttatggggaaaagaaccaat
ctttaccaactcaattttgtatacctgatgttgttttactcttatggggttattcttctgttttgttgggtt
tattgttaaacagagagtgaggagaatatgcttcagggaacccctcttaaatggtagtgttgcgaatggcatg
gactcaagaagttactggggatcaaaactgtcaccccttatgccaatgctaacatttttagtctctttactt
tctcttggatgggtccctaatttctgttggcaacaagaacatttagaccttgaggatgttccctcagcttca
ctttagatgataggtgcaaaaggagttttcctatttttagagaaaaactagaatctgtgggtgggggaaatagt
aacctgtgtactaccttcatgctggtgaaggctttgggtttcacagcacggaaggagatagtttatcggctc
cttctgtgcttcttaccgtcttggcgttcttgttggcccgctacctcattgataccttagttcagtatctgaa
tggaaaacgagactttgataatgaaggttatgtcttagtggctgcattcttctgttgcgaagttgggtggagtgt
ttggcgcaaaaggcattgggttttcaaggtgcagcagggagggtatcgggcacgggcagcaactggtttccaaaa
tctacaacaagggtttaaccctctcctgtcagtcaaaagcaaaagccacactagtgagagatcatcaattttat
gacagttgatgccgagaggattgggtgaactcgggttgggtatgtcatgatccttggatggtaatcatacaagtt
gctctggcattgggtgatactctataaaaactcttggcctagctgctatcgccgcgtttgttgcatacaataatag
tgatgttggcaaacatccctttagggtgttgcaggagaagtttcaggagaaactcatggaatcgaaagatac
aaggatgaaggctacatctgaagtcttaaggaatatgagaatactcaagcttcaagcttgggagatgaagttt
ctgtctaggatcttggacctcaggactacagaggcaggatgggttgatgaaatatgtgtacacatcagctatga

ctacttttgtcttctgggttgctcctacatttgtttctgtgacgaccttggcgtgcaatgcttatgggaat
cccacttgaatctgggaagatatgtctgcaacttgcgacatttagaattcttcaagagcccatctacaatctc
ccagatacaatttcaatgattgctcaaaccaaaagtttctcttgatcgtattgcatctttcctttctcttgatg
acttgcagcctgatgtcatagagaagcttccaaaaggtagttctgatgaagcaattgagattgtaggtggaa
cttcgttgggaatgcatccacctcgactccacttctaaaggatgtaaatcttagagtgttaatggcatgaga
gttgccatttgtgttacagtttggttcaggaaaatcaagcttactgtctagcattttaggagagatgccaaat
tatcagggactattaaaacttagtggaacgaaggcttatgttgcacagtcgacctggatacagagtggaagat
agaggagaacatattatttggtaagagatgcagagggagaaglatgataaagttcttgaagcgtgctcctta
aagaaagacctggaattctctcttttggcgatcaaacagaaataggggagaggggcattatttgagcgggtg
gacagaagcagagaatacagattgctcgtgctctttaccaagatgctgatgtttacctatttgatgatccgtt
cagtgctgtggatgctcataccggatcccactctcttcagtgtgaagtcctttcatatatatgctttattttcat
gcttgatatattttacctagccacttgattgacctatcctttaattgcaggaatgtataatggggctattgaa
ttcaaaaacagttttatatgttacacatcaagtggagttttgcctgctgaggatttgatcttggactcttt
cctttcagtaattatggtttgcttaatatcatatatagacttaactcatttaactatgatatttctcttcag
tcatgaaagatggaaggatcagtgaaactgggaatataaatgatcttctcaaattaggtagtgcattcatgga
acttgtgggtgctcaccaagaagctttaacagcaattgacacagtttaaggggagaagcattgagaaagagtga
gaaatgactgggtgataatacaaatgtacagaaggataaaaaatatttcagatggccaaaatggtaagtggatg
atattgttggaaacaaagggacaaattgttccaggaggaggaaagagagaaaggtagtgttggtttttcagttta
ctggaaatatatacaactgcataatggaggtgctcttctgtccatttatgctgttggcacaagtgggttttcag
ctccttcaaatgggaagcaattattggatggcgtgggcaactccgtctcaagagtgagccacctcctgttg
ggagttctactctcatcattgtctatgttggctttaggaattgcaagtgccttatgcatccttgctagaacct
gtttcttgttaccgctggatataagacagocctcttgccttttccataaaaatgcactcttgcattttccgtgct
ccaatgtccttcttcgatgcccacccgagtgggcggattctaaacagagtaagtgatgattacattttcttt
atttagcccttttttttcttattagtgtcaatctttctgttacatgactaatcaatgttttgtgaaaatta
gctagtaatttcagaattaactcaaatgtactttggatgaaaacagggcatcgacagatcaaatgcaattga
tctgaatgttccattcaagttggatcctttgccttcacaataatacagcttttagggattattggagtaato
tcacaagttgcatggcaggtcttcattgtcttattccggcattgacagtttgcatctggttggaggttgcta
cgaccacctttttcgtgttctttgccttcacaattattctactatatgctttttcaciaaagtgagtcataact
ttagcgacattcataaacgtgagttacatttaagtgggtgagtttgttttcattgcagcaatattacataccat
pagcacgagaactggcacggctaaatgggacatgcaaagctccagtaatacagcactttgcccagacaatttc
aggatcaagcacaattagaagtttcgatcaggaatctagattccaggacacaagtatgaaattgatagacaat
tattctcggcctaagtttcacatcgctgctgcaatggagtggttggcttggcttggatattgttatctctga
tcaacttttgccttctcttbaattttcttgatctctcttccgttggaaacaattgacccaagtaagttctctat
cttcagtttttcttcttgaagtttgttgttgaataactcttaagagcacattttctccgtttcttgatt
tacaggtgttgcctggttagctgttacatatgggcttaactctgaacataatacaagctcggttgttggaaat
ctttgtatgatggaaaataaaattatttctgttgaagaatacttcagataactgctcttccaagtgaatctc
ctcttatcatagaatccaacagaccagaccctaactggccatcttgttgagaggttgatttttagcaatcttca
gtaaatattaagttattctctggtgttaattatgcaggttaatttgttggatgggttggtatatctgaaaact
tttaataggtccgatatgctcctcacatgctctcgtgttgcgaggccttacatgcaactttctttgggtggaa
gaagactggaattgtcggtaggacaggcagcggtaaatctactctaatacagaccctcttcgcgatagttgaa
ccagctgctggacaaaataaaaatagatgggtatcagcatctcctcaattgggttgcattgatctacggcttagat
tgagtataattccacaggatccaactatgtttgagggaaacagttccagcaacctagacccgcttgaagagta
ttcagatgaacaaatttgggaggtgacagcttggttttgcctatttttggatttattttgtttcagataggaa
aatgacaaattttattttattgagaaactttgtttgatgttatgcttcagggcctcgataagtgctagctagg
agaagaagtgaggaagaagaaggcaaaccttattctacaggttaacttcaagaaccacatcattttctgatga
tttccacttttagagctgtaataatcatcttcattgcgttgctgcaglatctgagaatggagagaactggagt
gtaggccaaaggcagctgggtctgccttggcgtgtgctactgaaaaagagcaaggctcctgggtccttgacgag
ctacagcatctgtcgacaactgcaactgataatcttattcagcaaacctcaaggctgcacttctctgatccac
gggtataaocattgctcataggattacatctgtgcttgacagtgataggtcctactattagatcatgtaag
aatcatcgtttatgttctggagcaagcggagaaggaaattcttggtagttaccttttttttatgctatgctgc

agggctcattgctgaatacggcactocagccaggttggttagagaacgaatcctcattgtttgctaagctcgtg
gcagagtatagtatgaggtcaaattcaagttttgagaatgtttcagacatgtga

SEQ ID No. 30 (Intrón 1 de NtMRP3)

gtatgttggcgttgatgaatccctccgaaacccccattttcttacgtgtcattagttgttctttgcacctgggattgt
tccttgtaattcttgggttggtgttgggaatacaatcag

SEQ ID No. 31 (Intrón 2 de NtMRP3)

gtaagtcctttcatatatatgctttattttcatgcttgatatattttacctagccacttgattgacctatcct
ttaattgcag

SEQ ID No. 32 (Intrón 3 de NtMRP3)

gtactctttcctttcagtaattatggtttgcttaatatcatatatagacttaactcatttaactatgatattt
ctcttcag

SEQ ID No. 33 (Intrón 4 de NtMRP3)

gtaagtgaatgattacattttctttattttagcccccttttttcttattagtgtcaatctttctgttacatg
actaatcaatgttttgtaaaattagctagtaatttcagaattaactcaaagtactttggtatgaaaacag

SEQ ID No. 34 (Intrón 5 de NtMRP3)

gttgctacgaccacctttttcgtgttctttgccttcacaattattctactatatgctttttcacaaagtgagt
cataacttttagcgacattcataaacgtgagttacatttaagtggtagtttgttttcattgcag

SEQ ID No. 35 (Intrón 6 de NtMRP3)

gtaagttctctatcttcatgttttctttccttgaagtttggtgttggaataactcttaagagcacattttct
ccgtttcttgatttacag

SEQ ID No. 36 (Intrón 7 de NtMRP3)

gtaaattaagttattctctggtgttaattatgcagggttaatttggttggtatgggttggtatatctgaaaactt
ttaatag

SEQ ID No. 37 (Intrón 8 de NtMRP3)

gtgacagcttggttttgctatttttggtttatgtttcagataggaaaatgacaaattttattttattg
agaaactttgttgatggttatgcttcag

SEQ ID No. 38 (Intrón 9 de NtMRP3)

gtaacttcaagaaccacatcattttctgatgatttccacttttagagctgtaataatcatcttcattgcgttg
ctgcag

SEQ ID No. 39 (Intrón 10 de NtMRP3)

gtaagaatcatcgtttatgttctggagcaagcggagaaggaaattcttggtagttaccttttttttatgctat
gctgcag

SEQ ID No. 40 (Exón 1 de NtMRP3)

Atggaaattgcaaaggcatgtctgtgtttcaatctttgag

SEQ ID No. 41 (Exón 2 de NtMRP3)

gagggacaataatgctggccacaaacagagtagtaactaggaatgctaggttcttgtactacaaatcaaccttg
 ttttgttcaataggtctagccatctttagctttgtgttatgtttgttagctcatttttattgggtatagaaatg
 gttggtcagaagaaaaaattataaccttttggattttgcattaaagttgctagcttgggtgtcaatctctgt
 tttcttgcacacocagttccttaattcttgtgaaaccaaataacctcttgttttaagagtttgggtgggggctt
 ttcttctttgtttcttgttattgccttgttatagaccttgtttatggggaaaagaaccaatctttaccaactc
 aattttgtataacctgatgttgttttcaactcttatgggttattcttctgttttgttgggtttattgtttaaac
 agagagtgaggagaatatgcttcaggaacccctcttaaatggttagtgttgccaatggcatggactcaaagaag
 tctactggggatcaaaactgtcaccccttatgccaatgctaactttttagtctctttactttctcttggatgg
 gtccctaattttctgttggcaacaagaaaccattagaccttgaggatgttctcagcttcaactttgatgalag
 tgtcaaagggagttttcctatttttagagaaaaactagaatctgtgggtgggggaaatagtaacctgtgact
 accttcatgctgggtgaaggcttttggttttcacagcacggaaggagatagtgttatcggtctctcttctgtctc
 tttacgtctctggcgtcttttgttggcccgtaacctcattgataccttagttcagtatctgaatggaaaacgaga
 ctttgataatgaaggttatgtcttagtggctgcattcttctgttgcataagttgggtggagtgtttggcgcaaagg
 cattgggtttttcaagggtgcagcagggagggtatcgggcacgggcagcactgggtttccaaaatctacaacaagg
 gtttaaacctctctctgtcagtcataagcaagccacactagtggagagatcatcaattttatgacagttgatgc
 cgagaggattgggtgacttcgggttgggtatatgcatgatccttggatggtaatacatacaagttgctctggcattg
 gtgatactctataaaaaatcttggcctagctgctatcgcccggttgggtgctacaataatagtgtgttggcaa
 acatcccttttagggagtttgcaggagaagtttcaggagaaaactcatggaatcgaaagatagaaggatgaaggc
 tacatctgaagtcttaaggaatatgagaatactcaagcttcaagcttgggagatgaagtttctgtctaggatc
 ttggacotcaggactacagaggcaggatgggttgatgaaatatgtgtacacatcagctatgactacttttgtct
 tctgggttgcctctacatttgtttctgtgacgaccttggcgctgcaatgcttatgggaatccacttgaatc
 tgggaagatattgtctgcacttgcgacattttagaattcttcaagagcccatctacaactctccagatacaatt
 tcaatgatttgcataaaccaaagtttctcttgatcgtattgcatctttctcttctcttctgatgacttgcagcctg
 atgtcatagagaagcttccaaaaggtagttctgatgaagcaattgagattgttaggtgggaacttctgcttggga
 tgcattccactcgaactcacttctaaaggatgttaaatcttagagtgccttaatggcatgagagttgccatttgt
 ggtacagttgggttcaggaaaaatcaagcttactgtcttagcattttaggagagatgccaaattatcagggaacta
 ttaaaacttagtggaacgaaggcttatgttgcacagtcgccctggatacagagtggaaagatagaggagaacat
 attatttggtaaaagagatgcagagggagaaagtatgataaagttcttgaagcgtgctccttaaagaaagacctg
 gaaattctctcttttggcgatcaaacagaaataggggagaggggcatatattgagcgggtggacagaagcaga
 gaatacagattgctcgtgctctttaccaagatgctgatgtttacctatttgatgatccgttcagtgctgtgga
 tgcctataccggatcccatctcttcagt

SEQ ID No. 42 (Exón 3 de NtMRP3)

Gaatgtataatgggctattgaattcaaaaacagttttatatgttacacatcaagtgaggtttttgcctgctc
 cggatttgatcttg

SEQ ID No. 43 (Exón 4 de NtMRP3)

gtcatgaaagatggaaggatcagtgaaactgggaaatacaatgatcttctcaaattaggtagtgaacttcatgg
 aacttgtgggtgctcaccaagaagctttaacagcaattgacacagtttaagggagaagcattgagaaagagtga
 ggaaatgactgggtgataatacaaatgtacagaaggataaaaaatatttcagatggccaaaatggtaaagtggat
 gataattgttggaaacaaagggacaaattgttcaggaggaggaaagagagaaaggtagtgttgggtttttcagttt
 actggaaatataatacaactgcataatggaggtgctcttgtgccaatttatgctgttggcacaagttgggttttca
 gctccttcaaatgggaagcaatttatggatggcggtgggcaactccgtctcaagagtgagccacctctctgtt
 gggagttctactctcatcattgtctatgttgcctttaggaattgcaagtgctttatgcatccttgcctagaacca
 tgtttcttgttaccgctggatataagacagcctctttgcttttccataaaatgcacttttgcattttccgtgc
 tccaatgtccttcttgcagtgccacaccgagtgggcggaattctaaacaga

SEQ ID No. 44 (Exón 5 de NtMRP3)

Gcatcgacagatcaaaagtgaattgatctgaatgttccattcaagttggatcctttgccttcacaataaatac
 agcttttagggattattggagtaattgtcacaaagttgcatggcaggtcttcattgtctttattccggctcattgc
 agtttgcactcgggtggag

SEQ ID No. 45 (Exón 6 de NtMRP3)

Caatattacataccatcagcaagagaactggcaagggtaaaatgggacatgcaaagctccagtaatacagcact
 ttgccgagacaatttcaggatcaagcacaattagaagtttcgatcaggaatctagattccaggacacaagtat
 gaaattgatagacaattattctcggtcctaagtttcacatcgctgctgcaatggagtggtttgtttgcgtttg
 gatatgttatctctgatcacttttgctttctctttaattttcttgatctctcttctgttggaacaattgacc
 caa

SEQ ID No. 46 (Exón 7 de NtMRP3)

Gtgttgctggcttagctgttacatatgggcttaactctgaacataatacaagctgggttggttggaatctttg
 tatgatggaaaaataaaattattttctgttgaaagaatacttcagtatactgctcttccaagtgaatctctctt
 atcatagaatocaaacagaccagaccctaactggccatcttgtggagaggttgatttttagcaatcttcag

SEQ ID No. 47 (Exón 8 de NtMRP3)

Gtccgatatgctcctcacatgctctcgtgttgcgaggccttacatgcactttctttgggtggaagaagactg
 gaattgtcggtaggacaggcagcggtaaaatctactctaatacagaccctcttcgcgatagttgaaccagctgc
 tggacaaaataaaaatagatgggtatcagcatctcctcaattgggttgcatgatctacggtctagattgagtata
 attccacaggatccaactatgtttgaggggaacagttcgacgaacctagaccgcttgaagagtattcagatg
 aacaaatttgggag

SEQ ID No. 48 (Exón 9 de NtMRP3)

Gcgctcgataagtgtcagctaggagaagaagtgaggaagaaagaaggcaaacctttattctacag

SEQ ID No. 49 (Exón 10 de NtMRP3)

tatctgagaatggagagaactggaggttagggccaaaggcagctgggtctgccttggccgtgtgctactgaaaaa
 gagcaaggctcctggctccttgacgaggctacagcatctgtcgacactgcaactgataatcttattcagcaaaact
 ctaaggctgcaottctctgattccacgggttataaccattgctcataggattacatctgtgcttgacagtata
 tggctcctactattagatcatg

SEQ ID No. 50 (Exón 11 de NtMRP3)

ggctcattgctgaatacggcactccagccagggttggttagagaacgaatcctcattgtttgctaagctcgtggc
 agagtatagtatgaggtcaaattcaagttttgagaatgtttcagacatgtga

SEQ ID NO: 51 (Secuencia de ADNc de NtMRP3 tal como se predijo de la secuencia de clon de BAC)

atggaaattgcaaaggcatgtctgtgtttcaatctttgaggagggacaataatgctggc
 caciaacagagtagtactaggaatgctaggttcttgtactacaaatcaacctgttttgt
 tcaataggtctagccatcttttagctttgtgttatgtttgttagctcatttttatttggtat
 agaaatggttggtcagaagaaaaaattataacccttttggttttgcattaaagtgtcta
 gcttgggtgtcaatctctgttttcttgacacccagttccttaattcttgtgaaacaaa
 taccctcttgttttaagagtttgggtgggggcttttcttcttgtttcttgttattgcctt
 gttatagacctgtttatggggaaaagaaccaatctttaccaactcaattttgtataoct
 gatgttgttttactcttatgggttattcttctgttttgttgggtttattgttaaaaca
 gagagtgaggagaatatgcttcaggaacccctcttaaatggtagtggttccaatggcatg
 gactcaaagaagtctactgggatcaaactgtcacccttatgccaatgctaacattttt
 agtctctttactttctcttggtgggtcccttaatttctgttggcaacaagaaccatta
 gaccttgaggatgttccctcagcttcactttgatgatagtgtaaaggagttttcctatt
 tttagagaaaaactagaatctgtgggtgggggaaatagtaaccgtgtgactacctcatg
 ctggtgaaggctttgttttccacagcacggaaggagatagtggtatcggctctcttctgtg
 cttctttacgctctggcgtcttttgttggcccgtaacctcattgataccttagttcagtat

ctgaatggaaaacgagactttgataatgaagggttatgtcttagtggctgcattcttcgtt
gcaaagttggtggagtgtttggcgcaaaggcattggtttttcaagggtgcagcagggaggg
tatcgggcacgggcagcactggtttccaaaatctacaacaagggtttaaccctctcctgt
cagtcaaagcaaagccacactagtggagagatcatcaattttatgacagttgatgccgag
aggattggtgacttcggttggtatatgcatgatccttggatggtaatcatacaagttgct
ctggcattggtgatactctataaaaaatcttggcctagctgctatcgccgcgtttgttgct
acaataatagtgtgttggaacatccctttaggagggtttgcaggagaagtttcaggag
aaactcatggaatcgaaagatagaaggatgaaggctacatctgaagtcttaaggaatatg
agaatactcaagcttcaagcttgggagatgaagtttctgtctaggatcttggacctcagg
actacagaggcaggatggttgatgaaatatgtgtacacatcagctatgactacttttgtc
ttctgggttgctcctacatttgtttctgtgacgaccttggcgctgcaatgcttatggga
atccacttgaatctgggaagatatgtctgcacttgcgacatttagaattcttcaagag
cccatctacaatctccagatacaatttcaatgattgctcaaaccaaagtttctcttgat
cgtattgcatctttcctttctcttgatgacttgcagcctgatgtcatagagaagcttcca
aaaggtagttctgatgaagcaattgagattgtaggtgggaacttcgcttgggatgcatcc
acctcgactccacttctaaaggatgtaaatcttagagtgttaatggcatgagagttgcc
atgtgtggtacagttggttcaggaaaatcaagcttactgtctagcattttaggagagatg
cccaaattatcagggactattaaacttagtggaacgaaggcttatgttgcacagtgcgcc
tggtacagagtggaagatagaggagaacatattttggtaaagagatgcagagggag
aagtatgataaagttcttgaagcgtgctccttaaagaaagacctggaattctctctttt
ggcgatcaaacagaaataggggagaggggcattaatgtgagcgttgacagaagcagaga
atacagattgctcgtgctctttaccaagatgctgatgtttacctatttgatgatccgttc
agtgtgtggtgctcataccggatcccatctcttcagtgaatgtataatggggctattg
aattcaaaaacagttttatatgttacacatcaagtggagtttttgctgctgcggatttg
atcttggctcatgaaagatggaaggatcagtgaactgggaaatacaatgatcttctcaa
ttaggtagtgaactcatggaacttgtgggtgctcaccaagaagctttaacagcaattgac
acagtttaaggagagaagcattgagaaagagtgaggaaatgactggtgataatacaaatgta
cagaaggataaaaaatatttcagatggccaaaatggtaaagtggatgatattgttggaaca
aagggacaaattgttcaggaggaggaaagagagaaaggtagtgttgggttttccagtttac
tggaatatatacaactgcatatggaggtgctcttgtgccatttatgctgttggcaca
gttgggtttcagctccttcaaattggaagcaattattggatggcgtgggcaactcccgctc
tcaaagagtgaagccacctcctgttgggagttctactctcatcattgtctatgttgcttta
ggaattgcaagtgtttatgcatccttgcctagaaacctgtttcttgttaccgctggatat
aagacagcctccttgcctttccataaaatgcatctttgcattttccgtgctccaatgtcc
ttcttcgatgccacaccgagtggcggttctaaacagagcatcgacagatcaaagtgca
attgatctgaatgttccattcaagttggatcctttgccttcacaataatacagctttta
gggattattggagtaattgtcacaagttgcatggcaggtcttcattgtctttattccggtc
attgcagtttgcctctggttgagcaatattacataccatcagcacgagaactggcacgg
ctaaatgggacatgcaaagctccagtaatacagcactttgccgagacaatttcaggatca
agcacaattagaagtttcgatcaggaatctagattccaggacacaagtatgaaattgata
gacaattattctcggcctaagtttcacatcgctgctgcaatggagtggctttgtttgcgt
ttggatatgttatctctgatcacttttgccttctctttaaattttcttgatctctctcct
gttgaacaattgaccaagtgttgctggcttagctgttacatatgggcttaattctgaac
ataatacaagctcgggtgttttggaatctttgtatgatggaaaataaaattatttctgtt
gaaagaatacttcagtatactgctcttccaagtgaatctcctcttatcatagaatccaac
agaccagaccctaactggccatcttgtggagaggttgatttttagcaatcttcagggtccga
tatgctcctcacatgcctctcgtgttgcgaggccttacatgcactttcttgggtggaag
aagactggaattgtcggtaggacaggcagcggtaaatctactctaatacagaccctcttc
cgcatagttgaaccagctgctggacaaaataaaaatagatgggtatcagcatctcctcaatt
ggtttgcatgatctacggtctagattgagtataattccacaggatccaactatgtttgag
ggaacagttcgcagcaacctagaccgcttgaagagtattcagatgaacaaatttgggag

gcgctcgataagtgtcagctaggagaagaagtgaggaagaaagaaggcaaactttattct
 acagtatctgagaatggagagaactggagtgtaggccaaaggcagctggctctgccttggc
 cgtgtgctactgaaaaagagcaaggtcctggctccttgacgaggctacagcatctgtcgac
 actgcaactgataatcttattcagcaaaactctaaggctgcacttctctgattccacggtt
 ataaccattgctcataggattacatctgtgcttgacagtgatatggctcctactattagat
 catggggtcattgctgaatacggcactccagccaggttgtagagaacgaatcctcattg
 tttgctaagctcgtggcagagtatagtaggtcaaattcaagttttgagaatgtttca
 gacatgtga

SEQ ID NO: 52 (secuencia de proteína de NtMRP3; 5'-3'; - denota codón de detención putativo)

MEIAKGMSVFQSLRRDNNAGHKQSSTRNARFLYYKSTLFCSIGLAIFS FVLCLLAH FYWY
 RNGWSEEKIIITLLDFALKLLAWLSISVFLHTQFLNSCETKYPLVLRVWGLFFFVSCYCL
 VIDLVYGEKNQSLPTQFCIPDVVFTLMGLFFCFVGFIVKTESEENMLQEPLLNGSVANGM
 DSKKSTGDQTVTPYANANIFSLFTFSWMGPLISVGNKKPLDLEDVPQLHFDDSVKGSFPI
 FREKLESVGGGNSNRVTTFMLVKALVFTARKEIVLSALFVLLYALASFVGPYLIDTLVQY
 LNGKRDFDNEGYVLVAFFVAKLVECLAQRHWWFFKVQQGGYRARAALVSKIYNKGLTLSC
 QSKQSHTSGEIIINFMTVDAERIGDFGWYMHDPWMVIIQVALALVILYKNLGLAAIAAFVA
 TIIIVMLANIPLGSLQEKFQEKLMESKDRMKATSEVLRNMRI LKLQAWEMKFLSRILDLR
 TTEAGWLMKYVYTSAMTTFVFWVAPT FVSVTTFGAAMLGIPLES GKILSALATFRILQE
 PIYNLPDTISMIAQTKVSLDRIASFSLDDLQPDVIEKL PKGSSDEAIEIVGGNFAWDAS
 TSTPLLKDVNLRLVNLGMRVAICGTVGSGKSSLLSSILGEMPKLSGTIKLSGTKAYVAQSP
 WIQSGKIEENILFGKEMQREKYDKVLEACSLKKDLEILSFGDQTEIGERGINLSGGQKQR
 IQIARALYQDADVYLFDDPFSAVDAHTGSHLFSECIMGLLNSKTVLYVTHQVEFLPAADL
 ILVMKDGRISSETGKYNDLLKLGSDFMELVGAHQEALTAIDTVKGEALRKSEEMTGDNTNV
 QKDKNISDGQNGKVDDIVGTGQIVQEEEREKGSVGFVYWKYITTAYGGALVPFMLLAQ
 VGFQLLQIGSNYWMAWATPVSKSEPPVGSSTLIIVYVALGIASALCILARTMFLVTAGY
 KTASLLFHKMHLICIFRAPMSFFDATPSGRILNRASTDQSAIDLNVPIQVGSFAFTIIQLL
 GIIGVMSQVAWQVFIVFIPVIAVCIWLEQYYIPSARELARLNGTCKAPVIQHF AETISGS
 STIRSFQESRFQDTSMKLIDNYSRPFHIAAAMEWLCLRLDMLSLITFAFSLIFLISLP
 VGTIDPSVAGLAVTYGLNLNIIQARVVWNLCMENKIIISVERILQYTALPSESPLIIESN
 RPDPNWPSCGEVDFSNLQVRYAPHMPLVLRGLTCTFFGGKKTGIVGRTGSGKSTLIQTLF
 RIVEPAAGQIKIDGISISSIGLHDLRSRLSII PQDPTMFEGTVRSNLDPLEEYSDEQIWE
 ALDKCQLGEEVRKKEGKLYSTVSENGENWSVGQRQLVCLGRVLLKKSKVLVLDEATASVD
 TATDNLIQQLRLHFSDSTVITIAHRITSVLDSMDVLLLDHGLIAEYGT PARLLENESL
 FAKLVAEYSMRSNSSFENVSDM-

REIVINDICACIONES

1. Una planta o célula vegetal mutante, que no se presenta en la naturaleza, o transgénica, que comprende

a) un polinucleótido seleccionado del grupo constituido por:

(i) un polinucleótido que comprende, consiste o esencialmente consiste en una secuencia que tiene al menos 71 % de identidad de secuencia con SEQ ID NOs: 1, 2, 27, 28 o 29 o 51; o

(ii) un polinucleótido que comprende, consiste o esencialmente consiste en una secuencia que tiene al menos 65 % de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NOs: 3 a 23 o 30 a 50 o 53;

o

(iii) un polinucleótido que codifica un polipéptido NtMRP que comprende, consiste o esencialmente consiste en una secuencia que tiene al menos 65% de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NOs. 24 a 26 o 52, y en cuyo caso el polipéptido tiene actividad transportadora de metal pesado; o

(b) un constructo de polinucleótido de al menos 15 nucleótidos contiguos de longitud que es al menos 65 % idéntica con una región de cualquiera de SEQ ID NOs: 1 a 23 o 27 a 51 o 53; o

(e) un ARN bicatenario que comprende al menos dos secuencias que son al menos parcialmente complementarias entre sí y en cuyo caso una hebra sentido comprende una primera secuencia y una hebra antisentido comprende una segunda secuencia y en cuyo caso al menos una de las secuencias comprende al menos 10 nucleótidos contiguos de ARN NtMRP; o

(d) un vector de expresión que comprende el polinucleótido tal como se describe en (i), (ii) o (iii) o el constructo de polinucleótido como se describe en (b).

2. Una planta mutante, que no se presenta en la naturaleza, o transgénica, en cuyo caso la expresión de polinucleótido NtMRP y la actividad de la proteína codificada por el mismo o la actividad de la proteína codificada por el mismo están disminuidas y las hojas de dicha planta tienen una reducción en el contenido de cadmio de al menos 5% si se compara con una planta de control en la que la expresión de NtMRP y la actividad de la proteína codificada por el mismo o la actividad de la proteína codificada por el mismo no ha disminuido.

3. Material vegetal que incluye biomasa, semillas u hojas que comprenden células o tejido de la planta de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2.

4. Un producto de tabaco que comprende una parte de la planta de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 o material vegetal de acuerdo con la reivindicación 3.

5. Un método para reducir niveles de cadmio en al menos una parte de un vegetal, que comprende el paso de reducir la expresión de un polinucleótido NtMRP y la actividad de la

proteína codificada por el mismo o la actividad de la proteína codificada por el mismo en comparación con una planta l de control en la que la expresión del polinucleótido NtMRP y la actividad de la proteína codificada por el mismo o la actividad de la proteína codificada por el mismo no ha disminuido

6. Una planta mutante, que no se presenta en la naturaleza, o transgénica obtenida u obtenible por el método de acuerdo con la reivindicación 5, en cuyo caso hay una reducción en el contenido de cadmio de al menos alrededor de 5% en al menos una parte de la planta en comparación con una planta de control en la que la expresión de polinucleótido NtMRP y la actividad de la proteína codificada por el mismo o la actividad de la proteína codificada por el mismo no ha disminuido.

7. Un polipéptido NtMRP aislado, expresado por un polinucleótido seleccionado del grupo constituido por:

(i) un polinucleótido que comprende, consiste o esencialmente consiste en una secuencia que tiene al menos 71 % de identidad de secuencia con SEQ ID NOs: 1, 2, 27, 28 o 29 o 51; o

(ii) un polinucleótido que comprende, consiste o esencialmente consiste en una secuencia que tiene al menos 65 % de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NOs: 3 a 23 o 30 a 50 o 53;

o

un polipéptido NtMRP aislado que comprende, consiste o esencialmente consiste en la secuencia descrita en cualquiera de SEQ ID Nos. 24 a 26 o 52, en cuyo caso el polipéptido tiene actividad transportadora de metal pesado.

8. Un anticuerpo que enlaza específicamente al polipéptido aislado de acuerdo con la reivindicación 7.

9. Un método de detectar un polinucleótido NtMRP en una muestra que comprende el paso de:

(a) proporcionar una muestra que comprende un polinucleótido;

(b) poner en contacto dicha muestra con uno o varios cebadores o una o varias sondas para detectar específicamente al menos una porción de polinucleótido NtMRP; y

(c) detectar la presencia de un producto de amplificación, en cuyo caso la presencia de un producto de amplificación es indicativo de la presencia del polinucleótido NtMRP en la muestra.

10. Un polinucleótido aislado seleccionado del grupo constituido por:

un polinucleótido aislado que comprende, consiste o esencialmente consiste en una secuencia que tiene al menos 71 % de identidad de secuencia con SEQ ID NOs: 1, 2, 27, 28 o 29 o 51;

un polinucleótido aislado que comprende, consiste o esencialmente consiste en una secuencia que tiene al menos 65 % de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NOs: 3 a 23 o 30 a 50 o 53;

un polinucleótido que codifica un polipéptido NtMRP que comprende, consiste o esencialmente consiste en una secuencia que tiene al menos 65% de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NOs. 24 a 30 26 o 52, y en cuyo caso el polipéptido tiene actividad transportadora de metal pesado.

11. Un constructo de polinucleótido de al menos 15 nucleótidos contiguos de longitud que es al menos 65 % idéntica a una región de cualquiera de SEQ ID NOs: 1 a 23 o 27 a 51 o 53.

12. Un ARN bicatenario que comprende al menos dos secuencias que son al menos parcialmente complementarias entre sí y en cuyo caso una hebra sentido comprende una primera secuencia y una hebra antisentido comprende una segunda secuencia y en cuyo caso al menos una de las secuencias comprende al menos 10 nucleótidos contiguos de NtMRP RNA.

13. El ARN bicatenario de acuerdo con la reivindicación 12, que comprende una primera secuencia que tiene al menos 65% de identidad de secuencia con al menos 10 nucleótidos de NtMRP3 o NtMRP4;

una segunda secuencia; y

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

en cuyo caso la segunda secuencia está posicionada entre la primera secuencia y la tercera secuencia, y la segunda secuencia está ligada de modo operable a la primera secuencia y a la tercera secuencia.

14. El ARN bicatenario de la reivindicación 12 o la reivindicación 13, en cuyo caso la primera secuencia tiene al menos 65% de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo constituido por: SEQ ID NOs: 3 a 23 y 30 a 50 y 53 y/o en cuyo caso la tercera secuencia tiene al menos 65% de identidad de secuencia con el complemento inverso de la secuencia correspondiente a SEQ ID NOs: 3 a 23 y 30 a 50 y 53.

15. Un vector de expresión que comprende el polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 10 o el constructo de polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 11.

Reducción de metal pesado en vegetales

Resumen:

Se describe un vegetal, o célula vegetal, mutante, que no se encuentra en la naturaleza o transgénica, que comprende (a) un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en: (i) un polinucleótido que comprende, consiste o esencialmente consiste en una secuencia que tiene al menos 71 % de identidad de secuencia con SEQ ID NOs: 1, 2, 27, 28 o 29 o 51; o (ii) un polinucleótido que comprende, consiste o esencialmente consiste de una secuencia que tiene al menos 65 % de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NOs: 3 a 23 o 30 a 50; o (iii) un polinucleótido que codifica un polipéptido NtMRP que comprende, consiste o esencialmente consiste en una secuencia que tiene al menos 65% de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NOs. 24 a 26 o 52, y en cuyo caso el polipéptido tiene una actividad transportadora de metal pesado; o (b) un constructo polinucleótido de al menos 15 nucleótidos contiguos en una longitud que es al menos 65 % idéntica a una región de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 23 o 27 a 51; o (c) un ARN bicatenario que comprende al menos dos secuencias que son al menos parcialmente complementarias entre sí y en cuyo caso una hebra sentido comprende una primera secuencia y una hebra antisentido comprende una segunda secuencia y en cuyo caso al menos una de las secuencias comprende al menos 10 nucleótidos contiguos de ARN NtMRP; o (d) un vector de expresión que comprende el polinucleótido tal como se describe en (i), (ii) o (iii) o el constructo polinucleótido como se describe en (b).

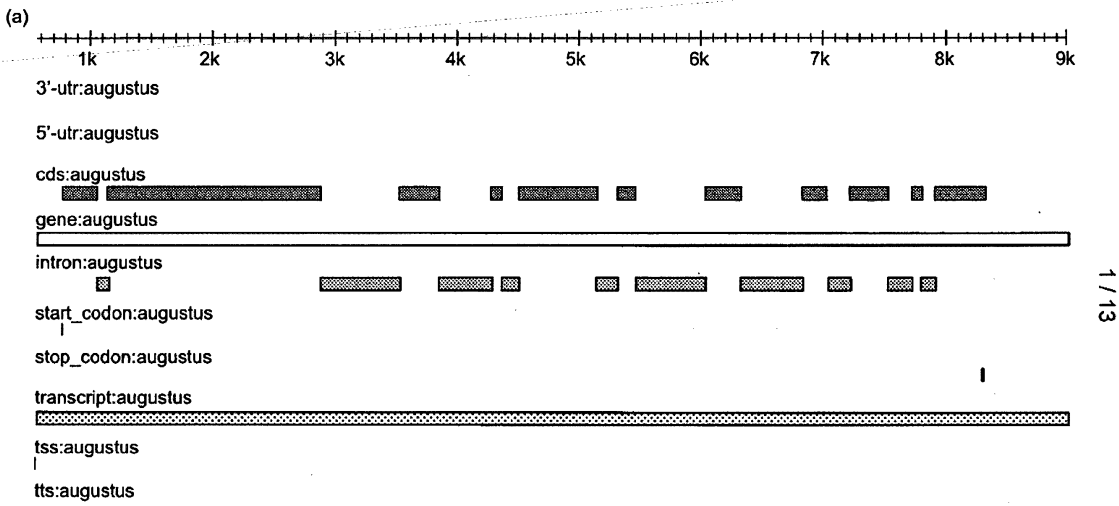


FIG. 1

2 / 13

(b) tcttagtactgtaagtgaaccagcaaggaactgcaaagttagatttcttgttcatcaaat
aaatccttgagctgagagatatgattttttctaaggaatttctctttggctctctgtagt
ggtgagtttgattcatatttcaatctagtttttagctttgcttaaaagcttcttcttggc
actagaccaaataccttttctcttttgcatacacatttttgagtttcatttctottatt
atagagaaaatcttttgatgggtaggttttttctcttttgcattaatgattagaatt
tatcattgttaaatggtactccctcaataactttttgatttaaaaaaaaaactgtccttt
cattcataatcatcatctcctttattatattactctaaactgttgctaaaagttccttttt
gtatattttccctacatgaacttttgcctgtactgtgaaagttgatgaacttttattgtac
aatgttttggtccagtagctaacagcccttttatttaattctgagaggtctctttctctt
tctcttcacactttcacatgtttccgtttcctgtagatttctcctttctctttccttgg
tctttttccaactcataatcttcatgtgatttcaatttttgtttggttttattccatctt
ttgtctcttttgatatgggtgacaaacatcttctcttgcctgaataaaaaatttcaccttt
ttc agtqtatgcagattcaggggatataaagacataaaggatgaatcttttatgggtataa
c **ATG** GATATGAGGAACAGTATGTCTTCAGAACTTGTGTTAGCATCATTCTTGTCTCGC

FIG. 1

3 / 13

(b) CTCCACATTTCAATCGTCAGAGGATTGAGCAGTTGTTAAATGGTTAAGATTCAATTTTCCT
CTCTCCATGTCCACAAAGGACTCTTCTATCTTCCATTGATGTGCTGCTTTTGCTTACTTT
CATTGTATTTGCAGTACAAAAGTTGTACTCAAAGTTGAGGTCCAATGAGCACTCTACTTC
TAGCATTGATAAGCCTCTAATTGCACACACAGGACTTCTgttagaaccaatccttggtt
taagctgtctctgattttgtcagctatttttagccttatctctatagttttatgcatttt
ggttattgtgggaaattcccagTCGCCTTGGAAAGTCATAGATGGACTGTATTGGTTGTT
TCAGGCGATTACACATGTTGTAATCACTATACTAATAGTTCATGAGAAAAGATTTACGCG
TATTTCCATCCACTGTCCCTGCGCGTGTGTTGGATTGCAAACTTTGTAGTTATGAGTTT
GTTCTTTGGTTGTGGGATCACAAGGCTTGTGTCACTTAAGGAAATTGATCCTAATTTAAG
AATGGATGATATAAGTTTCATTAGTTTCATTTCCCTATTTCTGTTGTTCTCTTATTGTTGC
CATTAAAGGTTGACCGGAGTTGCTGTAATTAGTGATTCTGAATCTCACTTAAGTGATGA
AACCAATGGTTATGAACCTCTGGATAAATCCAGTGTGAGTGGCTTTGCTTCAGCTTCTCT
AATATCGAAAGCCTTTTGGATTTGGATGAACCTTTTACTGCAAAAAGGTTACAAGTCACC
TCTCAAGATTGATGAAGTTCTCTCACTTTCCCACTGCATAGAGCAGAGAAAATGTCTCA
ACTTTTCGAAAGAAATTGGCCTAAACCTGAAGAAATATCAAAGCATCCTGTCCGAACAAC
ATTGCTGCGTTGCTTTTGGGAAGGAAGTTATTTTACTGCCATTCTTGCAAGTAATTAGGGT
ATGTGTTATGTATGTAGGGCCAACACTCATACAAAGATTGTTGATTACACAGCAGGAAA
GAGGACATCTCCTTATGAAGGATACTACCTTATAGGAACCTCTCCTAATAGCCAAATTTGT
GGAAGTTCTAACCTCTCATCAGTTCAACTTTAACTCCCAAAGCTTGGCATGCTTATTCG
AGCGACACTTCTCACTTCTTTGTATAAGAAGGGGTTAAGGTTGTGCTGCTCAGCTAGACA
GGCTCATGGTGTGGACAGATTGTAAATTATATGGCCGTCGATGCTCAGCAGCTGTCCGA
TATGATGCTACAGCTACATTCCATTTGGCTCATGCCATTGCAAGTTTCTGTGGCTTTAGG
CATCCTTTTATACTTACCTCGGTGCTTCAACTGTTGTAACGCTAGCTGGACTTGCAGCAGT
GATGGTATTTGTTGTTGTTGGAACATAAAGAAACAACAGGTTTCAATTTAACATCATGAA
GAATCGTGATTCTAGAATGAAAGCGACAAATGAGATGCTTAATTATATGCGCGTTATAAA
GTTCCAGGCATGGGAAGAACATTTTAAACAAAAGAATTGAATCCTTCCGCGAATCCGAGTA
TGGATGGTTGTCCAAGTTCTTGTACTCAATCGCTGGGAATATCATTGTCTTGTGGAGCAC
TCCTCTTCTAGTGGCTACACTCACTTTTGAAGTGCAATCTTGTGGGAATCCCGCTTGG
TGCAGGGACAGTGTTCAGTCAACATCTCTCTTCAAGATGTTGCAGGAACCGATCAGGGC
TTTCCCTCAATCCATGATCTCACTTTTACAAGCAATGATATCTCTTGTAGATTGGACAA
ATATATGATGAGTAAGGAGTTAGTGGATAAAGCTGTGGAAAGACTAGAAGGTTGTGGGGG
TACAATTGCTATGCAGGTGAAAGATGGAGCTTTTGTGGGATGATGAAAACAGTAAAGA
AGAATTGAAAAATGTAAACTTTGAGATTAGAAAAGGAGAGCTTGCAGCAGTAGTGGGGAC
AGTTGGGGCGGGGAAGTCTTCCCTCCTTGCACTGTACTTGGTGAGATGCACAAGTTGTC
GGGTCAGgtatggctctctcctctctgtttgtttgattaatacaaaactttgctgccaatt
accttttgccccctgtttgctacctctttctgtggtataaaaaattaatgtaggctaag
tgtagagtggaggtattatatgcagaacaattgcaatcaagcaattacctgtgagatact

FIG. 1(Cont'd)

(b) attttgttttcatatttagtggactggtacattctcattggtgtatcgtttgatctccacc
aaagcagaggttttactggccgacagagtcaaaactactgtgcttccactccttttactcca
atccttagtagtctttgcttctaataagactcaagcgtgtaatagaacaccattatatt
attagctgattagttactttacaattccagagcataatttacattttctgcttggtgtct
attactctggataaacagtcctaataagcaagcaaaatcaactgtgttttcagtcttgagct
gaccaattagttcatgatgtcctcagcttgccaagctggtgctcaccggaattatgtg
ggaccttcgtacttaatacaactagttcaccttcttcttaaaaatattgaatgatttgatt
ggttaatagttccttaaatgtagtaattatttgtaacttactttaccaaccccttgctc
aacag**GTCACAATTTGTGGTTCAACTGCCTATGTTGCACAAACATCGTGGATTGAGAATG**
GCACGATACAAGAAAATATCCTGTTTGGTATGCCAATGAACAGAGACAGATACAAGGAAG
TGATCCGGGTTTGCTGCTTGGAGAAGGACTTGGAATAATGGAGTTTGGAGACCAGACTG
AAATAGGAGAACGTGGCATCAACCTCAGTGGTGGTGAAGCAGCGAATCCAGCTTGCAA
GAGCTGTTTACCAGGACTGTGATATTTATCTTCTAGATGATGTATTCACTGCAGTTGATG
CTCACACTGGCTCTGAAATCTTCAAGgttagaagtcacaaatgtcatgtgtcattgaaga
tttaatttaagatagaattacattgtttcattctgcaaatatggacctatcagagaaa
aatcatggattttgaatggctactttcccagtggaagacacatatcatttctctgggagga
agatgtgaaagtggcaagctatttactccaaaaagtataatctaaaagacttttattaag
tttggaaggcttaatccatcatttgttatctgtttgtctacttgtctttattaaaaattctt
cttagtccaatcactttogatgaagttgactagtcttagtgcactgaatactttaaatct
ttgccttggtgtctctatattttcagccatctcaattccgaagctcatatttgttttctc
tttgtaatgtccatctgaaagtttcatgcttttttgag**GAATGTGTGAGGGGAATCTTT**
AAAGATAAAACCATTTTGCTTGTCACACACCAAGTTGACTTCTTGATAATGTTGACCTG
ATCCTTgtaagtttcagagtggtttatcaacccctttggaaccaagtgtcaagagtagtg
tttcttggttgtaaatgattcacatgtgtgttggtttctataaaacctgaactttatgt
tttatcagagtggtttgctttcttgaaag**GTATGCGAGATGGGATGATCGTGCAATCTGG**
CAAATATAATGAGATATTAGAAGCTGGAATGGATTTTAAAGAGCTAGTAGCTGCACATGA
GACCTCTTTAGAACTTGTTGACGTGGAAACAACCAAAGAGAGCAATGCCTCCCTTGAAGA
ATCAAAATCTTCTCGAAGATTATCTAAGGAAGAAAACGGAGATGATAAATCTCAACAGTC
TACATCTGATAGGGGGGATTCTAAACTTATAAAGGAAGAAAGAGAAAACCTGGAAAAGT
CAGTCTCGTGTGTACAAGCTATATATTACTGAAGCTTTTGGATGCTGGGGTGTAGTGCT
AGTTATCTTGTTTTCGTTCTTGTTGGCAAAGTTCTCTAATGGCAAAGTGATTATTGGCTGGC
ATATGAACTTCAGCGGATCGTGCCATGTCTTCAATCCTTCTCTGTTTATTGGGATATA
CGGTGTTATTGCAGTTGTTTCTTCGTTGCTGATAGTGATCAGGATGTATTTTGTGACACT
TATGGGGCTCAAGACTGCCCAAATATTTTTCGGACAGATTCTTTACAGCATACTGCATGC
TCCTATGTCAATTTTTGACACAACACCTTCCGGAAGAATTCTGAGTCGGgtaaaatttctg
aggacaagtttttccttttgcatgtaaattcaaaccttgctgcttagatgattaaataat
gaaaaaatatccattgcatgttttaaatgtgtatgacatgttagaattttgaatagaagtt

FIG. 1 (Cont'd)

5 / 13

(b) attcactgatgttgagatgtttgtttttttctgcagGCATCTAATGATCAGACCAACA
TTGATGTCTTCTCCCGTTTTTATGAATCTCACTTTGGCCATGTTTATCACACTGCTCG
GCATCATCATCATCACATGCCAATATTCTTGGCCTACCGTACTACTTTTGATTCTCTGG
GTTGGCTTAATATCTGGTACCGGgtatgagcactgtttataacagccgtcctttttctt
ttcttgtctgaactcaaatttgaatcctttgttttagaggcaattagctgctctgagcat
tttggctgacagttattatgtatatataaaaggcaacttttttattcgttctgtccagcta
aaactttttactttaaaatgtggttaactgcataattctgtgtctcctattttttgattat
ttgcaactctgatcaatctagatttggggaaggcttgttgttagttgatgactagatact
aagctcacatctacattggttgcaagtagaattttcaagttgtcattcacttatattgtt
tgaactaggagattagcattcttctgcaaggagccctgaatgcttgaagttaaacaga
aaagaaaaagttcagggcagatagacataatgtgttaaagtaattcaattggagcacaga
tatatgacatgtgttatttgggagctacgaaaaagataaggactattatgtagactacaa
ttgaaataacaggttaattcatttctggtttacagGGATATTATCTTGCAACATCTCGTGA
ATTGACTCGGCTTGACTCAATTACAAAAGCACCTGTTATTTCATCATTTCTCTGAAAGCAT
CTCAGGTGTATGACTATACGTTGCTTTAGGAAGCAGGAGATGTTTGTAAACGAGAATGT
AAACCGAGTGAATTCCAATCTGCGAATGGATTTCCACAACAATGGATCCAATGAATGGTT
GGGCTTTGACTGGAATTGATGGGAAGCTTACTTCTTTGTGTTTCTGCAATGTTTCATGAT
TGTCTTACCTAGCAGCATCATCAAGCCAGgtataaacccgtccaatgctcatttatggga
attataaattctagattttgataatccttctgtacttttagatctacctgctctactgaaa
aatgaaatgagtatgaggaaatagaatatccggttgagcatttatgtctttctattaaaaa
tttgcatctctatcttcttgtttcaagtcaaaatcttgaacaactatatctagagaatttt
ccttcttgtgaagtaatgcatatatacatcaagagaagtcagagttgctgaatgaaatag
tagatcaaatttaagtgttgtgcctataaagaattgtatggtgagattgaatatagtgtt
catattattttctcaatcttagtgattaaagtattccatacaaacagacaagcatttagt
cgtgcattcattggcactacaaaattatcaaccaagagtaattctttcagctttctc
tgtatatgtgtgttctattctggagctgaagataactaatattcttttttatttctacag
AAAATGTTGGTTTGTCACTATCATATGGCTTGTCTCTTAATAGTGTCTTATTCTGGTCCA
TCTTTGTGAGTTGCTTTGTGGAAAATAAAATGGTTTCTGTGGAAGATTAAACAGTTCT
CAGAAATACCATCAGAAGCAGAGTGGAGAAAGATGGATTTTCTCCACCTTCAAGTTGGC
CAAGCCGTGGGAATGTTGAGCTTGAAAACGTGCAGgtaataattctaactaattctgtgg
ttgctatttgcctagcatttgcacaaaaggaaaactataaaaagttcatagtaaggaagag
agggtagctgtattaacaagcctacagattctttaatttcaaatatgttacggttgaatct
ctatatgtttgttctactgggtcaacagGTTAGATATCGTCCGAACACTCCTCTAGTGCT
TAAAGGAGTTACTCTCAGCATTAGAGGGGGAGAGAAGATAGGTGTTGTTGGTCGTACAGG
GGGTGGAAAATCAACATTAATTCAAGTTTTCTTTCTGTTTGGTGGAGCCTGCAGCTGGAAG
AATAATCATTGATGACGTAGATATATCCAGACTTGGGCTTCATGATCTTAGATCTCGCTT
CGGGATCATTCCTCAAGAGCCACTCTTTTCAAGGAAGTGTGAGAAGCAACATTGACCC

FIG. 1 (Cont'd)

6 / 13

1) **CATTGGACAATATTTCAGATGATGAAATTTGGAAG**gtaatctaacttgetgactgaaataa
tttacaaaaatctcaaaatatagtacagagtttagccaaacatgtcttctgagtgetgaga
tctttttggattataaaattctgtaagagcaacatactatgtttagtgagaagaaaagca
tatactccagtgttttgttatctcccagaatgtctcctaacaatgaaatcgtgtacattgca
g**AGCCTCGAACGCTGCCAACTCAAAGATGTGGTGTCTTTAAAACCCGAAAAACTTGATT**
ACCAGgtaaaatcttctcctctacgtcatccttgtggttctttgcggaattatgcaacca
actttttatgtgtttcaaatatataactgataactgaataactgtcattggtaaatcata
g**TTGTTGATAACGGAGATAACTGGAGTGTCCGACAGAGGCAGCTTCTTGCTTGGAAGA**
GTGATGCTAAACGTAGCAGACTTCTATTATGGATGAGGCAACTGCCTCTGTTGATTCA
CAGACAGATGCAGTGATTGAGAAAATCATCCGCGAGGACTTTGCGGCCTGTACTATAATC
AGCATTGCCACAGAATACCAACAGTCATGGACTGTGATAGAGTTCTTGTTATAGATGCA
GGTGCTGATTCTCTCCTTTTACTTTGTACCTTATTTTGAATCTGGTAAATGATTATTTA
TCTGTATGTGATGGTTTCCAACCAATCATAGTCAGTACCTTTATGAAGAAATGCCTAAT
GTTAGCCAAGTAGTAGTAAATGCATGagtcattagcctattgttttggattttgtgag
tttcatacttcaaactggaagcttatgctatactatctgateccttgtttgtatagattg
ctttcttttcttttctcggatttatcttatataaagcggacagagtaaaagaatgta
aacatgcgtaatttgacctattatagcagattatgtcttattttccaggtcgctgatt
ccacttattaggagtagttacacgtatttatcttttaagtgaataaatagtgtaaagttt
cttttggcactgtcgggtgtaaagaagttaaactcctttctttaacccggcatttcttat
tcatgcaggaatagcaaaaagagtttgacaaaccatctcgtttgcttgaaaggccttcact
ttttggggctttgttcaagaatattgcaaaacgatcctctgagctctaaccacactattt
tggctttcatgccttttctgtgtaaatgcagctatcttggaggataggtgaaacaggaaa
aatacctatccaaatgttacatagatttccaaatagtgttatctcctaagctatcca
gtagatttttggaaatgtaacaatattgggattaacaattgtaattgatgaatctattaa
tcaaatacaatgattattctgttatagatgtagtctgtgcaatgttatatagactgattt

c

FIG. 1(Cont'd)

114

7 / 13

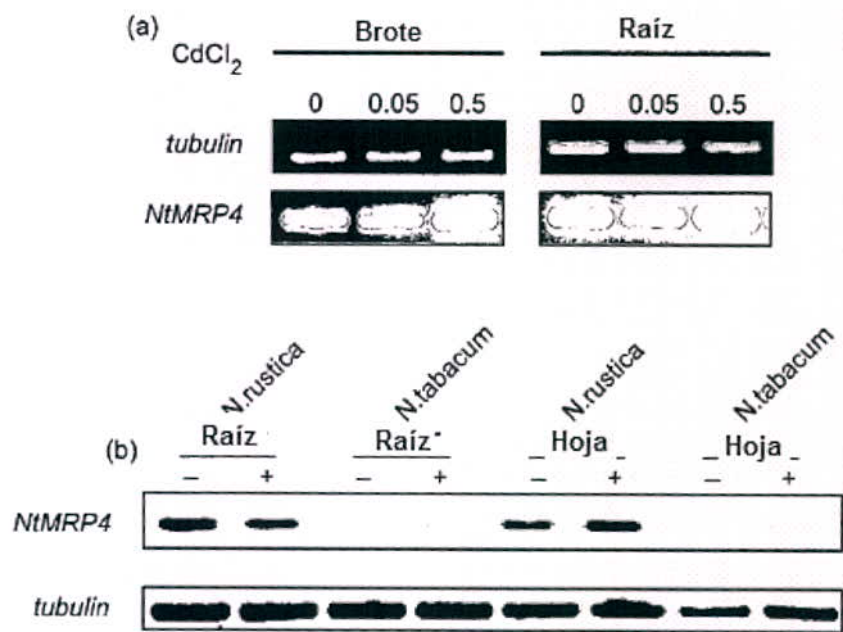


FIG. 2

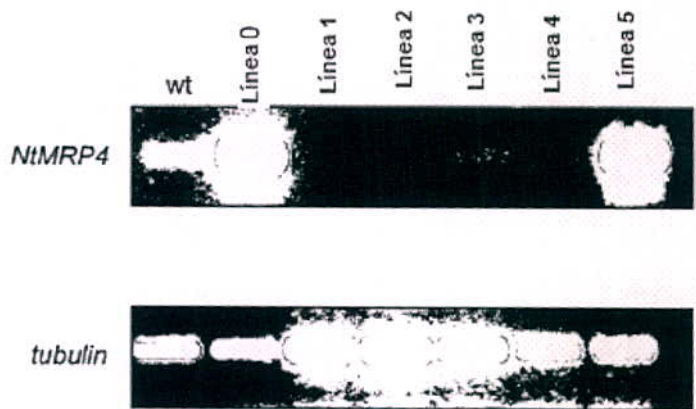


FIG. 3

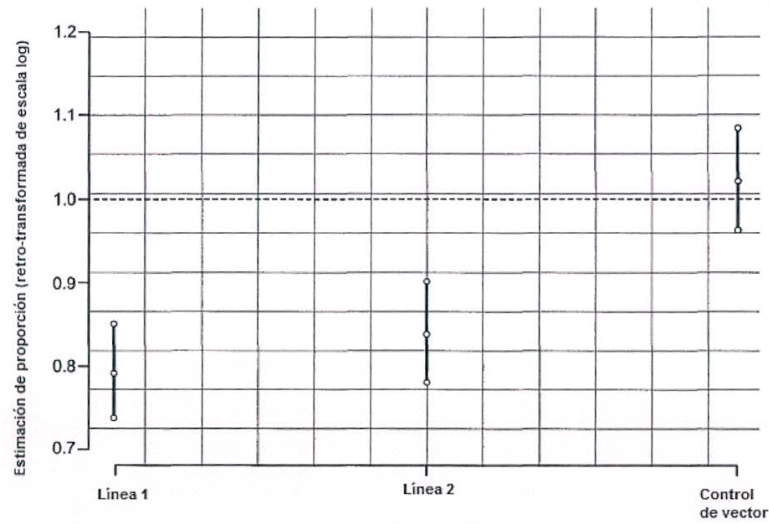


FIG. 4

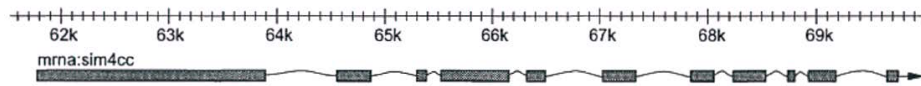


FIG. 5

GAGAGATGATGATTTTATGACAGTTGATGCGGAGAGGATCGTGAGTTGGTTGGTATATGATGATCGTTCCATGGTA
ATCATAGAAGTTGCTCTGGCAATTGCTGATACCTATAAAAAATCTTCGGCTAGCTGCTATCGCGCGCTTTCTTGTAGAA
AATAGTGATGTTCCGAAGCATCGCTTTAGCGAGTTTGCAGGAGAGCTTTGAGGAGAACTCATCGAATCGAAGGATAGAA
GGATGAAGGCTACATCTGAAGTCTTAAGGAATATGAGAACTCAAGCTTCAAGCTTGGGAGATCAAGTTTCTCTTAGG
ATCTTCCAGCTCAGGACTAGAGAGCGAGGATCGTTGATGAAATATCTGTACAACTCAGCTATGAGTACTTTCTCTTCTG
GGTTCCTCTACATTGTTTCTGTGAGGAGCTTTGGCGCTGCAATGCTTATGGGAATCGCACTTGAATCTCGGAAGATAT
TGTCTGAGCTTGGGAGATTAGAACTCTTAAGAGCGCATCTACAACTCTCGAGATACAACTTCAATGATTCGTCGAAGCG
AAAGTTTCTCTGATCGTATTCGATCTTTCTTTCTCTCTCATCACTTCCAGCTCATCTCATAGAGAGCTTCCAAAGCG
TAGTTCTGATGAAGCAATTGAGATTCTAGCTCGGAAGCTTGGCTTGGATCGAATCGAGCTCGAATCTCTTAAGGATG
TAATCTTAGAGTCTTAATCGCATCAGAGCTTCCGATTTCTGCTAGCTTGGTTGAGGAAATCAAGCTTACTCTTAGG
ATTTTAGCAGAGATCGCGAAATTAACCGGATATTAACTTAGTCCAGCGAAGCGTTATGTTCCAGAGTCCCGCTCGAT
ACAGAGTCGAAGCATAGAGGAGAACTATTATTTCGTAAACAGATCCAGAGCGCAAGCTATGATAAAGTCTCTGAAGCGT
CGTCTTAAGAAAGAGCTCGAAATCTCTCTTTTGGCGATGAAGAGAAATAGCGGAGAGCGCGAATTAATTGAGCGGT
CGACAGAGGAGAGAGAACTGAGATTCTCTGCTCTCTTTACCAAGATCGTCACTTTACCTATTGATGATCGGTTGAGTCC
TGTCGATCGCTCATACCGGATCGCATCTCTTCACTgtaagtcctttcatatatatgctttattttcatgcttgatatattt
tacctagccacttgattgacccatcctttaattgcagCAATGCTATTAATCGCGCTATTGAACTTGAAGAAAGAGTTTATATG
TTAGAGATCAAGTGGAGTTTCTGCGCTGCTCGGATTTGATCTTGTactcttttctttcagtaattatgggttgcctaat
atcatatatagacttaactcatttaactatgatatttctcttcagGTGATGAAAGATCGAAGGATGAGTGAAGCTCGGAA
ATAGAAATGATCTTCTCAATTAGGTAGTCACTTCAATGAACTTCTGCTGCTCAGCAAGAGCTTTAAGAGCAATTGAGA

FIG. 6(Cont'd)

CAGTTAAGCGAGNAGCATTGAGAAAGAGTGAAGCAATGACTGGTGTAAATAGCAATGTACAGAACGTAATAAATATTTCAG
GATGGCCAAAATCGTAAGTGGATGATATTGTTGCAACAAAGCGAGCAATTCCTCAGGAGSAGCAAAAGAGAGAAAGCTAG
TGTTCGCTTTTTCAGTTTACTGGAAATATATAAGCACTGCATATCGAGGTCCTCTTGTGGCATTTATGCTGTTGGGAGAAC
TTGGTTTTCAGCTGCTTCATAATTCGAAGCAATTTATTGGATGCGGTGGCAACTCGCGTCTCAAGAGCTGAGGCAAGCTGCT
GTTGGGAGTTCTAGTCTCATCATTTGTCTATGTTGCTTTAGCAATTCGAAGTGCCTTTATGCATCGTTGCTAGAACCATGTT
TCTTGTIACGGCTGGATATAAGACAGGCTCTTTGCTTTTCCATAAATGCCATCTTTGCCATTTTCGGTCTGCAATGTGCT
TCTTCGATGCCAGACCGAGTGGGGGATTCTAAACAGAGtaagtgatgattacattttctttatttagcccttttttt
tccttattagtgtaaatctttctgttacatgactaatcaatgttttgtgaaaattagctagtaatttcagaattaactca
aatgtacttttggtatgaaaacagGCATGGACAGATCAAAAGTCCAAATTCATCTGAATGTTTGGCATTGAAGTTGGATCGTT
CCCTTCACAAATATACAGCTTTTACGGATTATTCCAGTAATCTCAAGCTTCGATCGGAGGCTGTTTATTTGCTTTATTCG
GGTATTTCAGTTTTCGATCTCTTGGAGgttgctacgaccacctttttcgtgtttctttgccttcacaattattctactat
atgctttttcacaaagtgaagtcataacttttagcgacattcataaacgtgagttacatttaagtggtagtttgttttcat
tgtagCAATATTACATACCTCAGCAGGAGAACTGCCAAGGTAATCGGACATGCCAAGCTCCAGTAATACAGCACTTT
CCCGAGACAAATTCAGGATCAAGCACAATTAGAACTTTCGATCAGGAATCTAGATTCCAGGACACAACTATCAAAATTCAT
AGACAAATTAATCTGGGCTTAAGTTTCAGATCGCTGCTGCAATGGAGTGGCTTTGTTTGGGTTGGATATGTTATCTCTGA
TCAGTTTTCGCTTTCTTTAAATTTCTTCATCTCTCTCTCTCTGTTGGAACTATTGAGCCAAgtaagttctctatcttcatg
ttttctttccttgaagtttgtgtgttgaataactcttaagagcacattttctcgtttcttgatttacagGTGTTGGTG
CGTTAGCTGTTACATATCGGCTTAATCTCAACATAATACAGCTCGGCTTCTTTCGAATCTTTGTTATCATCGAAATAAR
ATTATTTCGTTCAAGCAATAGCTTCACTATAGCTCTCTTTCAGTCAATCTCTCTTATCATAGAAATCCAGACAGGAGA
CGCTAAATCGGCAATTTCTGAGAGGCTTCTTTTAGCAATCTTCAGgtaaattaagttattctctgtgttaattatgca

FIG. 6(Cont'd)

ggttaatttgttggtatgggttggtatatctgaaaacttttaataagctccgntatccctccctcactccctctctctctctcc
caccgcttaccatccactttcttttctgctgcaaaagaaagactcgaattctccctaccgacagccagccgttaaatctactcttaata
caccgctcttccgctatgcttgaaacagctcctcgaacaaatctaaatctgactcctatcaccatctcctcacttccgcttccg
tgaatctaccgctcagattcagctataattccacacagatccgaactatgctttgaccgaaacagcttccgacgaagctagacccgc
ttgaacagctattcagatgaacaaatttccgacggtgacagcttggttttgctatttttggattttattttgtttcagatag
gaaaatgacaaattttattttattgagaaactttgtttgatgttatgcttcagccgctccgataactctcagctaccgagaa
gaagtcaggaagaaagaaagcgaactttattctagacgtaacttcaagaaccacatcattttctgatgatttccactttt
agagctgtaantaatcatcttcatttgcgttgctgcagtatctcagatccagacgaactcggagtgtaggcgaagccagctc
ctctccttccgctctgcttactgaaaagacacagctcctcgttccgacagccgacagctcctcctcagacactcgaac
tgaatctcttattcagcgaactctcagcctcgcacttctcgaattccagcgtttataaccatttccctcctacgattacatctc
tgcctcagacgtgatattcctcctactattacatcagtaagaatcatcgtttatgttctggagcaagcggagaaggaaat
tcttggtagttaccttttttttatgctatgctgcagccgctcctcgtcgaatagccactccagccagccttcttaccgacac
gaatcctcatttcttctcagcctcctcctcagcgtatagctacagcctcgaattctcagcttctcagacactcctc
agcttcagaaactaatcttcgttaataatgttacacgacgatgatgataaaattaggggactctagactagtagccttag
tcgatagtggttttgagtttccatctgtggacaccatagcttgaacaagaaccagcgaatgcaggtcatgcctgtggctt
gagggaaactgcaacaatcctatggcagggaaagaaacctacatctagtgtgcaatattgattgtgaaagtggcattttgt
ttttgttagactttttgatgagaaaaatgtatacgttaactttgtgtttacaataatttgaaatgtatgttgagtcaagtga
ttagttagttaagagtgcacggattttgctacttctgggtaaaagaagtaaaccttggtgttgagagtgaagtgaaat
tactagtgtcgaattttgccgcataagctaaatgaaacacttttacgataaaactcctagtgcacaaaggaaaaattcat
tggcaagactagctgtttatgtttcacgac

FIG. 6(Cont'd)

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA RELACIÓN DE ANEXOS	
Dependencia:		Fecha: ____/____/____ AAAA MM DD	Recorrido:
Tipo de Radicación: Entrada: ☐ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐			
Radicador:			Planilla:

ID	No. Radicación	Consecutivo	Item
1	13-67186-	70	
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

Item	Unidad de Conservación
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	Otro
Item	Soporte Documental
7	CD
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
10	Otro

Observaciones:

Folio 121 C.D

Notaría
Sexta

6

DEL CIRCULO DE BOGOTA, D.C.

COPIA NUMERO 1

DE LA ESCRITURA NUMERO: 1444
FECHA: 19/Marzo/2010

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



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

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 -----

18-0

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 Circulo de Bogotá, domiciliada en Bogotá D.C., con matrícula mercantil No. 00820237 y NIT 860041367-3, domiciliada en la Carrera 4a N° 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,

© CAVELIER ABOGADOS

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 N° 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



13

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.

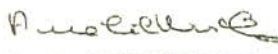
* Legalization may be made by Apostille if the issuing country is a member of the The Hague Convention of October 5, 1961, or before the Colombian Consulate if otherwise.

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 NEUCHÂTEL


Stefan Kaiser
Patent Counsel
Philip Morris Products S.A.



LEGALISATION : -----

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

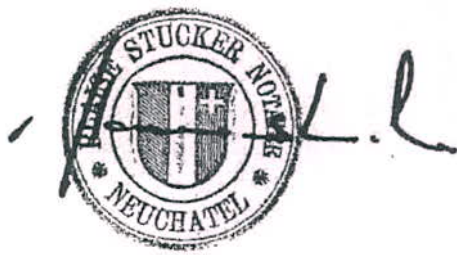
- M. Stefan Kaiser, né le 19 mars 1971, originaire d'Allemagne, à Neuchâtel, Patent Counsel -----

- 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-----



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



67

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 NEUCHÂTEL, SUIZA, A **CAVELIER ABOGADOS**

PHILIP MORRIS PRODUCTS S.A. 2000 NEUCHÂTEL

FIRMADO: AURELIE NUSBAUM, ASESOR

FIRMADO: STEFAN KAISER, ASESOR DE PATENTE

LEGALIZACION

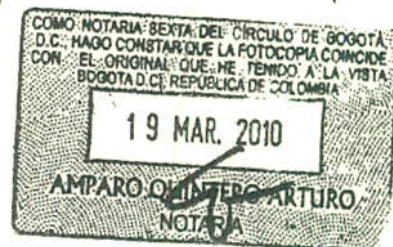
VISTO PARA LEGALIZACION DE LA FIRMA SOCIAL DE PHILIP MORRIS PRODUCTS S.A. DE NEUCHÂTEL, COLOCADAS POR:

- SEÑOR STEFAN KAISER, NACIDO EL 19 DE MARZO DE 1971, ORIGINARIO DE ALEMANIA, EN NEUCHÂTEL, ASESOR DE PATENTE.
- SEÑORA AURELIE NUSBAUM, NACIDA EN OUILLENS, FRANCIA, EL 31 DE ENERO DE 1973, FRANCESA, HIJA DE GERARD, DIVORCIADA, DOMICILIADA EN SAINT-LEGER-LA CHIESAZ (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.



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 CANCELLERIA 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





MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

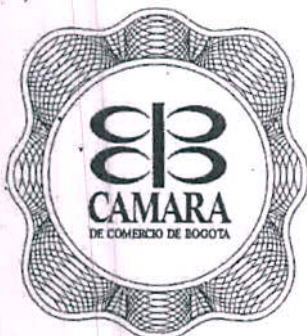
2010 MAR 18 4 40

JEFE DE LEGALACIONES
BOGOTA D.C.

NO SE ACOGE
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO

012400

Helene Clirbe
CADA FOLIO DEBERE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENAR
AS FUNCIONES INDICADAS



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 00021234 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 ABRIL 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.

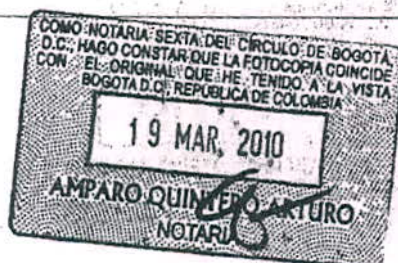
CERTIFICA:

CERTIFICA

QUE POR E.P.NO. 2.034 DE LA NOTARIA 6 DE SANTAFE DE BOGOTA DEL 18 DE ABRIL DE 1.995, INSCRITA EL 27 DE ABRIL 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



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





01



* 9 0 8 4 8 2 2 9 *

CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE CHAPINERO

16 DE MARZO DE 2010 HORA 11:18:42

R027783853

PAGINA: 2 de 3

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. 000008001722568

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 18 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 DELEGACIONES CONFERIDAS A LOS ORGANOS CREADOS POR LOS PRESENTES



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





01



90848230

CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE CHAPINERO

16 DE MARZO DE 2010

HORA 11:18:42

R027783853

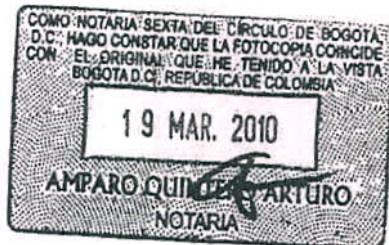
PAGINA: 3 de 3

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 18 DE NOVIEMBRE DE 1996, LA FIRMA MECANICA QUE APARECE A CONTINUACION TIENE PLENA VALIDEZ PARA TODOS LOS EFECTOS LEGALES

Esteban Q





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: \$ 42.860.00 - - - - -

IVA 16% \$ 15.403.00 - - - - -

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. 19066425 Bm

TEL 3473611

REPRESENTANTE LEGAL DE CAVELIER ABOGADOS



AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA SEXTA (6a) DE BOGOTÁ D.C.

T1558/10.PG.ANGELIK

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

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

COPIA QUE EXPIDO CON DESTINO AL INTERESADO 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. MARZO 23 DE 2010

RESOLUCION 01 DE 2009

LA NOTARIA SEXTA DE BOGOTA D.C.



AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0025026

Bogotá D.C., Marzo 13 de 2013 - 07:46:49

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	196856321	12/03/2013	22.941.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	500.000.00	500.000.00
				\$500.000.00

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 13-067186-00000-0000
Fecha: 2013-04-03 16:46:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 133

0010112770-841-088-2.

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Marzo 13 de 2013 - 07:47:00

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

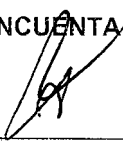
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 13 - 0030561
		Bogotá D.C., Abril 03 de 2013 - 08:50:23

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	189813971	03/04/2013	30.980.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
5 50005-01-01 SOLIGITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	30.000.00	150.000.00
			<u>\$150.000.00</u>
=====			

SON: **CIENTO CINCUENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: 

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-067186-00000-0000
Fecha: 2013-04-03 16:46:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 133

0020: 12770-841-000-2

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD FASE NACIONAL PCT	
(21) N° de solicitud: 22) Fecha de solicitud: (30) Prioridad (31) Prioridad (32) Fecha (33) País 10009180.0 2010/09/03 EP		(51) Int Cl: C07K 014/041 (71) Solicitante(s) PHILIP MORRIS PRODUCTS S.A. (72) Inventor(es) LUCIEN BOVET (74) Apoderado: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ	
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 2013/04/03 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 2011/08/31 No. de solicitud PCT/EP2011/004383		(87) Publicación internacional Fecha: 2012/03/08 N° publicación: WO 2012/028309 A2	
(54) Título: REDUCCIÓN DE METAL PESADO EN VEGETALES			

Resumen:

Se describe un vegetal, o célula vegetal, mutante, que no se encuentra en la naturaleza o transgénica, que comprende (a) un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en: (i) un polinucleótido que comprende, consiste o esencialmente consiste en una secuencia que tiene al menos 71 % de identidad de secuencia con SEQ ID NOs: 1, 2, 27, 28 o 29 o 51; o (ii) un polinucleótido que comprende, consiste o esencialmente consiste de una secuencia que tiene al menos 65 % de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NOs: 3 a 23 o 30 a 50; o (iii) un polinucleótido que codifica un polipéptido NtMRP que comprende, consiste o esencialmente consiste en una secuencia que tiene al menos 65% de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NOs. 24 a 26 o 52, y en cuyo caso el polipéptido tiene una actividad transportadora de metal pesado; o (b) un constructo polinucleótido de al menos 15 nucleótidos contiguos en una longitud que es al menos 65 % idéntica a una región de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 23 o 27 a 51; o (c) un ARN bicatenario que comprende al menos dos secuencias que son al menos parcialmente complementarias entre sí y en cuyo caso una hebra sentido comprende una primera secuencia y una hebra antisentido comprende una segunda secuencia y en cuyo caso al menos una de las secuencias comprende al menos 10 nucleótidos contiguos de ARN NtMRP; o (d) un vector de expresión que comprende el polinucleótido tal como se describe en (i), (ii) o (iii) o el constructo polinucleótido como se describe en (b).



No. 13-067186- -00000-0000

Fecha: 2013-04-03 16:46:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 133

PATENTE DE INVENCIÓN ☐

MODELO DE UT

☐
☐
☐
☐
☐

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 ☐

SEQUENCES (shading indicates the position of exons)

SEQ ID No. 1 (DNA sequence of NtMRP4 with 5' and 3' UTR)

```
atggatatgaggaacagtatgtcttcagaatcttggttagcatcactttcttggtctgc
5 ctccacatttcaatcgtcagaggattcagcagttgttaaattggtaagattcattttcct
ctctccatgtccacaaaggactcttctatcttccattgatgtgctgcttttgcttacttt
cattgtatttgcagtacaaaagttgtactcaaagttgaggtccaatgagcactctacttc
tagcattgataagcctctaattgcacacaaacaggacttctgttagaaccaatctttgggt
taagctgtctctgattttgtcagctatttttagccttatcttctatagttttatgcatttt
10 ggttattgtgggaaattcccagtcgccttggaagtcatagatggactgtattgggtggt
tcaggcgattacacatggttgtaatcactataactaatagttcatgagaaaagatttcacgc
tatttcccatccactgtccctgcgcgtgttttggttgcaaactttagtattatgagttt
gttctttgggtgtgggatcacaaggcttgtgtcacttaaggaaattgatcctaatttaag
aatggatgatataagttcattagtttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttctt
15 cattaaagggttcgaccggagttgctgtaattagtgattctgaatctcacttaagtgatga
aaccaatgggttatgaactcctggataaatccagtgtagtggttttgccttcagcttctct
aatatcgaaagccttttggatttggatgaaccttttactgcaaaaagggttacaagtcacc
tctcaagattgatgaagttccttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttca
acttttgcgaagaaattggcctaaacctgaagaaatatcaaagcatcctgtccgaacaac
20 attgctgcgttgcttttgggaaggaagttatttttactgccattcttgcagtaattaggggt
atgtgttatgtatgttagggccaacactcatacaaagatttgttgattacacagcaggaaa
gaggacatctccttatgaaggatactaccttataggaactctcctaataagccaaatttgt
ggaagttctaacctctcatcagttcaactttaactccaaaagcttggcatgcttattcg
agcgacacttctcacttcttctgtataagaaggggttaaggtgtcatgctcagctagaca
25 ggctcatgggtgttggaagagattgtaaatatatggcgcgtcgatgctcagcagctgtccga
tatgatgctacagctacattccatttggctcatgccattgcaagtttctgtggctttagg
catcctttatacttacctcggtgcttcaactgttgtaacgctagctggacttgcagcagtg
gatggatttgtggtgtttggaactaaaagaaacaacaggtttcaatttaacatcatgaa
gaatcgtagttctagaatgaaagcgacaaatgagatgcttaattatatgcgcgttataaaa
30 gttccaggcatgggaagaacattttaacaaaagaattgaatccttccgcgaatccgagta
tggatgggtgtccaagttcttgtactcaatcgctgggaatatcattgtcttgtggagcac
tctcttctagtggctacactcacttttgggaagtgaactcttgttgggaatcccgcttgg
tgcagggacagtggttactgcaacatctcttcttcaagatgttgcagggaaccgatcagggc
tttccctcaatccatgatctcacttccacaagcaatgatatcttcttgatagattggacaa
35 atatatgatgagtaaggagtttagtggataaagctgtggaagactagaaggttgtggggg
tacaattgctatgcagggtgaaagatggagcttttctgctgggatgatgaaaaacagtaaga
agaattgaaaaatgtaaacctttagattagaaaaggagagcttgcagcagtagtggggac
agttggggcggggaagtcttccctccttgcactctgtacttggtagatgcacaagttgtc
gggtcaggtatggctctcatccttctgttgttgttattgattatacaaaacttgcctgccaatt
40 accttttggcccttgttgcctacctcttcttctgtggtataaaaaattaatgtaggctaattg
tgtagagtgagggtattatatgcagaacaattgcaatcaagcaattacctgtgagatact
atattgttttcatattagtggaactgttacattctcattgggtgtatcgtttgatctccacc
aaagcagaggttttactggccgacagagtcactactgtgcttcaactccttttactcca
atccttagtagtcttcttcttctaatgaacttcaagcgtgtaatagaaacaccattatatt
45 attagctgattagttactttacaattccagagcatatttacatttctgcttgggtgtct
attactctggataacagtcctaaatgcaagcaaaatcaactgtgttttcagtcttgagct
gaccaattagttcatgatgtcctcagcttgtccaagctgggtgctcaccggaattatgtg
ggaccttcgtactttaatcaactagttcaccttcttcttataaaatattgaatgatttgatt
ggttaatagttccttaaatgtagttaattatttgcctaacttactttaccaacccttgtcc
50 aacaggtcacaaatttgtggttcaactgcctatgttgcacaaacatcgtaggattcagaatg
gcacgatacaagaaaatatcctgttgggtatgccaatgaacagagacagatacaaggaag
tgatccgggttctgtgcttggagaaggacttggaaataatggagtttgagaccagactg
aaatagggagaacgtggcatcaacctcagtggtggtcagaagcagcgaatccagcttgcaa
gagctgtttaccaggactgtgatatttatcttctagatgatgtattcagtgagcttgatg
55 ctcaactggctctgaaatcttcaagggttagaagtcacaaatgtcatgtgtcattgaaga
tttaatttagatagaaattacattgtttcattctgcaaatatggacctatcagagaaa
aatcatggattttgaatggctactttccccagtggaagacacatatcatttctgggagga
```

agatgtgaaagtggcaagctatcttactccaaaaagtataatctaaaagactttttattaag
 tttggaaggcctaataccatcatttgttatctgtgtgtctacttgtctttattaaaattctt
 cttagtccaatcactttcgtatgaagttgactagtcttagtcacctgaatactttaaatct
 5 ttccttgggtgtctctatattttcagccatctcaattccgaagctcatatttgttttctc
 tttgtaatgtccatctgaaagtttcatgcttttttgcaggaatgtgtgaggggaattctt
 aaagataaaaaccatttttgcttgtcacacaccaagttgacttcttgcataatgttgacctg
 atccttctaagtttcagagtggttttatcaacccctttggaaccaagtgcaagagtagtg
 tttcttgggtgttaaatgattcacatgtgtgttgggttctataaaacctgaactttatgt
 10 tttatcagagtggttttgccttcttgaaggctcatgagagatgggatgatcgtgcaatctgg
 caaatataatgagatattagaagctggaatggatttttaaagagctagtagctgcacatga
 gacctctttagaacttgttgacgtggaacaaccaaagagagcaatgcctcccttgaaga
 atcaaaatcttctcgaagattatctaaggaagaaaaacggagatgataaatctcaacagtc
 tacatctgataggggggattctaaaacttataaaggaagaagaaagagaaaactggaaaagt
 cagtcctcgtgtgtacaagctatatattactgaagcttttggatggtgggtgtagtgtc
 15 agttatctgttttctgttcttctgtggcaagttctctaattggcaagtgattattggctggc
 atatgaaacttcagcggatcgtgccatgtccttcaatccttctctgtttattgggatata
 cgggtgttattgcagttgtttcttctgtgtgatagtgatcaggatgtattttgtgacact
 tatggggtcgaagactgccccaaatatttttcggacagattctttacagcatactgcatgc
 tcctatgtcattttttgacacaacaccttccggaagaattctgagtcgggtaaatttctg
 20 aggacaagttttttcttcttgcattgaaattcaaaactttgctgcttagatgattaaataat
 gaaaaatatccatttgcattgttttaattgtgtatgacatggttagaattttgaatagaagttc
 attcactgatgttgagatgttttgttttttctgagcagctaatgatcagaccaaca
 ttgatgtcttctcccggttttttatgaatctcactttggccatgtttatcacactgctcg
 gcatcatcatcatcacatgccaatattcttggcctaccgtactacttttgattcctctgg
 25 gttggcttaatatctgggtaccgggtatgagcactgtttataacagccgtccttttttctt
 ttcttctgtcgaactcaaatttgaatccttctgttagaggcaattagtctgctctgagcat
 tttggctgacagttattatgtatattaaaaggcaacttttttattcgttctgtccagcta
 aaactttttacttaaaatgtggttaactgcataatttctgtgtctcctattttttgattat
 ttgcaactctgatcaatctagatttggggaaggcttgttgttagttgatgactagatact
 30 aagctcacatctacattgggtgcaagttagaattttcaagttgtcattcacttatattgtt
 tgaactaggagattagcattcttctgcaaggagccctgaatgcttgaaggtaaacaga
 aaagaaaaagtccagggcagatagacataatgtgttaagtaattcaattggagcacaga
 tatatgacatgtgttatttgggagctacgaaaaagataaggactattatgtagactacaa
 ttgaaataacaggttaattcatttctgggttacagggatattatcttgaacatctcgtga
 35 attgactcggcttgactcaattacaaaagcacctgttattcatcatttctctgaaagcat
 ctgaggtgttatgactatacgttgcctttaggaagcaggagatgttttgaacgagaatgt
 aaaccggtgaattccaatctgcgaatggatttccacaacaatggatccaatgaatgggt
 gggcttctgactggaattgatgggaagcttacttcttctgtgttctgcaatgttcatgat
 tgtcttacctagcagcatcatcaagccaggtataaacaccgtccaatgctcatttatggga
 40 attataaattctagtatattgataatccttctgtacttttagatctacctgctctactgaaa
 aatgaaatgagtatgaggaaatagaatatccgttgagcatttatgtcttctattaaaaa
 tttgcattctatcttcttgtttcaagtcaaaatcttgaacaactatatctagagaatttt
 ccttcttgtgaagtaatgcataatatacatcaagagaagtcagagttgctgaatgaaatag
 tagatcaaatttaagtgttgtgcctataaagaattgtatggtgagattgaatatagtgggt
 45 catattatttctcaatcttagtgattaaagtagtattccatacaaacagacaagcatttagt
 cgtgcattcattggcactacaaaattatcaaccaagagtaatatcttctcagcttctctc
 tgtatatgtgtgttctattctggagctgaagataactaattcttcttttatttctacag
 aaaatgttgggttctcactatcatatggcttctcttaatagtgctcattctgggtcca
 tcttctgtgagttgcttctgtggaaaaataaatgggttctgtcgaaagattaaaaacagttct
 50 cagaaataccatcagaagcagagtggaagaaagatggattttctcccaccttcaagttggc
 caagccgtgggaatgttgagcttgaaaacgtgcaggttaataattctaactaattctgtgg
 ttgctatttgcctagcatttgcacaaaaggaaaaactataaaaagttcatagtaagggaagag
 agggtagctgtatttaacaagcctacagattctttaaatttcaaatatgttacgttgaatct
 ctatatgtttgttctactgggtcaacaggttagatatcgtccgaacactcctctagtgtc
 55 taaaggagttactctcagcattagagggggagagaagataggtgtgttgggtcgtagagg
 ggggtgaaaaatcaacatttaattcaagtttcttcttctgttgggtgagcctgcagctggaag
 aataatcattgatgacgtagatatatccagacttgggcttcatgatcttagatctcgctt
 cgggatcattcccccaagagccagtcctttttgaaggaaactgtgagaagcaacattgacc
 cattggacaatattcagatgatgaaatttgaaggtaacttaacttgctgactgaaataa

tttacaaaaatctcaaaatatagtagacagagtttagccaaacatgtcttctgagtgtgaga
 tctttttggattataaattctgtaagagcaacatactatttggtagtgagaagaaaagca
 tatactccagtggtttgttatctcccagaatgtctctaacatgaaatcgtgtacattgca
 gagcctcgaaacgtgccaactcaaagatgtggtgtctttaaaacccgaaaaacttgattc
 5 accaggtaaaatttctctctacgtcatccttgtggttctttgcggaattatgcaacca
 actttttatgtgtttcaaatatatactgataactgaatactgtcattggtaaatcata
 gttgttgataaacggagataaactggagtgtcggacagaggcagcttcttctgctgggaaga
 gtgatgctaaaacgtagcagacttctattttaggatgaggcaactgcctctgttgattca
 10 cagacagatgcagtgttgcagaaaatcatccgcgaggactttgcggtgtactataatc
 agcattgcccacagaataccaacagtcattggactgtgatagagtcttctgttatagatgca
 ggtgctgatttctctccttttactttgtaccttattttgaatctggtaaatgattattta
 tctgtatgtgatggtttccaaccaatcatagtcagtacctttatgaagaaattgccta
 attagccaagtagtagtaaatgcatga

15 **SEQ ID No. 2 (DNA sequence of NtMRP4 without 5' and 3' UTR)**

atggatatgaggaaacagtatgtcttcagaatcttgttttagcatcactttcttgttctgc
 ctccacatttcaatcgtcagaggattcagcagttgttaaattggttaagattcattttcct
 ctctccatgtccacaaaggactcttctatctccattgatgtgctgcttttgcttacttt
 20 cattgtatttgcagtaaaaaagttgtactcaaagttgaggtccaatgagcactctacttc
 tagcattgataagcctctaattgcacacaacaggacttctgttagaaccaatctttggtt
 taagctgtctctgattttgtcagctatttttagccttatcttctatagttttatgcatttt
 ggttattgtgggaaattcccagtcgccttggaagtcatagatggactgtattggttgtt
 tcaggcgtatcacatgttgaatcactataactaatagttcatgagaaaagatttcacgc
 tatttcccatccactgtccttgcgcgtgttttgattgcaaactttgtagtatgagttt
 25 gttctttggttgtgggatcacaaggcttgtgtcacttaaggaaattgatcctaatttaag
 aatggatgatataagttcattagtttcatcttctatcttctgttgttctctcattgttgc
 cattaaggttcgacccgagttgctgtaattagtgttctgaatctcacttaagtgtatga
 aaccaatgggtatgaactcctggataaatccagtgtagtggttcttctcagcttctct
 aatcgaagccttttggatttggatgaaccctttactgcaaaaagggttacaagtcacc
 30 tctcaagattgtagaattccttcaacttccccactgcatagagcagagaaaatgtctca
 acttttcgaaagaaattggcctaaacctgaagaaatatcaaagcatcctgtccgaacaac
 attgctgcgttgttttgggaaggaagttatttttactgccattcttgcagtaattaggg
 atgtgttatgtatgtagggccaacactcatacaaagatttgttgattacacagcaggaaa
 gaggacatctccttatgaaggatactaccttataggaactctcctaataagccaaatttgt
 35 ggaagttctaacctctcatcagttcaactttaactccaaaagcttggcatgcttattcg
 agcgacacttctcacttctttgtataagaaggggttaaggttgcagctcagctagaca
 ggctcatggtgttggacagattgtaaatatataatggcgcgtcagatgctcagcagctgtccga
 tatgatgctacagctacattccatttgggtcatgccattgcaagtttctgtggcttagg
 catcctttatacttacctcgggtgcttcaactgttgaacgctagctggacttgcagcagt
 40 gatggtatttgtggtgtttggaactaaaagaaacaacaggttcaatttaacatcatgaa
 gaatcgtgattctagaatgaaagcgacaaatgagatgcttaattatatgctgcttataaa
 gttccaggcatgggaagaacattttaacaaaagaattgaatccttccgcgaatccgagta
 tggatgggtgtccaagttcttgtactcaatcgttgggaatatcattgtcttgtggagcac
 tctcttctagtggctacactcacttttgggaagtgaactcttgttgggaatcccgcttgg
 45 tgcagggacagtggttactgcaacatctctcttcaagatgttgcaggaaccgatcagggc
 tttccctcaatccatgatctcactttcacaaagcaatgatctcttgatagattggacaa
 atatatgatgagtaaggagttagtggataaagctgtggaaagactagaaggttgtggggg
 tacaattgctatgcaggtgaaagatggagcttttctgtgggatgatgaaaacagtaaaga
 agaattgaaaaatgtaaaccttgagattagaaaaggagagcttgcagcagtagtggggac
 50 agttggggcggggaagtcttccctccttgcattctgtacttgggtgagatgcacaagttgtc
 gggtcaggtatggctctcactcttctgtttgtttgattatacaaaacttctgtgccaat
 accttttgcccttgttggctacctcttctgtgtgtataaaaaatgaatgtaggctaagt
 tgtagagtggaggtattatatgcagaacaattgcaatcaagcaattacctgtgagatact
 attttgttttcatattagtggactgggtacattctcattgggtgtatcgtttgatctccacc
 55 aaagcagaggttttactggccgacagagtcacaaactactgtgcttcaactcttcttactcca
 atccttagtagtctttgcttctaatagaacttcaagcgtgtaatagaacaccattatatt
 attagctgatttagttactttacaattccagagcatatttacattttctgcttgggtgtct

attactctggataacagtcctaaatgcaagcaaaatcaactgtgttttcagtcttgagct
 gaccaattagttcatgatgtcctcagcttgtccaagctgggtgcctcaccggaattatgtg
 ggaccttcgtacttaatacaactagttcaccttcttcttaaaaatattgaatgatttgatt
 5 ggtaataagttccttaaatgtagtaattatgtgctaacttactttaccaaccccttgctc
 aacaggtcacaaatttggtggttcaactgcctatgttgcacaaacatcgtggattcagaatg
 gcacgatacaagaaaatatcctgttttggtatgccaatgaacagagacagatacaaggaag
 tgatccgggttttgctgcttggaaggaacttggaataatggagtttgagaccagactg
 aaataggagaacgtggcatcaacctcagtggtggtcagaagcagcgaatccagcttgcaa
 gagctgtttaccaggactgtgatatttatctctagatgatgtattcagtgagttgatg
 10 ctacactggctctgaaatcttcaaggttagaagtcacaaatgtcatgtgtcattgaaga
 ttttaatttaagatagaaattacattgtttcattctgcaaattatggacctatcagagaaa
 aatcatggattttgaatggctactttccccagtggaagacacatatcatttctgggagga
 agatgtgaaagtggcaagctatttactccaaaagtataatctaaaagacttttattaaag
 tttggaaggcttaataccatcatttgttatctgtgtctacttgtctttattaaaattctt
 15 cttagtccaactcactttcgatgaagttgactagtcttagtcacctgaatactttaaatct
 ttgacctgggtgtctctatattttcagccatctcaattccgaagctcatatttgttttctc
 tttgtaatgtccatctgaaagtttcatgcttttttgcaggaatgtgtgaggggaattctt
 aaagataaaaccattttgcttgtcacacaccaagttgacttcttgcataatgttgacctg
 atccttgtaaagtttcagagtggtttatcaacccctttggaaccaagtgcaagagtagtg
 20 tttcttggttggttaaatgattcacatgtgtgttggtttctataaaacctgaactttatgt
 tttatcagagtggttttgctttcttgaaggtcatgagagatgggatgatcgtgcaatctgg
 caaatataatgagatattagaagctggaatggatttttaagagctagtagctgcacatga
 gacctctttagaacttggtgacgtggaacaaccaaagagagcaatgcctcccttgaaga
 atcaaaatcttctcgaagattatctaaggaagaaaacggagatgataaatctcaacagtc
 25 tacatctgataggggggattctaaacttataaaggaagaagaaagagaaactggaaaagt
 cagtcctcgtgtgtacaagctatatattactgaagcttttggtggtgggtgtagtgct
 agttatcttgttttctgttcttggcgaagttctctaattggcaagtgattattggctggc
 atatgaaacttcagcggatcgtgccatgtccttcaatccttctctgtttattgggatata
 cgggtgttattgcagttgtttcttctgtgtgatagtgatcaggatgtattttgtgacact
 30 tatggggtcaagactgcccaaatatttttcggacagattctttacagcatactgcactgc
 tcctatgtcattttttgacacacacaccttccggaagaattctgagtcgggtaaatttctg
 aggacaagttttttcttttgcattgaaattcaaactttgctgcttagatgattaaataat
 gaaaaatattccattgcatgttttaattgtgtatgacatgttagaattttgaatagaagttc
 attcactgatgttgagatgttttgttttttctgcaggcatctaattgatcagaccaaca
 35 ttgatgtcttctcccggttttttatgaatctcactttggccatgtttatcacactgctcg
 gcatcatcatcatcacatgccaatattcttggcctaccgtactacttttgattcctctgg
 gttggcttaatacttggtaccgggtatgagcactgtttataacagccgtccttttttctt
 ttcttgtctgaactcaaatttgaatcctttgttttagaggcaattagtctgctctgagcat
 tttggctgacagttattatgtatattaaaaggcaacttttttattcgttctgtccagcta
 40 aaacttttacttaaaatgtggttaactgcataatttctgtgtctcctattttttgattat
 ttgcaactctgatcaatctagatttggggaaggcttgttggttagttgatgactagatact
 aagctcacatctacattgggtgcaagtagaattttcaagttgtcattcacttatattgtt
 tgaactaggagattagcattcttctgcaaggagccctgaatgcttgaaaagttaaacaga
 aaagaaaaagttcagggcagatagacataatgtgttaagtaattcaattggagcacaga
 45 tatatgacatgtgttattttgggagctacgaaaaagataaggactattatgtagactaca
 ttgaaataacaggtaattcatttctggtttacagggatattatcttgcaacatctcgtga
 attgactcggctgactcaattacaaaagcacctgttattcatcatttctctgaaagcat
 ctgaggtgttatgactatacgttgcttttaggaagcaggagatgttttgtaacgagaatgt
 aaaccgagtgaaattccaatctgcgaatggatttccacaacaatggatccaatgaatggtt
 50 gggctttcgactggaattgatgggaagcttacttcttctgtgttctgcaatgttcatgat
 tgtcttacctagcagcatcatcaagccagggtataacaccgtccaatgctcatttatggga
 attataaattctagattttgataatccttctgtacttttagatctacctgctcactgaaa
 aatgaaatgagtatgaggaaatagaatatccgttgagcatttatgtctttctattaaaaa
 tttgcattctatcttctgtttcaagtcaaaatcttgacaactatatctagagaattttt
 55 ccttcttgtgaagtaatgcatatatacatcaagagaagtcagagttgctgaatgaaatag
 tagatcaaatttaagtgttgcctataaagaattgtatggtgagattgaatatagtggt
 catattattttctcaatcttagtgattaaagtattccatacaaacagacaagcatttagt
 cgtgcattcattggcactacaaaattatcaaccaagagtaatatcttttcagctttctc
 tgtatatgtgtgttctattctggagctgaagataactaatattcttttttatttctacag

aaaatggttggtttgtcactatcatatggccttgtctcttaatagtgtcctattctggtcca
 tctttgtgagttgctttgtggaaaaataaaatgggttctgtcgaaagattaaaacagttct
 cagaaataccatcagaagcagagtgagagaagatggattttctccaccttcaagttggc
 caagccgtgggaatgttgagcttgaaaacgtgcaggttaataattctaactaattctgtgg
 5 ttgctattttgctagcatttgcacaaaaggaaaactataaaaagttcatagtaaggaagag
 agggtagctgtattaacaagcctacagattctttaatttcaaatatgttacgttgaatct
 ctatattgtttgttctactgggtcaacaggttagatatcgctccgaacactcctctagtgt
 taaaggagttactctcagcatttagagggggagagaagataggtgttgttggctcgtaagg
 ggggtggaaaatcaacattaattcaagttttctttcggttgggtggagcctgcagctggaag
 10 aataatcattgatgacgtagatatatccagacttgggcttcatgatcttagatctcgctt
 cgggatcattcccccaagagccagtcctttttgaaggaactgtgagaagcaacattgaccc
 cattggacaatattcagatgatgaaatttgggaaggtaacttaacttgcctgactgaaataa
 tttacaaaaatctcaaatatagtagacagagttagccaaacatgtctctgagtgctgaga
 tctttttggattataaattctgtgaagcaacataactatttggtagtgagaagaaaagca
 15 tatactccagtggtttgttatctcccagaatgtctctaacatgaaatcggtgtacattgca
 gagcctcgaaacgtgcgaactcaaagatgtgggtgtctttaaaacccgaaaaacttgattc
 accaggtaaaatttctcctctacgtcatccttgtgggttctttgcggaattatgcaacca
 actttttatgtgtttcaaatatatactgataactgaatactgtcatttggtaaatcata
 gttgttgataacggagataactggagtgctcgacagagggcagcttctttgcttgggaaga
 20 gtgatgctaaaacgttagcagacttctatttatggatgaggcaactgcctctgttgattca
 cagacagatgcagtgattcagaaaaatcatccgcgaggactttgcggtgtactataatc
 agcattgccacagaataccaacagtcattggactgtgatagagttcttgttatagatgca
 ggtgctgatttctctccttttactttgtaccttattttgaatctggtaaatgattattta
 tctgtatgtgatgggtttccaaccaatcatagtcagtagcctttatgaagaaattgccta
 25 gttagccaagtagtagtaaatgcagagtcatttagcctatttgttttggtttgtgag
 tttcatacttcaaaactggaagcttatgtctatactatctgatcccttgtttgtatagattg
 ctttcttttcttttctcggatttatcttatataaagcggacagagtaaaagaatgta
 aacatgcgtaatttgacctattatagcagattatttgtcttattttccaggtcgctgatt
 ccacttattagtagttagtacagttatttatcttttaagtgaataaatagtgtaagttt
 30 cttttggcactgtcgggtgtaagaagttaaactcctttctttaacccggcatttcttat
 tcatgcaggaatagcaaaagagtttgacaaaccatctcggttgccttgaaaggccttca
 ttttggggctttgggttcaagaatatgccaaaccgatcctctgagctctaac

SEQ ID NO: 3 (Intron 1)

35 gtatggctctcatccttctgtttgtttgattaatacaaaactttgctgccaaattaccttttgccccttgttgctacct
 cttttctgtgggtataaaaaaattaatgtaggctaattgtgtagagtgagggtatttatatgcagaacaattgcaatcaag
 caattacctgtgagataactattttgttttcatattatagtggaactgtacattctcattgggtgatcgtttgatctcca
 ccaaagcagaggttttactggccgacagagtcaaactactgtgcttcaactccttttactccaatccttagtagtctt
 40 tgcttctaatagaacttcaagcgtgtaatagaaaacaccattatattatagctgattagttactttacaattccagag
 catatttacattttctgcttgggtgtctattactctggataacagtcctaaatgcaagcaaaatcaactgtgttttc
 agtcttgagctgaccaattagttcatgatgtcctcagcttgtccaagctgggtgcctcaccggaattatgtgggacct
 tcgtacttaatacaactagttcaccttcttcttaaaaatattgaatgatttgattgggttaatatagttccttaaatgtag
 taattatttgcctaacttactttaccaaccccttgcctcaacag

45 SEQ ID NO: 4 (Intron 2)

gttagaagtccacaatgtcatgtgtcattgaagatttaatttaagatagaaattacattgtttcattctgcaaatta
 tggacctatcagagaaaaatcatggattttgaatggctactttccccagtgagacacatatcatttctctgggagga
 agatgtgaaagtggcaagctatttactccaaaagctataatctaaaagacttttattaagtttggaaggcttaatcc
 50 atcatttggtatctgttgtctacttgtctttattaaaattcttcttagtccaatcactttcgatgaagttgactagt
 cttagtccactgaatactttaaatctttgccttgggtgtctctatattttcagccatctcaattccgaagctcatatt
 tgttttctcttgtaatgtccatctgaaagtttcatgcttttttgcag

SEQ ID NO: 5 (Intron 3)

55 gtaagtttcagagtggttttatcaacccctttggaaccaagtgtaagagtagtggtttcttgggtgttaaatgattca
 catgtgtgttgggtttctataaaaactgaaactttatgttttatcagagtggtttgctttcttgaag

SEQ ID NO: 6 (Intron 4)

gtaaatttctgaggacaagtttttcccttttgcattgtaaattcaaactttgctgcttagatgattaaataatgaaaa
tattccattgcatgttttaattgtgtatgacatgttagaattttgaatagaagttcattcactgatgttgagatgtttt
gttttttttctgcag

SEQ ID NO: 7 (Intron 5)

gtatgagcactgtttataacagccgtccttttttcttttctgtctgaactcaaatttgaatcctttgttttagaggc
aattagctctgctctgagcattttggctgacagttattatgtatattaaaaggcaacttttttattcgttctgtccag
ctaaaactttttactttaaattgtggttaactgcataatttctgtgtctcctattttttgattatttgcactctgac
aatctagattttggggaaggcttgtgttagttgatgactagataactaagctcacatctacattggttgcaagtagaa
ttttcaagttgtcattcacttataattgtttgaactaggagattagcattcttctgcaaggagccctgaatgcttgaa
aagttaaacagaaaaagaaaagttcagggcagatagacataatgtgttaaagtaattcaattggagcacagatatat
gacatgtgttattttgggagctacgaaaaagataaggactattatgtagactacaattgaaataacaggtaattcatt
tctggtttacag

SEQ ID NO: 8 (Intron 6)

gtataacaccgtccaatgctcatttatgggaattataaattctagatatttgataatccttctgtacttttagatctac
ctgctctactgaaaaatgaaatgagtatgaggaaatagaatatccgttgagcatttatgtctttctattaaaaattt
gcattctatcttcttgtttcaagtcaaaatcttgaacaactatatctagagaattttccttcttgtgaagtaattgca
tatatacatcaagagaagtcagagttgctgaatgaaatagtagatcaaatttaagtgttgtgcctataaagaattgt
atgggtgagattgaatatagtggcctattattttctcaatcttagtgattaaagtattccatacaaacagacaagca
tttagtcgtgcattcattggcactacaaaattatcaaccaagagtaatatcttttcagctttcctctgtatatgtgt
gttctattctggagctgaagataactaatattcttttttatttctacag

SEQ ID NO: 9 (Intron 7)

gtaataattctaactaattctgtggttgcattttgctagcatttgcacaaaaggaaaactataaaaagttcatagta
aggaagagagggtagctgtattaacaagcctacagattctttaatttcaaataatgttacgttgaatctctatatattgt
ttgttctactggccaacag

SEQ ID NO: 10 (Intron 8)

gtaatctaacttgcctgactgaaataatttacaaaaatctcaaaatatagtagacagagttagccaaacatgtcttctga
gtgctgagatctttttggattataaattctgtgaagagcaacatactatttggttagtgagaagaaaagcatatactcc
agtgttttgttatctcccagaatgtctctaacatgaaatcgtgtacattgca

SEQ ID NO: 11 (Intron 9)

agtcattagcctattttgttttggattttgtgagtttcatacttcaaactggaagcttatgctatactatctgatccc
ttgtttgtatagattgcttttcttttcttttctcggatttatcttatatataagcggacagagtaaaa

SEQ ID NO: 12 (Intron 10)

agtcattagcctattttgttttggattttgtgagtttcatacttcaaactggaagcttatgctatactatctgatccc
ttgtttgtatagattgcttttcttttcttttctcggatttatcttatatataagcggacagagtaaaa

SEQ ID NO: 13 (Exon 1)

tggatatgaggaacagtatgtcttcagaatcttgttttagcatcactttcttgttctgcctccacatttcaatcgctca
gaggattcagcagttgttaaatggttaagattcattttcctctctccatgtccacaaaggactcttctatcttccat
tgatgtgctgcttttgccttactttcattgtatttgcagtacaaaagttgtactcaaagttgaggtccaatgagcact
ctacttctagcattgataagcctctaattgcacacacagagacttctgttagaaccaatcttgggttaagctgtct

ctgattttgtcagctattttagccttatcttctatagttttatgcattttggttattgtgggaaattcccagtcgcc
 ttggaaagtcatagatggactgtattggttggttcaggcgattacacatggtgtaatactataactagttcatg
 agaaaagatttcacgctatttcccatccactgtccctgcgctgttttgattgcaaactttgtagttagagttg
 5 tcttttggttggtggatcacaaggcttggtgctacttaaggaaattgatcctaatttaagaatggatgatataagttc
 attagtttcatttccctatttctggttcttctcattggttgccattaaagggttcgaccggagttgctgtaattagt
 attctgaatctcacttaagtgatgaaaccaatgggttatgaactcctggataaatccagtgtgagtggtttgcttca
 gcttctctaataatcgaaagccttttggtttggatgaacccttactgcaaaaagggttacaagtcacctctcaagat
 tgatgaagttccttcactttcccatgcatagagcagagaaaaatgtctcaacttttcgaaagaaattggcctaaac
 10 ctgaagaaatatcaaagcatcctgtccgaacaacattgctgctgtgttttggaaggaagttattttactgccatt
 cttgacagtaattaggggtatgtgttatgtatgttagggccaacactcatacaaagatttggttgattacacagcaggaaa
 gaggacatctccttatgaaggatactaccttataggaactctcctaataagccaaatttggtggaagtctcaacctctc
 atcagttcaactttaactcccaaaagcttgccatgcttatttcgagcgacacttctcacttctttgtataagaagggg
 ttaaggttgctatgctcagctagacaggctcatggtgttgacagattgtaaattatatggcgcgtagctcagca
 gctgtccgatatgatgctacagctacattccatttggtcatgcccattgcaagtttctgtggcttttaggcacacctt
 15 atacttacctcggtgcttcaactgttgtaacgctagctggacttgacagcagtgatgggtatttggtggttttggaact
 aaaagaaacaacaggtttcaatttaacatcatgaagaatcgtgattctagaatgaaagcgacaaatgagatgcttaa
 ttatatgctggttataaagttccaggcatgggaagaacattttaacaaaagaattgaatccttccgcgaatccgagt
 atggatggttgctcaagttcttgtactcaatcgctgggaatatcattgtcttggtggagcactcctctctagtggct
 acactcacttttggaagtgaactcttggtgggaatcccgcttggtgcagggacagtggttactgcaacatctctctt
 20 caagatggtgcaggaaccgatcagggtcttccctcaatccatgatctcactttcacaagcaatgatatctcttgata
 gattggacaaatatatgatgagtaaggagttagtggataaagctgtggaaagactagaaggttggtgggggtacaatt
 gctatgcaggtgaaagatggagcttttctgctgggatgatgaaaacagtaaaagaagaattgaaaaatgtaaaccttga
 gattagaaaaggagagcttgacagcagtagtggggacagttggggcggggaagtcttccctccttgcatctgtacttg
 gtgagatgcacaagttgtcgggtcag
 25

SEQ ID NO: 14 (Exon 2)

gtcacaatttggtggttcaactgcctatggtgcacaacatcgtggattcagaatggcacgatacaagaaaatatcctg
 tttggtatgccaatgaacagagacagatacaaggaagtgatccgggtttgctgcttggaaggaagacttggaataat
 30 ggagtttgagagaccagactgaaataggagaacgtggcatcaacctcagtggtggtcagaagcagcgaatccagcttg
 caagagctgtttaccaggactgtgatatttatcttctagatgatgtattcagtgagttgatgctcacactggctct
 gaaatcttcaag

SEQ ID NO: 15 (Exon 3)

gaatgtgtgaggggaattcttaagataaaaccattttgcttgccacacaccaagttgacttcttgcataatgttga
 35 cctgatcctt

SEQ ID NO: 16 (Exon 4)

gtcacgagatgggatgatcgtgcaatctggcaaatataatgagatattagaagctggaatggattttaagagct
 agtagctgcacatgagacctctttagaacttggtgacgtggaacaaccaagagagcaatgcctccctgaagaat
 40 caaaatcttctgaagattatctaaggaagaaaacggagatgataaatctcaacagctctacatctgataggggggat
 tctaaacttataaaggaagaagaaagagaaactggaaaagtcagtcctcggtgtgacaagctatataactgaagc
 ttttggtggtgggtgtagtgctagttatcttgttttcttctgtggcaagttctctaattggcaagtgattatt
 ggctggcatatgaaacttcagcggatcgtgccatgtccttcaatccttctctgtttattgggatatacgggtgttatt
 gcagttgtttcttctgtgctgatagtcaggatgtattttgtgacacttatggggctcaagactgcccataatt
 45 tttcgacagattctttacagcactatgcacgtcctatgtcattttttgacacaacaccttccggaagaattctga
 gtcgg

SEQ ID NO: 17 (Exon 5)

gcactaatgatcagaccaacattgatgtcttccctcccggttttttatgaatctcactttggccatgtttatcacact
 50 gctcggcatcatcatcatcacatgccaatattcttggcctaccgtactacttttgattcctctgggttggtttaata
 tctggtaccgg

SEQ ID NO: 18 (Exon 6)

5 ggatattatcttgcaacatctcgtgaattgactcggcttgactcaattacaaaagcacctgttattcatcatttctc
 tgaagcatctcaggtgttatgactatacgttgcttttaggaagcaggagatgttttgtaacgagaatgtaaaccgag
 tgaattccaatctgcgaatggatttccacaacaatggatccaatgaatgggtgggctttcgactggaattgatggga
 agcttacttctttgtgtttctgcaatgttcatgattgtcttacctagcagcatcatcaagccag

SEQ ID NO: 19 (Exon 7)

10 aaaatgttggtttgtcactatcatatggcttgtctcttaatagtgtcctattctgggtccatctttgtgagttgcttt
 gtggaaaataaaatgggtttctgtcgaagattaaaacagttctcagaaataccatcagaagcagagtgaggaaaagat
 ggattttctcccaccttcaagttggccaagccgtgggaatgttgagcttgaaaacgtgcag

SEQ ID NO: 20 (Exon 8)

15 gttagatatcgctccgaacactcctctagtgtctaaaggagttactctcagcattagagggggagagaagataggtgt
 tgttggtcgtacagggggtggaaaatacaacattaattcaagttttctttcggttggtggagcctgcagctggaagaa
 taatcattgatgacgtagatatatccagacttgggcttcatgatcttagatctcgcttcgggatcattccccaagag
 ccagtcctttttgaaggaactgtgagaagcaacattgacccattggacaatatcagatgatgaaatttggaag

SEQ ID NO: 21 (Exon 9)

agcctcgaacgctgcgaactcaagatgtgggtgtctttaaaacccgaaaaacttgattcaccag

20 SEQ ID NO: 21 (Exon 10)

ttgttgataacggagataactggagtgtcggacagaggcagcttctttgcttggggaagagtgatgctaaaacgtagc
 agacttctattttatggatgaggcaactgcctctgttgattcacagacagatgcagtgattcagaaaatcatccgcga
 ggactttgcggcctgtactataatcagcattgcccacagaataccaacagtcattggactgtgatagagtctttgtta
 tagatgcag

25 SEQ ID NO: 22 (Exon 11)

gaatagcaaaagagtttgacaaaccatctcgtttgcttgaaaggccttcactttttggggctttgggttcaagaatat
 gccaacccgatcctctgagctctaa

30 SEQ ID NO: 23 (RNAi sequence)

aagagccagtcctttttgaaggaactgtgagaagcaacattgaccc
 cattggacaatatcagatgatgaaatttgaaggtaatctaacttgcctgactgaaataa
 tttacaaaaatctcaaaatatagtacagagtttagccaaacatgtcttctgagtgtgaga
 tctttttggattataaattctgtgaagagcaacatactatttgttagtgagaagaaaagca
 35 tatactccagtggtttgttatctcccagaatgtctcctaacatgaaatcggtgtacattgca
 gagcctcgaacgctgccaactcaaagatgtgggtgtctttaaaacccgaaaaacttgattc
 accaggtaaaattttcctcctctacgtcatccttgtggttctttgcggaattatgcaacca
 actttttatgtgtttcaaatatatatactgataactgaatactgtcattggtaaatcata
 gttgttgataacggagataactggagtgtcggacagaggcagcttctttgcttggggaaga
 40 gtgatgctaaaacgtagcagacttctatttatggatgaggcaactgcctctgttgattca
 cagacagatgcagtgattcagaaaatcatccgcgaggactttgcggcctgtactataatc
 agcattgcccacagaataccaacagtcattggactgtgatagagtcttctgttatagatgca
 ggtgctgatttctctccttttactttgtaccttattttgaatctggtaaatgattattta
 tctgtatgtgatggtttccaaccaatcatagtcagtacctttatgaagaaattgcctaatt
 45 gttagccaagtagtagtaaatgcatgaagtcattagcctatttgttttggtttgtgag
 tttcatacttcaaaactggaagcttatgtctatactatctgatcccttgtttgtatagattg
 ctttcttttcccttttctcggatttatcttatataataagcggacagagtaaaagaatgta
 aactgcgtgaatttgacctattatagcagattatttgccttattttccaggtcgctgatt
 ccacttattaggagtagttacacgtatttatcttttaagtgaataatagtgtaaaagttt
 50 cttttggcactgtcgggtgtaagaagttaaactcctttctttaaccccggcatttcttat
 tcatgcaggaatagcaaaagagtttgacaaaccatctcgtttgcttgaaaggccttcact

ttttggggctttggttcaagaatatgcccaaccgat

SEQ ID NO: 24 (protein sequence of NtMRP4; 5'-3' frame 1; - denotes putative stop codon)

MDMRNSMSSESCIASLSCSASTFQSSSEDSAVVKWLRIFLSPCQRTLLSSIDVLLLLTF
5 IVFAVQKLYSKLRSNEHSTSSIDKPLIAHNRTSSPWKVIDGLYWLFQAI THVVITILIVH
EKRFHAISHPLSLRVFWIANFVVM SLFFGCGITRLVSLKEIDPNLRMDDISSLVSPISV
VLFIVAIGSTGVAVIDSESHLSDETNGYELLDKSSVSGFASASLISKAFWIWMNPLLQ
KGYKSPLKIDEVPSLSPLHRAEKMSQLFERNWPKPEEISKHPVRTLLRCFWKEVIFTAI
LAVIRVCVMYVGPTLIQRFVDYTAGKRTSPYEGYYLIGTLLIAKFVEVLTSHQFNFSQK
10 LGMLIRATLLTSLYKKGLRLSCSARQAHGVGQIVNYMAVDAQQLSDMMLQLHSIWLMPLQ
VSVALGILYTYLGASTVVTLAGLAAMVVFVFGTKRNNRFQFNIMKNRDSRMKATNEMLN
YMRVIKQAWEEHFNKRIESFRESEYGWLSKFLYSIAGNIIVLWSTPLL VATLTFTGSAIL
LGIPLGAGTVFTATSLFKMLQEP IRAFPQSMISLSQAMISLDRLDKYMMSKELVDKAVER
LEGCGGTIAMQVKDGAFCWDDENSKEELKNVNF EIRKGELAAVGTGAGKSSLLASVLG
15 EMHKLSGQVTICGSTAYVAQTSWIQNGTIQENILFGMPMNRDRYKEVIRVCCLEKDLEIM
EFGDQTEIGERGINLSGGQKQRIQLARAVYQDCDIYLLDDVFSAVDAHTGSEIFKECVRG
ILKDKTILLVTHQVDFLHNVDLILVMRDGMIVQSGKYNEILEAGMDFKELVAAHETSLEL
VDVETTKESNASLEESKSSRRLSKEENGDDKSQQSTSDRGDSKLKEERETGKVS PRVY
KLYITEAFGWVGVLVILFSLWQSSLMASDYWLAYETSADRAMSFNPSLFIGIYGVIAV
20 VSSLLIVIRMYFVTLMGLKTAQIFFGQILYSILHAPMSFFDTPSGRILSRASNDQTNID
VFLPFFMNLTLAMFITLLGIIITCQYSWPTVLLIPLGWLNIWYRGYYLATSRELTRLD
SITKAPVIHHFSESISGVMTIRCFRKQEMFCNENVRVNSNLRMDPHNNGSNEWLGFRLE
LMGSLLLCVSAMFMIVLPSSIIK PENVGLSLSYGLSLNSVLFWSIFVSCFVENKMSVER
LKQFSEIPSEAEWRKMDFLPSSWPSRGNVELENVQVRYRPNTPLVLKGVTL SIRGGEKI
25 GVVGRGTTGGKSTLIQVFFRLVEPAAGRIIIDDVDISRLGLHDLRSRFGIIPQEPVLFEGT
VRSNIDPIGQYSDEIWKEPRTLPTQRCGVFKTRKT-FTSC--RR-LECRTEAASLLGKS
DAKT-QTSIYG-GNCLC-FTDRCSDSENHPRGLCGLYYNQHCPQNTNSHGL--SSCYRCR
C-FLSFYFVPYFESGK-LFICM-WFPTNHSQYLYEEIA-C-PSSSKCM

30 SEQ ID NO: 25 (protein sequence of NtMRP4; 5'-3' frame 2; - denotes putative stop codon)

WI-GTVCLQNLV-HHFLVLPPHFNRQRIQQLLNG-DSFSSLHVHKGFLYPLMCCFCLLS
LYLQYKSTQS-GPMSTLLLALISL-LHTTGLLRLGKS-MDCIGCFRRLHML-SLY--FM
RKDFTLFPIHCPCACFGLQTL-L-VCSLVVGSQGLCHLRKLILI-EWMI-VH-FHFLFLL
FSSLLPLKVRPELL-LVILNLT-VMKPMVMNSWINPV-VALLQLL-YRKPFQFG-TLYCK
35 KVTSHLSRLMKFLHFPHCIEQRKCLNFSKEIGLNLKKYQSILSEQHCCVAFGRKLFLLPF
LQ-LGYVLCM-GQHSYKDLLITQQERGHLLMKD TTL-ELS--PNLWKF-PLISSTLTPKS
LACLFERHFSLLCIRRG-GCHAQLDRMLVLDRL-IIWPSMLSSCPI-CYSYIPFGSCHCK
FLWL-ASFILTSVLQLL-R-LDLQ-QWYLWCLELKETTGFNLT-SRIVILE-KRQMRCL I
ICAL-SSRHGKNILTKELNPSANPSMDGCPSSCTQSLGISLSCGALLF-WLHSLLEVQSC
40 WESRLVQGCQSLQHLSSRCCNRNSGLSLNP-SHFHKQ-YLLIDWTNI--VRS-WIKLWKD
-KVVGVQLLCR-KMELFAGMMKTVKKN-KM-TLRLEKESLQQ-WGQLGRGSLPSLHLYLV
RCTSCRVRSQFVVQLPMLHKHRCFRMARYKKISCLVCQ-TETDTRK-SGFAAWRRTWK-W
SLETRLK-ENVA STSVVVRSSSESLQELFTRTVIFIF-MMYSVQLMLTLALKSSRN V-GE
FLKIKPFCLSHTKLTSCIMLT-SLSCEMG-SCNLANIMRY-KLEWILKS--LHMRPL-NL
45 LTWKQPKRAMPPKLNQNLLEDYLRKKTEMINLNSLHLIGGILNL-RKKKEKLEKSVLVCT
SYILLKLLDGGV-C-LSCFRSCGKVL-WQVIIGWHMKLQRIVPCPSILLCLLGYTVLLQL
FLRC---SGCIL-HLWGSRLPKYFSDRFFTAYCMLLCHFLTQHLPEEF-VGHLMIRPTLM
SSSRFL-ISLWPCLSHCSASSSSHANILGLPYF-FLWVGLISGTGDIILQHLVN-LGLT
QLQKHLLFIISLKASQVL-LYVALGSRRCFVTRM-TE-IPICEWISTTMDPMNGWAFDWN
50 -WEAYFFVFLQCS-LSYLAASSSQKMLVCHYHMACLLIVSYSGPSL-VALWKIKWFLSKD
-NSSQKYHQKQSGERWIFSHLQVGQAVGMLS LKTCRLDIVRTLL-CLKELLSALEGERR-
VLLVVQGVENQH-FKFSFVWWSLQLEE-SLMT-IYD LGFMILDASGSFPKSQSFLKEL
-EATLTPDNIQMMKFGRSLERCQLKD VVSLKPEKLDSPVVDNGDNWSVGQRQLCLGRV
MLKRSRLLFMDEATASVDSQTD AVIQKI IREDFAACTIISIAHRIPTVMDCDRVLVIDAG
55 ADFSPFTLYLILNLVNDYLSVCDGFQPIIVSTFMKKLPNVSQVVVNA-

SEQ ID NO: 26 (protein sequence of NtMRP4; 5'-3' frame 3; - denotes putative stop codon)

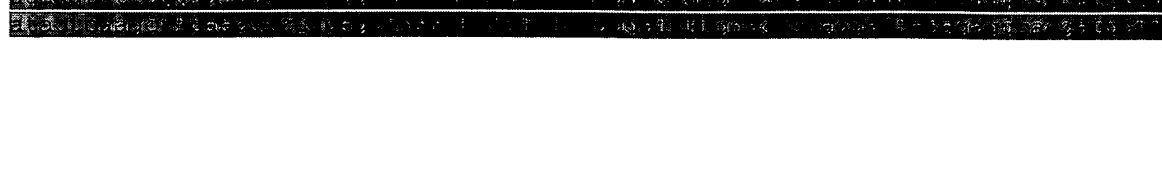
GYEEQYVFRILFSITFLFCLHISIVRGFSSC-MVKIHFPLSMSTKDSSIFH-CAAFAYFH
 CICSTKVVLKVEVQ-ALYF-H--ASNCTQQDFFALESHRWTVLVVSVDYTCNHYTNSS-
 EKISRYFPSTVTPARVLDCKLCSYEFVLWLWDHKACVT-GN-S-FKNG-YKFISFISYFCC
 5 SLHCCH-RFDRSCCN--F-ISLK--NQWL-TPG-IQCEWLCFSFSNIESLLDLDEPFTAK
 RLQVTSQD--SSFTFPTA-SRENVSTFRKKLA-T-RNIKASCPNNIAALLLEGSYFYCHS
 CSN-GMCYVCRANTHTKIC-LHSRKEDISL-RILPYRNSPNSQICGSSNLSSVQL-LPKA
 WHAYSSDTSHFV-EGVKVVMLS-TGSWCWTDCKLYGRRCSAAVRYDATATFHLAHAIAS
 FCGFRHPLYLPRCFNCCNASWTCSSDGICGVWN-KKQVSI-HHEES-F-NESDK-DA-L
 10 YARYKVPGMGRTF-QKN-ILPRIRVWMVVQVLVLRWEYHCLVEHSSSSGYTHFWKCNLV
 GNPACWCRSVHCNISLQDVAGTDQGFPSIHDLTFTSNDIS--IGQIYDE-GVSG-SCGKT
 RRLWGYNCYAGERWSFLLG--KQ-RRIEKCKL-D-KRRACSSSGDSWGGEVFPFCICTW-
 DAQVVGSGHNLWFNCLCCTNIVDSEWHDTRKYPVWYANEQRQIQGSDPGLLLGEGLGNN
 VWRPD-NRRTWHQPQWWSEANPACKSCLPGL-YLSSR-CIQCS-CSHWL-NLQGMCEGN
 15 S-R-NHFACHTPS-LLA-C-PDPCHARWDDRAIWQI--DIRSWNGF-RASSCT-DLFRTC
 -RGNNQREQCLP-RIKIFSKII-GRKRR--ISTVYI--GGF-TYKGRKRKNWKSQSSCVQ
 AIYY-SFWMVGCSASYLVFVLVAKFSNGK-LLAGI-NFSGSCHVLQSFVYWDIRCYCSC
 FFVADSDQDVFCDTYGAQDCPNIFRTDSLQHTACSIVIF-HNTFRKNSESGI--SDQH-C
 LPPVFYESHFGHVYHTARHHHHMPIFLAYRTTFDSSGLA-YLVPGLLSCNIS-IDSA-L
 20 NYKSTCYSSFL-KHLRCYDYTLL-EAGDVL-RECKPSEFQSANGFPQQWIQ-MVGLSTGI
 DGKLTSLCFCNVHDCLT-QHHQARKCWFTIWLVS--CPILVHLCELLCGK-NGFCRKI
 KTVLRNTRSRVEKDGFSPTFKLAKPWEC-A-KRAG-ISSEHSSSA-RSYSQH-RGREDR
 CCWSYRGWKININSSFLSFGGACSWKNNH--RRYIQTWAS-S-ISLRDHSRASPF-RNC
 EKQH-PHWTIFR--NLEGASNAANSKMWCL-NPKNLIHQLLITEITGVSDRGSFFAWEE-
 25 C-NVADFYLWMRQLPLLIHRQMQ-FRKSSARTLRPVL-SALPTEYQQSWTVIEFLL-MQV
 LISLLLLCTLF-IW-MIIYLYVMVSNQS-SVPL-RNCLMLAK---MH

SEQ ID NO: 27 (cDNA sequence of NtMRP4 as derived from direct sequencing of cDNA)

atggatatgaggaacagtatgtcttcagaatcttggttagcatcactttctgttctgcctccacatttcaatcgtc
 30 agaggattcagcagttgttaaatggttaagattcattttcctctcctcatgtccacaaaggactcttctatcttcca
 ttgatgtgctgcttttgcctactttcattgtatttgcagtacaaaagttgtactcaaagttgaggtccaatgagcac
 tctacttctagcattgataagcctctaattgcacacaacaggacttctgttagaaccaatctttgggttaagctgtc
 tctgattttgtcagctatttttagccttatcttctatagttttatgcattttggttattgtgggaaattcccagtcgc
 cttggaagatcatagatggactgtattggtgtttcaggcgattacacatggttgtaatacactataactaatagttcat
 35 gagaaaagatttccagctatttcccatcctgtccttgcgcgtgttttgattgcaaactttgtagttatgagttt
 gttctttgggtgtgggacacaaaggcttgtgtcacttaaggaaattgatcctaatttaagaatggatgatataagtt
 cattagtttcatttctctatttctgtgttctcttctcattgttgccattaaagggttcgaccggagttgctgtaattagt
 gattctgaatctcacttaagtgatgaaaccaatgggttatgaactcctggataaatccagtgtagtggttggcttc
 agcttctctaataatcgaaagccttttgatttggtatgaacccttactgcaaaaaggttacagtcacctctcaaga
 40 ttgatgaagttccttctccttccctcactgcataagagcagagaaaatgtctcaacttttcgaaagaaattggcctaaa
 cctgaagaaatatcaaagcatcctgtccgaacaacatttgcgtgcttcttgggaaggaagttattttactgccca
 ttcttgagtaatttagggtatgtgttatgtatgtatgggccaacactatacaaaagatttgggtattacacagcagga
 aagaggacatctccttatgaaggatactaccttataggaactctcctaataagccaaatttgggaagttctaacctc
 tcatcagttcaactttaactcccaaaagcttggcatgcttattcgagcgacacttctcacttcttgtataagaagg
 45 ggtaagggttgcagctcagctagacaggctcatggtgttgacagattgtaaatttatatggccgctgatgctcag
 cagctgtccgatgatgctacagctacattccatttggctcatgccattgcaagtttctgtggtttaggcattcct
 ttatacttacctcggtgcttcaactgttgtaacgctagctggacttgcagcagtgatggattttgtggtgtttggaa
 ctaaaagaaacaacagggtttcaatttaacatcatgaagaatcgtagattctagaatgaaagcgacaaatgagatgctt
 aattatatgcgcggttataaagttccaggcatgggaagaacattttaacaaaagaattgaatccttccgcgaatccga
 50 gtatggatgggtgttccaagttctgtactcaatcgctgggaatatcattgtcttggtagcactcctcttctagtgg
 ctacactcacttttggagtgcaatcttgttgggaatcccgcttgggtgcagggacagtggttactgcaacatctctc
 ttcaagatgttgcaggaaccgatcagggttttccctcaatccatgatctcactttcacaagcaatgatattcttga
 tagattggacaaatatatgatgagtaaggagtttagtgataaagctgtggaaagactagaaggttgtgggggtacaa
 ttgctatgcaggtgaaagatggagctttttgctgggatgatgaaaacagtaagaagaattgaaaaatgtaaacctt
 55 gagattagaaaaggagagcttgcagcagtagtggggacagttggggcggggaagtcctccctccttgcattctgtact
 tgggtgagatgcacaagttgtcgggtcaggtcacaatttgtggttcaactgcctatgttgacaaacatcgtggattc
 agaattggcacgatacaagaaaatatcctgtttggtatgccaatgaacagagacagatacaaggaagtgatccgggtt

tgctgcttgagaaggacttggaataatggagtttggagaccagactgaaataggagaacgtggcatcaacctcag
 tgggtggcagaagcagcgaatccagcttgcaagagctgtttaccaggactgtgatatttatcttctagatgatgtat
 tcagtgcagttgatgtcacactggctctgaaatcttcaaggaatgtgtgaggggaattcttaaaagataaaaccatt
 ttgcttgtcacacaccaagttgacttcttgcataatgttgacctgatccttgtcatgagagatgggatgatcgtgca
 5 atctggcgaatataatgagatattagaagctggaatggattttaaaagactagtagctgcacatgagacctctttag
 aacttgttgacgtggaacaaccaaagagagcaatgcctcccttgagaatcaaaatcttctcgaagattatctaag
 gaagaaaacggagatgataaatctcaacagttctacatctgatagggggattctaaacttataaaaggaagaagaag
 agaaactggaaaagtcagtcctcgtgtgtacaagctatatattactgaagcttttggatgggtggggtgtagtgctag
 ttatcttgttttctgttcttgggcaaagtctctaattggcaagtgattattggctggcatatgaaacttcagcggat
 10 cgtgccatgtccttcaatccttctctgtttattgggatatacgggtgttattgcagttgtttcttctgttctgatagt
 gatcaggatgtatttttgtgacacttatggggctcaagactgcccaaatatttttcggacagattctttacagcatac
 tgcattgctcctatgtcattttttgacacaacaccttcgggaagaattctgagtcgggcatctaattgatcagaccaac
 attgatgtcttctcccggtttttatgaatctcactttggccatgtttatcacactgctcggcatcatcatcatcac
 atggcaatattcttggcctaccgtactacttttgattctctgggttggcttaatatctggtaacggggatattatc
 15 ttgcaacatctcgtgaattgactcggcttgactcaattacaaaagcacctgttattcatcatttctctgaaagcatc
 tcaggtgttatgactatacgttgcctttaggaagcaggagatgttttgaacgagaatgtaaacgagtggaattccaa
 tctgcgaatggatttccacaacaatggatccaatgaatgggtgggcttgcactggaattgatgggaagcttacttc
 tttgtgtttctgcaatgttcatgtattgtcttacctagcagcatcatcaagccagaaaatgttgggttgtcactatca
 tatggcttgtctcttaatagtgtcctattctgggtccatcttctgtgagttgctttgtggaaaataaaatgggttctgt
 20 cgaaagattaaaacagttctcagaaataccatcagaagcagagtggagaaagatggattttctccacacctcaagtt
 ggccaagcgtgggaattgtgagcttgaaaacgtgcaggttagatatcgtccgaacactcctctagtgtctaaagga
 gttactctcagcatttagagggggagagaagatagggttgggtcgtacaggggggtgaaaaatcaacattaattca
 agttttcttctgttgggtggagcctgcagctggaagaataatcattgatgacgtagatatccagacttgggcttc
 atgatcttagatctcgcttcgggatcattcccaagagccagtccttttgaaggaaactgtgagaagcaacattgac
 25 cccattggacaatattcagatgatgaaatttggagagcctcgaaacgtgccaaactcaaagatgtggtgtctttaa
 acccgaaaaacttgattcaccagttgttgataacggagataactggagtgctggacagaggcagctcttctgttgg
 gaagagtgtatgctaaaacgtagcagacttctatttatggatgaggaactgcctctgttgattcacagacagatgca
 gtgattcagaaaatcatccgcgaggactttgcggtctgtactataatcagcattgcccacagaataccaacagtcac
 ggactgtgatagattcttggttatagatgcaggaatagcaaaagagtttgacaaacatctcgttctgttgaaaggc
 30 cttcactttttggggcttgggtcaagaatatgccaaaccgatcctctgagctctaa

SEQ ID No. 28 (DNA sequence of NtMRP3 with 5' and 3' UTR)

ccgtcaacccagttcttggccaccacataaacacagctttgacttgtctctcccttttccctattttcaccacccttt
 tcaatttcccaccttatattcattatttatatttaataatcaaatcaaaagttggaaaaaaaggagtaataatcaaa
 35 tggagtagtatatacataccagaacaatgaaagagcactcataagctaaagcccataattcatcacgaaaccacaat
 atagaggaacactgcagctgtcccttaaaatctaacttgaacctctgagacctccaaaaaaaacatc
 40 
 gtcattagttgttctttgcacctgggattgttcccttgtaattcttggggtgtgtgttgggaataacaatcag
 45 
 50 
 55 

gatgaatatactacacatcagctatc
ttggcgcgcgaatcctatgggaatc
caagcgcgcgaatcctatgggaatc
5 ttggcgcgcgaatcctatgggaatc
ttggcgcgcgaatcctatgggaatc
ggcgcgcgcgaatcctatgggaatc
caagcgcgcgaatcctatgggaatc
10 tagagcgcgcgaatcctatgggaatc
aaagcgcgcgaatcctatgggaatc
gcagagcgcgcgaatcctatgggaatc
atgcgcgcgcgaatcctatgggaatc
cctagcgcgcgaatcctatgggaatc
15 tttagcgcgcgaatcctatgggaatc
taatatcatatagacttaactcatttaactatgatattttctctcag
ctggcgcgcgaatcctatgggaatc
gcaagcgcgcgaatcctatgggaatc
20 taagcgcgcgaatcctatgggaatc
cttagcgcgcgaatcctatgggaatc
tatgcgcgcgcgaatcctatgggaatc
gttgcgcgcgcgaatcctatgggaatc
25 attacattttctttatttagcccttttttttcttattagtgtcaatctttctgttacatgactaatcaatgtttt
gtgaaattagctagtaatttcagaattaactcaaatgtactttggtatgaaaacag
aatgcgcgcgcgaatcctatgggaatc
tgcgcgcgcgcgaatcctatgggaatc
accacctttttcgtgtttctttgccttcacaattattctactatagctttttcacaagtgtgacataacttttagcg
30 acattcataaacgtgagttacatttaagtggtaggtttgttttcattgcag
gttgcgcgcgcgaatcctatgggaatc
gttgcgcgcgcgaatcctatgggaatc
35 gtaagttctctatcttcatgtttttctttccttgaagttt
gttgcgcgcgcgaatcctatgggaatc
gttgcgcgcgcgaatcctatgggaatc
40 gtaagttctctatcttcatgtttttctttccttgaagttt
gttgcgcgcgcgaatcctatgggaatc
gttgcgcgcgcgaatcctatgggaatc
45 gtaagttctctatcttcatgtttttctttccttgaagttt
gttgcgcgcgcgaatcctatgggaatc
gttgcgcgcgcgaatcctatgggaatc
50 gtaagttctctatcttcatgtttttctttccttgaagttt
gttgcgcgcgcgaatcctatgggaatc
gttgcgcgcgcgaatcctatgggaatc
55 gtaagttctctatcttcatgtttttctttccttgaagttt
gttgcgcgcgcgaatcctatgggaatc
gttgcgcgcgcgaatcctatgggaatc
gac

[illegible]

[illegible]

15 SEQ ID No. 30 (Intron 1 of NtMRP3)

gatatgttggtgatgaatccctccgaacccattttcttacgtgtcattagtgttctttgcacctgggattgttcctt
gtaattcttgggtgtgttggtggaatacaatcag

SEQ ID No. 31 (Intron 2 of NtMRP3)

20 gtaagtcctttcatatatatgctttattttcatgcttgatatattttacctagccacttgattgaccatcctttaa
 ttgcag

SEQ ID No. 32 (Intron 3 of NtMRP3)

gtactcttttcctttcagtaattatggtttgcttaatatcatatatagacttaactcatttaactatgatatttctct
25 tcag

SEQ ID No. 33 (Intron 4 of NtMRP3)

gtaagtgaatgattacatcttctttatttagccctttttttccttattagtgccaatcttctgttacatgacta
atcaatgttttgtgaaaattagctagtaatttcagaattaactcaaagtactttgggatgaaaacag

30

SEQ ID No. 34 (Intron 5 of NtMRP3)

gttgctacgaccaccttttctggtgtctttgccttcacaattattctactatatgctttttcacaagtgagtcata
acttttagcgacatttcataaacgtgaqttacattttaagtggtgaqttttgttttcattgcag

35 SEQ ID No. 35 (Intron 6 of NtMRP3)

gtaagtctctatcttcattgtttctttccttgaagtttggtgtgtgaataactcttaagagcacattttctccgt
ttcttgatttacag

SEQ ID No. 36 (Intron 7 of NtMRP3)

40 gtaaattaagttattctctggtgtaattatgcaggtaatttggttggtatgggttggtatatctgaaaacttttaa
tag

SEQ ID No. 37 (Intron 8 of NtMRP3)

gtgacagcgttggttttgctatttttggaattattttgtttcagataggaaaatgacaaattttattttattgagaa
45 acttttqtttgatgttatgcttcaq

SEQ ID No. 38 (Intron 9 of NtMRP3)

gtaacttcaagaaccacatcattttctgatgatttccacttttagagctgtaataatcatcttcattgcggttgctgc
ag

5 SEQ ID No. 39 (Intron 10 of NtMRP3)

gtaagaatcatcgtttatgttctggagcaagcggagaaggaaattcttggtagttaccttttttttatgctatgctg
cag

SEQ ID No. 40 (Exon 1 of NtMRP3)

10 Atgggaattgcaaaagggaattgttgttttccaatttttgaac

SEQ ID No. 41 (Exon 2 of NtMRP3)

[illegible]

SEQ ID No. 42 (Exon 3 of NtMRP3)

45

SEQ ID No. 43 (Exon 4 of NtMRP3)

50

gttatagaccttgtttatggggaaaagaaccaatctttaccaactcaattttgtatacct
 gatgttgttttctactcttatggggttattcttctgttttgttgggtttattgtttaaaca
 gagagtggaggagaatatgcttcagggaacccctcttaaatggtagtgttgccaatggcatg
 gactcaaagaagtctactggggatcaaactgtcaccccttatgccaatgctaacttttt
 5 agtctctttactttctcttggatgggtcccttaatttctgttggcaacaagaaaccatta
 gaccttgaggatgttccctcagcttcactttgatgatagtgtcaaagggagttttccatt
 tttagagaaaaactagaatctgtgggtggggaaaatagtaaccgtgtgactaccttcattg
 ctgggtgaaggcttttgggttttcacagcacggaaggagatagtgttatcggtctcttctgtg
 ctcttttacgctctggcgtcttttgttggcccgtaacctcattgataccttagttcagtat
 10 ctgaatggaaaacgagactttgataatgaaggttatgtcttagtggtgcattcttctgtt
 gcaaagttggtggagtgtttggcgcaaaggcatttggttttcaaggtgcagcagggaggg
 tatcgggcacgggcagcactggtttccaaaatctacaacaagggtttaacctctctctgt
 cagtcaaagcaaaagccacactagtggagagatcatcaattttatgacagttgatgccgag
 aggatgggtgacttcgggttggtatgcatgatccttggatggtaatcatacaagttgct
 15 ctggcattgggtgatactctataaaaaatcttggcctagctgctatcgccgcttgggtgct
 acaataatagtgttggcaaacatccctttagggtgttgcaggagaagtttcaggag
 aaactcatggaatcgaaagatagaaggatgaaggctacatctgaagtcttaaggaatatg
 agaatactcaagcttcaagcttgggagatgaagtttctgtctaggatcttggacctcagg
 actacagagggcaggatggtgatgaaatatgtgtacacatcagctatgactacttttctc
 20 tcttgggttgcctctacatttgtttctgtgacgaccttggcgctgcaatgcttatggga
 atcccacttgaatctgggaagatatgtctgcacttgcgacatttagaattcttcaagag
 ccatctacaatctcccagatacaatttcaatgattgctcaaaccxaaagtttctcttctt
 cgtattgcatcttctcttctcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttctt
 aaaggtagtctgatgaagcaattgagattgttaggtgggaacttcgcttgggatgcatcc
 25 acctcgactccacttctaaaggatgtaaatcttagagtgttaatggcatgagagttgcc
 atttgtggtacagttggttcaggaaaaatcaagcttactgtctagcatttttaggagagatg
 cccaaattatcagggactattaaacttagtggaaacgaaggcttatgttgcacagtcgcc
 tggatcacagagtggaaagatagaggagaacatatttggtaagagatgcagagggag
 aagtatgataaaagttcttgaagcgtgctccttaaagaaagacctggaaattctctctt
 30 ggcgatcaaacagaaataggggagaggggcatttaatttgagcgggtggacagaagcagaga
 atacagattgctcgtgctctttaccaagatgctgatgtttacctatttgatgatccgttc
 agtgcgtggtgatgctcataccggatcccatctcttctcagtgaaatgtataatggggctattg
 aattcaaaaacagttttatatgttacacatcaagtggagttttgcctgctgcggatttg
 atcttgggtcatgaaagatggaaggatcagtgaactgggaaatacaatgatcttctcaaa
 35 ttaggtagtgtacttcatggaacttgtgggtgctcaccaagaagctttaacagcaattgac
 acagtttaagggagaagcattgagaagagtgggaaatgactggtgataatacaaatgta
 cgaaggataaaaaatattcagatggccaaaatggtaaaagtggatgatattgttggaa
 aagggacaaaattgttcaggaggaggaaagagagaaaggtagtgttgggttttctcagtttac
 tggaaatatatacaactgcataatggaggtgctcttgtgccatttatgctgttggcacaa
 40 gttgggttttctcagctccttcaaatgggaagcaattattggatggcggtgggcaactccgctc
 tcaaaagagtggccacctcctggttgggagttctactctcatcattgtctatgttgcctta
 ggaattgcaagtgtttatgcatccttgcctagaacctgtttcttgttaccgctggatat
 aagacagcctcttcttcttccataaaaatgcatcttgcattttccgtgctccaatgtcc
 ttcttcgatgccacaccgagtgggcggattctaaacagagcatcgacagatcaaagtgc
 45 attgatctgaatgttccattcaagttggatccttgccttcacaataatacagctttta
 gggattattggagtaatgtcacaagttgcatggcaggtcttcattgtctttattccggtc
 attgcagtttgcctctggttggagcaatattacataccatcagcacgagaactggcacgg
 ctaaatgggacatgcaaagctccagtaatacagcacttggccgagacaatttcaggatca
 agcacaattagaagtttcgatcaggaatctagattccaggacacaagtatgaaattgata
 50 gacaattattctcgccctaagtttcacatcgctgctgcaatggagtggctttgtttgcgt
 ttggatatgttatctctgatcacttttgccttctctttaaattttcttcttctcttctct
 gttgggaacaattgacccaagtgttgcgtggcttagctgttacatatgggcttaattctgaac
 ataatacaagctcggttgtttggaatcttctgtatgatggaaaataaaattatttctgtt
 gaaagaatacttctagatactgctcttccaagtgaatctcctcttatcatagaatccaac
 55 agaccagaccctaactggccatcttgtggagaggttgatttagcaatcttcaggtccga
 tatgctcctcacatgcctctcggttgcgaggecttacatgcactttcttgggtggaaag
 aagactggaattgtcggtaggacaggcagcggtaaatctactctaatacagaccctctc
 cgcatagttgaaccagctgctggacaaaataaaaatagatgggtatcagcatctcctcaatt
 ggtttgcatgatctacggtctagattgagtataattccacaggatccaactatgtttgag

ggaacagttcgcagcaacctagaccgcttgaagagtattcagatgaacaaatttgggag
 gcgctcgataagtgtcagctaggagaagaagtgaggaagaaagaaggcaaacctttattct
 acagtatctgagaatggagagaactggagtgtaggccaaaggcagctgggtctgccttggc
 cgtgtgctactgaaaaagagcaaggtcctggtccttgacgaggtacagcatctgtcgac
 5 actgcaactgataatcttattcagcaaacctctaaggctgcacttctctgattccacggtt
 ataaccattgctcataggattacatctgtgcttgacagtgatatggctcctactattagat
 catgggctcattgctgaatacggcactccagccaggttgtagagaacgaatcctcattg
 tttgctaagctcgtggcagagtatagtaggaggtcaaattcaagttttgagaatgtttca
 gacatgtga

10

SEQ ID NO: 52 (protein sequence of NtMRP3; 5'-3'; - denotes putative stop codon)

MEIAKGMSVFEQSLRDRDNNAGHKQSSSTRNARFLYYKSTLFCSIGLAIFSFVLCLLAHFYWY
 RNGWSEEKIIITLLDFALKLLAWLSISVFLHTQFLNSCETKYPLVLRVWVWGLFFFVSCYCL
 VIDLVYGEKNQSLPTQFCIPDVVETLMGLEFFCFVGFIVKTESEENMLQEPLNGSVANGM
 15 DSKKSTGDQTVTPYANANIFSLFTFSWMGPLISVGNKKPLDLEDVPQLHFDDSVKGSFPI
 FREKLESVGGGNSNRVTTFMLVKALVFTARKEIVLSALEFVLLYALASFVGPYLIDTLVQY
 LNKGRDFDNEGYVLVAFFVAKLVECLAQRHWFVKVQGGYRARAALVSKIYNKGLTLSC
 QSKQSHTSGEIIINFMTVDAERICGDFGWYMHDPWMVIIQVALALVILYKNLGLAAIAAFVA
 TIIIVMLANIPLGSLQEKFEKLMESKDRRMKATSEVLRNMRILKLQAWEMKFLSRILDLR
 20 TTEAGWLMKYVYTSAMTTFVFWVAPTFFVSVTTFGAAMLMGIPLESKILSALATFRILQE
 PIYNLPDTISMIAQTKVSLDRIASFSLDDLQPDVIEKLPGKSSDEAIEIVGGNFAWDAS
 TSTPLLKDVNLRVLNMGMRVAICGTVGSGKSSLLSSILGEMPKLSGTIKLSGTKAYVAQSP
 WIQSGKIEENILFGKEMQREKYDKVLEACSLKKDLEILSFGDQTEIGERGINLSGGQKQR
 IQIARALYQDADVYLFDDPFSAVDAHTGSHLFSECIMGLLNSKTVLYVTHQVEFLPAADL
 25 ILVMKDGRISSETGKYNDLLKLGSDFMELVGAHQEALTAIDTVKGEALRKSEEMTGDNTNV
 QKDKNISDGGQNGKVDDIVGTKGQIVQEEEREKGSVGFVYWKYITTAYGGALVPFMLLAQ
 VGFQLLQIGSNYWMWATPVSKSEPPPVGSSTLIIVYVALGIASALCILARTMFLVTAGY
 KTASLLFHKMHLICIFRAPMSFFDATPFGRIILNRASDQSAIDLNVPIQVGSFAFTIIQLL
 GIICVMSQVAWQVFIVFIPVIAVCIWLEQYYIIPSARELARLNGTCKAPVIQHFAETISGS
 30 STIRSFQESRFQDTSMKLIDNYSRPKFHIAAAMEWLCLRLDMLSLITFAFSLIFLISLP
 VGTIDPSVAGLAVTYGLNLNIIQARVVWNLCMMENKIIISVERILQYTALPSESPLIESN
 RPDENWPSCGEVDFSNLQVRYAFHMLPLVLRGLTCTFFGGKKTGIVGRTGSGKSTLIQTLF
 RIVEPAAGQIKIDGISISSIGLHDLRSRLSIIIPQDPTMFEGTVRSNLDPLEEYSDEQIWE
 ALDKCQLGEEVRKKEGKLYSTVSENGENWSVGQRQLVCLGRVLLKSKVLVLDEATASVD
 35 TATDNLIQQTLRLHFSDSTVITIAHRITSVLDSDMVLLLDHGLIAEYGTPARLLENESL
 FAKLVAEYSMRNSSSFENVSDM-