

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 989 556**

51 Int. Cl.:

A01H 5/12 (2008.01)

C07K 14/415 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

A24B 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.01.2017** **PCT/EP2017/051761**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.08.2017** **WO17129739**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.01.2017** **E 17702591 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2024** **EP 3407704**

54 Título: **Reducción de la acumulación de cadmio en plantas de tabaco cultivadas en el campo**

30 Prioridad:

29.01.2016 EP 16153529

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.11.2024

73 Titular/es:

PHILIP MORRIS PRODUCTS S.A. (100.0%)
Quai Jeanrenaud 3
2000 Neuchâtel, CH

72 Inventor/es:

BOVET, LUCIEN y
LIEDSCHULTE, VERENA

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

Observaciones:

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

ES 2 989 556 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Reducción de la acumulación de cadmio en plantas de tabaco cultivadas en el campo

5 Antecedentes

Muchos metales pesados están presentes naturalmente en el suelo y las plantas los absorben en un grado diferente. Algunos metales pesados, tales como manganeso o zinc, son esenciales para las plantas, ya que representan cofactores que se requieren para la actividad enzimática. Otros metales pesados no son esenciales para las plantas y, en algunos casos, una reducción en la concentración de metales pesados sería beneficiosa. El cadmio (Cd) es uno de los metales para los que no existe un informe de un efecto beneficioso sobre el desarrollo de plantas o humanos. Se clasifica como carcinógeno humano conocido. Si el Cd se acumula en exceso en las plantas, puede desencadenar varios efectos perjudiciales, tales como una reducción de la superficie foliar, una reducción del peso seco, una reducción del contenido de agua, una reducción del contenido de clorofila y una reducción del contenido de carotenoides. El tabaco es una especie vegetal que se caracteriza por una capacidad para acumular niveles de Cd cuatro veces más altos en los brotes que en las raíces. Es conveniente ser capaz de reducir la acumulación de Cd en las plantas, tales como el tabaco. Es especialmente conveniente ser capaz de reducir la acumulación de Cd en las plantas, tales como el tabaco, cuando se cultivan fuera en un campo abierto a gran escala para la producción comercial.

El grado de acumulación de Cd en las plantas puede variar en dependencia de varios parámetros que se atribuyen a la complejidad del genotipo y al ambiente de cultivo. Por ejemplo, las concentraciones de Cd en las hojas de tabaco que se cultiva en el campo pueden variar en dependencia de factores tales como el agroclima, los parámetros del suelo y los cultivares. Como promedio, las concentraciones de Cd medidas en las hojas de tabaco que se cultiva en el campo (que incluyen nervios centrales y venas) pueden estar en el intervalo de aproximadamente 0,5 a 5 ppm (partes por millón, o µg/g de peso seco de hojas de tabaco). Se han observado valores más bajos y más altos en el intervalo de 0 a 6,78 ppm (Lugon-Moulin y otros, 2006).

Se han hecho varios intentos para reducir la acumulación de Cd en las hojas de tabaco. Un método implicó reducir la acumulación de Cd en brotes mediante el aislamiento de Cd en las vacuolas de las raíces. Esto se logró mediante la sobreexpresión de los transportadores vacuolares de calcio y manganeso CAX2 y CAX4 de *A. thaliana* en las raíces de tabaco (Korenkov y otros, 2009).

Puede ser conveniente desarrollar enfoques de organismos no modificados genéticamente (no GMO) para reducir la acumulación de Cd en las hojas de las plantas a través del uso de inactivación génica. Debido a las dificultades para cultivar y comercializar cultivos modificados genéticamente en países, que incluye Europa, puede ser conveniente trabajar con mutantes que presenten polimorfismos de un solo nucleótido que se obtienen a través del tratamiento con metanosulfonato de etilo (EMS) o similares en lugar de mediante el uso de técnicas de ingeniería genética. Los mutantes no se consideran como GMO incluso cuando las mutaciones se inducen artificialmente. En la UE, por ejemplo, no existen regulaciones especiales para las plantas que se derivan de la reproducción por mutaciones.

El documento WO2012/041913 describe plantas de tabaco con contenido reducido de metales pesados en las hojas. Esto se logra a través del uso de plantas de tabaco que comprenden al menos una mutación en un gen de HMA. La mutación provoca una sustitución o una delección o una inserción de al menos un aminoácido en el polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos y reduce la captación de metales pesados por las hojas de la planta. Se identificaron varias mutaciones únicas en el documento WO2012/041913 como se resume en la Tabla 1, en la presente descripción. Esta cita presenta datos de pequeñas plántulas que se cultivaron en hidropónicos. En este sistema, estaban presentes concentraciones muy altas de Cd y Zn que no reflejan las condiciones en los sistemas de campo abierto. Las concentraciones de Cd que se midieron en hojas de las plantas control en tales sistemas son de 30 a 300 veces más altas en comparación con las que se encuentran bajo las condiciones del suelo.

Hernand y otros (2014) informan los efectos de inactivar los ortólogos de tabaco de *Arabidopsis thaliana* HMA2 y HMA4 mediante el uso de mutaciones que se obtuvieron mediante el tratamiento con EMS. AtHMA2 y AtHMA4 codifican ATPasas de metales pesados (HMA) que transportan tanto zinc (Zn) como Cd de las raíces a los brotes. Se identificaron dos ortólogos a los genes AtHMA2 y AtHMA4 en el genoma de *N. tabacum* y se denominaron NtHMAα y NtHMAβ, respectivamente. La expresión se alteró para determinar la posibilidad de usar este enfoque para obtener líneas de tabaco con niveles reducidos de Cd en las hojas. Para estudiar el papel de estos genes de NtHMA en el tabaco, las líneas de tabaco que contienen una mutación en cualquiera de los genes de NtHMA se identificaron mediante el cribado de una colección de mutantes mutagenizados con EMS. Se identificaron mutaciones con cambio de sentido (P249S, E387K y G515R) y mutaciones sin sentido (W265* y R529*) en NtHMAα (P294S, E387K y W265*) o en NtHMAβ (G515R, R520*). Estas mutaciones alteraron los aminoácidos o introdujeron codones de parada prematura en el segundo (P294S y W265*) y tercer (E387K, G515R y R520*) lazo citosólico de la proteína HMA. Las líneas mutantes únicos homocigóticas que se generaron por Hernand y otros (2014) se cultivaron bajo condiciones estériles artificiales en placas de agar que contenían medio Murashige y Skoog. Los resultados que se obtuvieron con los mutantes únicos como se informa en las Figuras 4a y 4b de Hernand y otros (2014) se resumen en la Tabla 2 en la presente descripción. Se informó que los mutantes únicos mostraron una acumulación reducida de Cd y Zn en los

brotos. Se informó que las plantas mutantes únicas tenían un crecimiento y desarrollo que fue comparable con las de tipo silvestre. Las plantas que contenían una mutación sin sentido en ambos genes de *NtHMA* mostraron un crecimiento reducido fuerte y no produjeron semillas. Particularmente, los datos que se informan en las Figuras 4a y 4b se obtuvieron mediante el uso de pequeñas plántulas que se cultivaron en cultivo estéril en las que se usan concentraciones artificialmente altas de Cd y Zn. Estas concentraciones artificialmente altas de Cd y Zn no reflejan las condiciones naturales que están presentes en condiciones de campo abierto. Las concentraciones de Cd que se midieron en los brotes de las plantas control en la Figura 4a es de aproximadamente 135 ppm. Estas concentraciones son de aproximadamente 30 a 300 veces más altas en comparación con las concentraciones de Cd que se observaron en las plantas que se cultivaron bajo condiciones de campo. En base a los resultados de su trabajo, mediante el uso de los mutantes que contienen polimorfismos de un solo nucleótido que se obtuvieron mediante el tratamiento de EMS, Hermand y otros (2014) concluyeron que la función de *NtHMA α / β* necesita conservarse al menos parcialmente para el crecimiento y desarrollo normales y que la modificación genética de plantas de tabaco comercialmente valiosas sin Cd en los brotes no puede lograrse a través de la única inactivación de los dos genes de *NtHMA*. Se discute que inactivar solo uno de los genes de *NtHMA* podría conducir a plantas comercialmente valiosas que muestran una reducción de la concentración de Cd en los brotes. Para disminuir aún más la capacidad de la planta para acumular Cd en las hojas, Hermand y otros (2014) contemplan combinar diferentes mutaciones en genes de *NtHMA* juntos, tales como la combinación de una mutación sin sentido en un gen de *NtHMA* con una mutación con fugas en el otro gen de *NtHMA*. Liedschulte y otros en la 12a conferencia de Solanaceae (SOL2015), Bordeaux, Francia, 25 al 29 de octubre de 2015 describieron que las mutaciones sin sentido o con cambio de sentido en *HMA4.1* o *HMA4.2* (que corresponden a *NtHMA α* y *NtHMA β* , respectivamente) no reducen significativamente el contenido de cadmio en las hojas de plantas de tabaco que se cultivan bajo condiciones de campo. En este estudio, se describen plantas de tabaco con ARNi de *HMA4* que exhiben una reducción de alrededor 10 veces del contenido de Cd en comparación con un control de tipo silvestre. Sin embargo, el fenotipo se afectó fuertemente por un crecimiento reducido, hojas más gruesas y lesiones necróticas. Se informó un fenotipo similar para los mutantes de tabaco de doble desactivación de *HMA4* por Hermand y otros, 2014. Se probaron 19 líneas de mutantes de *HMA4* con cambio de sentido homocigóticas y cuatro líneas mutantes de *HMA4* sin sentido homocigóticas adyacentes a sus controles de segregación nula en el campo. No se observaron diferencias fenotípicas en las plantas mutantes de *HMA4*. No se observó una reducción de Cd y Zn estadísticamente significativa (prueba-T pareada en relación; $p < 0,05$) más allá del nivel de incertidumbre de la medición (20 %) en ninguna de las líneas de mutantes que se analizaron, que contienen una mutación sin sentido o con cambio de sentido homocigótica en uno de los genes de *HMA4*. Liedschulte y otros (2015) concluyen en su estudio que la desactivación completa de *HMA4* da como resultado una fuerte reducción de Cd y Zn y alteraciones fenotípicas, que incluyen enanismo y lesiones necróticas. También se concluye que, a diferencia de Hermand y otros (2014), una mutación perjudicial en *NtHMA4.1* o *NtHMA4.2* no reduce significativamente los niveles de Cd en plantas cultivadas bajo condiciones de campo. Se concluye que el enfoque de Hermand y otros (2014) no es aplicable a las condiciones de campo. El autor desarrolló estas ideas a partir de un proyecto de doctorado (Hermand V. (2012).

El documento WO2013/119541 es otro ejemplo que describe los métodos para fabricar plantas de tabaco o una porción de esta que tienen una captación alterada y/o niveles alterados de al menos un contaminante ambiental u otro producto químico no natural en comparación con una planta de tabaco no modificada o una porción de la misma de la que se deriva la planta modificada, el contaminante ambiental u otro producto químico no natural puede comprender un metal pesado que puede ser cadmio. Los genes mutados y las posiciones de las mutaciones no se describen en el mismo.

Existe una necesidad continua en la técnica de desarrollar enfoques, tales como enfoques no GMO, para reducir la acumulación de Cd en las plantas, tales como tabaco, cuando se cultivan afuera en un campo abierto a gran escala para la producción comercial. La presente invención busca abordar esta necesidad.

Sumario de la invención

La invención se expone en el conjunto de reivindicaciones adjuntas.

Los documentos WO2012/041913 y Hermand y otros (2014) describen líneas de tabaco mutantes de EMS que muestran una acumulación reducida de Zn y Cd en los brotes bajo condiciones de cultivo altamente artificiales estériles o hidropónicas. A diferencia de las enseñanzas de los documentos WO2012/041913 y Hermand y otros (2014), la presente invención se refiere a reducir el nivel de Cd en plantas de tabaco cuando se cultivan afuera en el ambiente abierto (por ejemplo, en el campo) donde los niveles de Cd son de 30 a 300 veces menores que los niveles de Cd que se usaron en los documentos WO2012/041913 y Hermand y otros. (2014). Se pretende que las plantas de tabaco que se describen en la presente descripción se usen para la producción comercial que exige que se cultiven bajo condiciones de campo en el aire abierto en cantidades muy grandes en lugar de cultivarse en condiciones artificiales. Para cultivar comercialmente plantas bajo condiciones artificiales sería poco económico. La presente invención busca proporcionar plantas de tabaco mutantes, tales como plantas de tabaco mutantes no GMO, en las que el nivel de acumulación de Cd se reduce cuando se cultivan en condiciones de campo abierto.

Las condiciones que se usaron por Hermand y otros (2014) no reflejan las condiciones naturales en condiciones de campo abierto, que son las condiciones que son de interés en la presente descripción. Los resultados informados por Hermand y otros (2014) son de uso limitado para el experto en la técnica que busca reducir el nivel de Cd en plantas que se cultivan en condiciones de campo abierto desde el nivel de Cd en condiciones de campo abierto y las

condiciones artificiales que se usaron por Hermand y otros (2014) y no son comparables. Además, Liedschulte y otros (2015) concluyen que una mutación perjudicial en *NtHMA4.1* o *NtHMA4.2* no reduce significativamente los niveles de Cd en plantas que se cultivan bajo condiciones de campo más allá del nivel de incertidumbre de la medición (aproximadamente 20 %). El enfoque de Hermand y otros (2014) se concluye que no es aplicable a las condiciones de campo.

Los presentes inventores crearon varios mutantes únicos de EMS homocigóticos de *HMA4*, que incluyen la mutación sin sentido única W265* que se informó por Hermand y otros (2014), y se probaron en condiciones de campo abierto. Los resultados de este experimento se informan en la Tabla 3 en la presente descripción. Los resultados muestran que ninguno de los mutantes únicos que se probaron, que incluye la mutación única W265* de Hermand y otros (2014), mostraron ninguna reducción de Cd bajo condiciones de campo abierto. Como puede observarse en la Tabla 3, cuarta columna, el % de reducción de Cd frente al control para cada uno de los mutantes únicos que se probaron bajo condiciones de campo abierto fue del 0 %. Estos resultados son consistentes con los resultados informados por Liedschulte y otros. (2015).

En base al conocimiento de que ninguno de los mutantes únicos que se probaron y se informan en la Tabla 3, en la presente descripción, mostraron ninguna reducción de Cd bajo condiciones de campo abierto, las expectativas de los presentes inventores fueron que combinar dos o más de estas mutaciones únicas que están inactivas bajo condiciones de campo abierto juntas no tendría un impacto o tendría un impacto insignificante en la reducción de Cd bajo condiciones de campo abierto. Sin embargo, y en contraste directo de esta expectativa, los presentes inventores determinaron que cuando varias mutaciones únicas como se informa en la Tabla 3 se combinan juntas en diferentes combinaciones para formar mutantes homocigóticos dobles, pueden lograrse altos niveles de reducción de Cd en la hoja (por ejemplo, 20 % o más) en condiciones de campo abierto. En algunos casos, el nivel de reducción de Cd en la hoja que se logró en condiciones de campo abierto fue al menos aproximadamente 27 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 % o incluso aproximadamente 90 % o más, como se resume en las Tablas 4, 5 y 6 en la presente descripción. Este alto nivel de reducción de Cd es altamente ventajoso para reducir el nivel de Cd en plantas que se cultivan bajo condiciones de campo abierto. Sorprendentemente, las plantas de tabaco mutantes dobles con niveles reducidos de Cd en la hoja como se describe en la presente descripción no sufren un fenotipo perjudicial, tal como cantidades reducidas de crecimiento/enanismo/biomasa. Los resultados ventajosos que se informaron para los mutantes dobles que se describen en la presente descripción es un hallazgo que no se esperaba ni predijo por los presentes inventores. En base a estos datos, la presente invención se basa, al menos en parte, en el hallazgo de que las plantas de tabaco pueden exhibir una acumulación reducida de Cd en la hoja cuando se cultivan en condiciones de campo abierto al reducir al menos parcialmente la expresión o actividad de *NtHMA4.1* y *NtHMA4.2*. Adecuadamente, las plantas no GMO pueden prepararse a través del uso de mutagénesis y adecuadamente no sufren un fenotipo perjudicial. *NtHMA4.1* y *NtHMA4.2* corresponden a *NtHMA α* y *NtHMA β* , respectivamente, como se informó por Hermand y otros. (2014). Ventajosamente, las diferentes combinaciones de mutantes pueden usarse como un kit de herramientas para cultivar diferentes variedades con niveles reducidos de cadmio y sin fenotipo y/o rendimiento comprometidos.

Algunas ventajas

La producción de plantas de conformidad con la presente descripción proporciona un número de ventajas.

Las plantas que se describen en la presente descripción pueden ser plantas no GMO que superan las dificultades de cultivar y comercializar cultivos modificados genéticamente.

Las plantas que se describen en la presente descripción pueden cultivarse en suelos que contienen concentraciones variables de Cd. Estas plantas y las semillas derivadas pueden proporcionar más opciones para cultivarlas en un intervalo más amplio de ambientes de suelo, lo que puede aumentar la cantidad de suelos cultivables disponibles para los practicantes. También puede aumentar el intervalo de fertilizantes de fosfato potencialmente aceptables, que pueden contener niveles más altos de Cd como elemento contaminante. Por lo tanto, los fertilizantes de fosfato de menor costo pueden volverse aceptables para la producción de cultivos.

El humo de productos derivados de estas plantas y el consumo de cultivos alimenticios a los que puede aplicarse la invención puede ser una opción más saludable debido a los niveles de Cd más bajos. El % de reducción de Cd en las plantas mutantes, tal como las partes aéreas de las plantas mutantes, que incluyen la porción de lámina foliar, puede ser aproximadamente al menos aproximadamente 20 %, 27 %, 30 %, 33 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 % o 95 % o más, cuando se compara con la contraparte de tipo silvestre.

El fenotipo de las plantas mutantes que se describen en la presente descripción puede ser similar o el mismo que las contrapartes de tipo silvestre, especialmente en el tiempo de cosecha, lo que significa que la cantidad de biomasa que se obtiene para la producción es comercialmente aceptable. En particular, las plantas mutantes no sufren cantidades reducidas de crecimiento/enanismo, especialmente en el tiempo de cosecha.

Las combinaciones de mutaciones que conducen al contenido de Cd más bajo posible combinado con niveles de

biomasa comercialmente aceptables pueden elegirse de conformidad con la especie vegetal y el cultivar de tabaco de interés.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Niveles de expresión génica para *HMA4.1* y *HMA4.2* en TN90 y K326 en 8 tejidos. La relación de expresión génica entre raíces y hojas es similar tanto para *HMA4.1* y *HMA4.2*. Las plantas que se usaron en este experimento son plantas cultivadas en campo maduro. Las barras y los errores representan la media y los intervalos de confianza superiores de tres plantas replicadas.

Figura 2: Niveles de expresión génica de *HMA4.1* y *HMA4.2* en líneas de ARNi de *HMA4* de TN90 y K326 y sus respectivos controles WT. Todas las raíces se cosechan de plantas que se cultivaron en agar, se muelen y se extraen. Las barras y los errores representan la media y la desviación estándar (DE) de 4 plantas replicadas. *, ** y *** indican los niveles de significación en $P<0,05$, $P<0,01$ y $P<0,001$, respectivamente, en comparación con las plantas control WT.

Figura 3: (a) plantas de tabaco *HMA4* ARNi K326 y TN90 y sus respectivas plantas WT de fondo se cultivaron durante cinco semanas bajo un régimen de fertilización bajo de N en el invernadero. Se determinó (b, c) niveles de Cd/Zn en peso seco, (d) altura, (e) peso de la hoja, (f) grosor de las hojas y (g) contenido de agua (comparación entre peso seco y fresco). Las barras y los errores representan la media $\pm$ DE de cinco plantas. *, ** y *** indican los niveles de significación en $P<0,05$, $P<0,01$ y $P<0,001$, respectivamente, en comparación con las plantas control no tratadas. Las líneas discontinuas indican LOQ=0,05 ppm para la medición de Cd.

Figura 4: (a) Fenotipo, (b) peso fresco de la hoja y (c) niveles de Cd en la hoja y (d) niveles de Zn en la hoja en peso seco de plantas mutantes que contienen números decrecientes de alelos de *HMA4* funcionales después de cinco (izquierda) y once (derecha) semanas de crecimiento en el invernadero. El genotipo se indica debajo de los paneles: A y a son los alelos de tipo silvestre y mutante para *HMA4.1*, B y b son alelos de tipo silvestre y mutantes para *HMA4.2*. Las barras y los errores representan la media $\pm$ DE de ocho plantas. *, ** y *** indican los niveles de significación en $P<0,05$, $P<0,01$ y $P<0,001$, respectivamente, en comparación con las plantas control WT. La línea de puntos indica LOQ=0,05 ppm para la medición de Cd.

Figura 5: Análisis de (a) Cd en la hoja y (b) Zn en la hoja y (c) peso fresco de la hoja en las diferentes plantas mutantes dobles y sus respectivos controles de segregación nula *HMA4* WT que se cultivaron durante cinco y once semanas en el suelo en el invernadero. Las barras negras indican los controles de segregación nula, las barras grises los respectivos mutantes dobles homocigóticos de *HMA4*. *, ** y *** indican los niveles de significación en $P<0,05$, $P<0,01$ y $P<0,001$, respectivamente, en comparación con las plantas control WT. Las líneas discontinuas indican LOQ=0,05 ppm para la medición de Cd.

Figura 6: datos de (a) Cd en la hoja y (b) peso fresco de la hoja de los mutantes de *HMA4* que se cultivaron en el campo en una región donde está presente un contenido de Cd moderado. El genotipo se indica: A y a son los alelos de tipo silvestre y mutante para *HMA4.1*, B y b son alelos de tipo silvestre y mutantes para *HMA4.2*. Las muestras mezcladas de hojas se recogieron en la posición del tallo inferior en seis (para algunos genotipos 3) terrenos replicados. Las barras y el error representan la media y la desviación estándar de 3-6 mediciones de terrenos replicados. *, ** y *** indican los niveles de significación en $P<0,05$, $P<0,01$ y $P<0,001$, respectivamente, en comparación con las plantas control WT. Las líneas discontinuas indican LOQ=0,05 ppm para la medición de Cd.

Figura 7: datos de (a) Cd en la hoja y (b) peso seco de la hoja de los mutantes de *HMA4* que se cultivaron en el campo en una región donde está presente un contenido de Cd moderado. Las barras negras indican los controles de segregación nula, las barras grises los respectivos mutantes dobles homocigóticos de *HMA4*. Las muestras mezcladas de hojas se recogieron en la posición del tallo inferior en seis terrenos replicados (para Q293*/W265* y Q293*/D234N cuatro). Las barras y el error representan la media y la desviación estándar.

Figura 8: datos de (a, b) Cd en la hoja y (c, d) peso de la hoja curada de los mutantes de *HMA4* que se cultivaron en el campo en dos regiones donde está presente un alto contenido de Cd. (a) y (c) corresponden a los datos de Cd y peso de la hoja curada del campo 3 y b y d a datos de Cd y peso de la hoja curada del campo 4. Las barras negras indican los controles de segregación nula, las barras grises los respectivos mutantes dobles homocigóticos de *HMA4*. Las muestras mezcladas de hojas se recogieron en la posición del tallo inferior en cinco terrenos replicados. Las barras y el error representan la media y la desviación estándar.

Figura 9: Esquema de las proteínas de *N. tabacum* *HMA4*. Tres dominios funcionales llevan a cabo funciones catalíticas: los dominios de fosforilación (P), unión a nucleótidos (N) y accionador (A) que se localizan en el segundo y tercer lazo citoplasmático de la proteína. Las mutaciones con cambio de sentido que se encontraron que tenían un impacto en la función de las proteínas y Cd reducido en combinación con una mutación sin sentido se resaltan con caracteres subrayados. Todas las demás mutaciones con cambio de sentido que se analizaron en este estudio no tuvieron impacto en la reducción de Cd cuando se combinaron con una mutación sin sentido. Las mutaciones sin sentido se resaltan en negro. (Este modelo solo sirve con propósitos ilustrativos y no refleja el plegado del dominio).

Definiciones

Los términos técnicos y expresiones usados dentro del alcance de esta solicitud generalmente tendrán el significado aplicado comúnmente para ellos en la técnica pertinente a la biología molecular y de plantas. Todas las definiciones de los términos siguientes se aplican a todo el contenido de esta solicitud. La palabra "que comprende" no excluye otros elementos o etapas, y los artículos indefinidos "un" o "una" no excluyen una pluralidad. Una sola etapa puede cumplir con las funciones de varias características enumeradas en las reivindicaciones. Los términos "alrededor de",

"esencialmente" y "aproximadamente" en el contexto de un valor o intervalo numérico dado se refieren a un valor o intervalo que está dentro del 20 %, dentro del 10 %, o dentro del 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 % del valor o intervalo dado.

El término "aislado" se refiere a cualquier entidad que se toma de su ambiente natural, pero el término no implica ningún grado de purificación.

Un "vector de expresión" es un vehículo de ácido nucleico que comprende una combinación de componentes de ácido nucleico para permitir la expresión del ácido nucleico. Los vectores de expresión adecuados incluyen episomas capaces de una replicación extracromosómica tales como plásmidos de ácido nucleicos circulares bicatenarios; plásmidos de ácidos nucleicos lineales bicatenarios; y otros vectores de expresión equivalentes funcionalmente de cualquier origen. Un vector de expresión comprende al menos un promotor que se ubica corriente arriba y se une operativamente a un ácido nucleico, constructos de ácidos nucleicos o conjugado de ácido nucleico, como se define más abajo.

El término "constructo" se refiere a un fragmento de ácido nucleico bicatenario recombinante que comprende uno o más polinucleótidos. El constructo comprende una "cadena molde" con apareamiento de bases con una "cadena codificante o sentido" complementaria. Un constructo dado puede insertarse en un vector en dos orientaciones posibles, ya sea en la misma orientación (o sentido) o en la orientación inversa (o antisentido) con respecto a la orientación de un promotor que se ubica dentro de un vector, tal como un vector de expresión.

Un "vector" se refiere a un vehículo de ácido nucleico que comprende una combinación de componentes de ácidos nucleicos para permitir el transporte del ácido nucleico, constructos de ácidos nucleicos y conjugados de ácidos nucleicos y similares. Los vectores adecuados incluyen episomas capaces de una replicación extracromosómica tales como plásmidos de ácidos nucleicos circulares bicatenarios; plásmidos de ácidos nucleicos lineales bicatenarios; y otros vectores de cualquier origen.

Un "promotor" se refiere a un elemento/secuencia de ácido nucleico, que típicamente se ubica corriente arriba y se une operativamente a un fragmento de ADN bicatenario. Los promotores pueden derivarse totalmente de regiones próximas a un gen de interés nativo, o pueden componerse de elementos diferentes derivados de promotores nativos diferentes o segmentos de ADN sintéticos.

Los términos "homología, identidad o similitud" se refieren al grado de similitud de secuencias entre dos polipéptidos o entre dos moléculas de ácidos nucleicos comparadas mediante alineación de secuencias. El grado de homología entre dos secuencias de ácidos nucleicos discretas que se comparan es una función del número de nucleótidos idénticos, o coincidentes, en posiciones comparables. El por ciento de identidad puede determinarse mediante inspección visual y cálculos matemáticos. Alternativamente, el por ciento de identidad de dos secuencias de ácidos nucleicos puede determinarse al comparar la información de las secuencias mediante el uso de un programa informático tal como, ClustalW, BLAST, FASTA o Smith-Waterman. El porcentaje de identidad para dos secuencias puede tomar diferentes valores en dependencia de: (i) el método que se usó para alinear las secuencias, por ejemplo, ClustalW, BLAST, FASTA, Smith-Waterman (que se implementa en diferentes programas) o alineación estructural de la comparación 3D; y (ii) los parámetros que se usaron por el método de alineación, por ejemplo, alineación local frente a global, la matriz de puntuación por pares que se usó (por ejemplo, BLOSUM62, PAM250, Gonnet, etc.), y la penalización por espacios, por ejemplo, forma funcional y constantes. Después de realizar la alineación, existen diferentes formas de calcular el porcentaje de identidad entre las dos secuencias. Por ejemplo, uno puede dividir el número de identidades por: (i) la longitud de la secuencia más corta; (ii) la longitud de alineación; (iii) la longitud media de la secuencia; (iv) el número de posiciones sin espacio; o (iv) el número de posiciones equivalentes que excluye salientes. Además, se apreciará que el porcentaje de identidad también depende fuertemente de la longitud. Por lo tanto, cuanto más corto sea un par de secuencias, mayor será la identidad de secuencia que uno puede esperar que ocurra al azar. El popular programa de múltiples alineamientos ClustalW (*Nucleic Acids Research* (1994) 22, 4673-4680; *Nucleic Acids Research* (1997), 24, 4876-4882) es un modo adecuado para generar múltiples alineaciones de polipéptidos o polinucleótidos. Los parámetros adecuados para ClustalW pueden ser los siguientes: Para alineaciones de polinucleótidos: Penalización por apertura de espacio = 15,0, Penalización por extensión de espacio = 6,66 y Matriz = Identidad. Para alineaciones de polipéptidos: Penalización por apertura de espacio = 10,0, Penalización por extensión de espacio = 0,2, y Matriz = Gonnet. Para alineaciones de ADN y proteínas: ENDGAP = -1, y GAPDIST = 4. Los expertos en la técnica sabrán que puede ser necesario variar estos y otros parámetros para una alineación óptima de las secuencias. Adecuadamente, el cálculo del porcentaje de identidad se calcula entonces a partir de tal alineación como (N/T), donde N es el número de posiciones en las que las secuencias comparten un residuo idéntico, y T es el número total de posiciones comparadas que incluyen espacios pero excluyen salientes.

Una "variante" significa una secuencia esencialmente similar. Una variante puede tener una función similar o una función esencialmente similar a una secuencia de tipo silvestre. Para las variantes que se describen en la presente descripción, una función similar es al menos aproximadamente 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % de la función enzimática de tipo silvestre. Para las variantes que se describen en la presente descripción, una función esencialmente similar es al menos aproximadamente 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de la función enzimática de tipo silvestre. Las variantes pueden tener una o más mutaciones favorables que dan como resultado que la enzima tenga un nivel reducido de actividad en comparación con el polipéptido de tipo silvestre. Las variantes pueden tener una o más

mutaciones favorables que dan como resultado que su actividad se desactiva (*es decir*, una inhibición del 100 % y, por lo tanto, un polipéptido no funcional). En la presente descripción se describen variantes ilustrativas que tienen una o más mutaciones favorables.

El término "planta" se refiere a cualquier planta o parte de una planta en cualquier etapa de su ciclo de vida o desarrollo, y sus progenies. En las modalidades reivindicadas, la planta es una "planta de tabaco", la cual se refiere a una planta que pertenece al género *Nicotiana*, específicamente *Nicotiana tabacum*. En la presente descripción se describen otras especies de plantas de tabaco. Adecuadamente, la planta es una planta mutante en la que la expresión de uno o más genes o la actividad de una o más proteínas se modula en comparación con una planta control. Adecuadamente, la alteración que convierte a la planta en una planta mutante resulta en la modulación de la expresión de uno o más genes o la modulación de la actividad de uno o más polipéptidos. En las modalidades reivindicadas, la alteración es una alternancia genética o una modificación genética.

Las "partes vegetales" incluyen células vegetales, protoplastos vegetales, cultivos de tejidos de células vegetales a partir de los cuales una planta completa puede regenerarse, callos vegetales, masas vegetales y células vegetales que están intactas en plantas o partes de plantas tales como embriones, polen, anteras, óvulos, semillas, hojas, flores, tallos, ramas, frutas, raíces, extremos de raíces y similares. La progenie, variantes y mutantes de plantas regeneradas también se incluyen dentro del alcance de la descripción, siempre y cuando comprendan los polinucleótidos introducidos que se describen en la presente descripción. Las hojas de plantas son particularmente adecuadas para su uso en la presente descripción.

Una "célula vegetal" se refiere a una unidad estructural y fisiológica de una planta. La célula vegetal puede estar en la forma de un protoplasto sin una pared celular, una sola célula aislada o una célula en cultivo, o como una parte de una unidad más altamente organizada, tal como, pero no se limita a, tejido vegetal, un órgano vegetal, o una planta completa.

El término "material vegetal" se refiere a cualquier composición sólida, líquida o gaseosa, o una de sus combinaciones, que se obtiene a partir de una planta, que incluye biomasa, hojas, tallos, raíces, flores o partes de flores, frutos, polen, óvulos, cigotos, semillas, esquejes, secreciones, extractos, cultivos de células o tejidos, o cualquiera de otras partes o productos de una planta. En un ejemplo, el material vegetal comprende o consiste en biomasa, tallo, semilla u hojas. En otro ejemplo, el material vegetal comprende o consiste en hojas.

El término "variedad" se refiere a una población de plantas que comparten características constantes que las separan de otras plantas de la misma especie. Mientras que poseen uno o más rasgos distintivos, una variedad se caracteriza además por una variación global muy pequeña entre los individuos dentro de esa variedad. Frecuentemente, una variedad se vende comercialmente.

El término "línea" o "línea de mejoramiento" como se usa en la presente descripción denota un grupo de plantas que se usan durante el mejoramiento de plantas. Una línea es distinguible de una variedad cuando exhibe poca variación entre los individuos para uno o más rasgos de interés, aunque puede existir cierta variación entre individuos para otros rasgos.

El término "de origen no natural" como se usa en la presente descripción describe una entidad (por ejemplo, un polinucleótido, una mutación genética, un polipéptido, una planta, y una célula vegetal y material vegetal) que no se forma naturalmente o que no existe en la naturaleza. Dichas entidades de origen no natural o entidades artificiales pueden producirse, sintetizarse, iniciarse, modificarse, intervenir, o manipularse mediante métodos que se describen en la presente descripción o que se conocen en la técnica. Dichas entidades de origen no natural o entidades artificiales pueden producirse, sintetizarse, iniciarse, modificarse, intervenir, o manipularse por el hombre. Por lo tanto, a modo de ejemplo, una planta de origen no natural, una célula vegetal de origen no natural o material vegetal de origen no natural puede producirse mediante el uso de tecnologías de manipulación genética, tales como ARN antisentido, ARN de interferencia, meganucleasa y similares. A modo de ejemplo adicional, una planta de origen no natural, una célula vegetal de origen no natural o material vegetal de origen no natural puede producirse mediante introgresión de, o al transferir una o más mutaciones genéticas (por ejemplo uno o más polimorfismos) a partir de una primera planta o célula vegetal dentro de una segunda planta o célula vegetal (la cual puede ser en sí misma de origen natural), de manera que la planta, célula vegetal o material vegetal resultantes o la progenie de estas comprende una constitución genética (por ejemplo, un genoma, un cromosoma o un segmento de estos) que no se forma naturalmente o que no existe en la naturaleza. Por lo tanto, la planta, célula vegetal o material vegetal resultantes son artificiales o de origen no natural. En consecuencia, una planta o célula vegetal artificial o de origen no natural puede producirse mediante la modificación de una secuencia genética en una primera planta o célula vegetal de origen natural, incluso si la secuencia genética resultante se produce naturalmente en una segunda planta o célula vegetal que comprende un fondo genético diferente de la primera planta o célula vegetal.

El término "modular" puede referirse a reducir, inhibir, eliminar, aumentar o afectar de cualquier otra manera la expresión o la actividad de un polipéptido. El término puede referirse, además, a reducir, inhibir, eliminar, aumentar o afectar de cualquier otra manera la actividad de un gen que codifica un polipéptido lo cual puede incluir, pero no se limita a, modular la actividad transcripcional.

El término “reducir” o “reducido”, como se usa en la presente descripción, se refiere a una reducción de aproximadamente 10 % a aproximadamente 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 % o más de una cantidad o una actividad, tal como, pero no se limita a, la actividad de un polipéptido, la actividad transcripcional y la expresión de proteínas.

El término “inhibir” o “inhibido” o “eliminar” o “eliminado” como se usa en la presente descripción, se refiere a una reducción de aproximadamente 98 % a aproximadamente 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 se limita a, la actividad de un polipéptido, la actividad y expresión transcripcional.

La transformación de una célula puede ser estable o transitoria. El término “transformación transitoria” o “transformada transitoriamente” o variaciones de estos se refiere a la introducción de uno o más polinucleótidos exógenos en una célula en ausencia de integración del polinucleótido exógeno en el genoma de la célula huésped. A diferencia del término “transformación estable” o “transformada de manera estable” se refiere a la introducción e integración de uno o más polinucleótidos exógenos en el genoma de una célula. El término “transformador estable” se refiere a una célula que integró de manera estable uno o más polinucleótidos exógenos en el ADN genómico u organelar. Debe entenderse que un organismo o su célula que se transformó con los ácidos nucleicos, constructos y/o vectores de la presente descripción pueden transformarse transitoriamente así como también de manera estable. En ciertos ejemplos, se prefiere la transformación estable.

El término “aumentar” o “aumentado” como se usa en la presente descripción, se refiere a un aumento de aproximadamente 5 % a aproximadamente 99 %, o un aumento de al menos 5 %, 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 %, al menos 100 % o más de una cantidad o una actividad, tal como, pero no se limita a, la actividad de un polipéptido, la actividad transcripcional y la expresión de proteínas.

El término “esencialmente” como se usa en la presente descripción y cuando se usa en el contexto de una cantidad significa que la cantidad es al menos aproximadamente 10 %, al menos aproximadamente 9 %, al menos aproximadamente 8 %, al menos aproximadamente 7 %, al menos aproximadamente 6 %, al menos aproximadamente 5 %, al menos aproximadamente 4 %, al menos aproximadamente 3 %, al menos aproximadamente 2 %, al menos aproximadamente 1 % o al menos aproximadamente 0,1 % de la cantidad con la que se compara.

El término “control” en el contexto de una planta control o célula vegetal control y similares significa una planta o célula vegetal en las cuales la expresión o actividad del gen o proteína de interés no se moduló y por tanto puede proporcionar una comparación o referencia con una planta o célula vegetal en las cuales se modificó la expresión o actividad de la enzima. Por lo tanto, en el contexto de la presente invención, el control no incluirá al menos una alteración genética que reduce la expresión o actividad de los HMA4(s) que se describe en la presente descripción. La planta control o célula vegetal puede comprender un vector vacío. La planta control o célula vegetal puede corresponder a una planta de tipo silvestre o célula vegetal de tipo silvestre y similares. En todos estos casos, la planta objeto y la planta control se cultivan y cosechan bajo las mismas condiciones y mediante el uso de los mismos protocolos con fines comparativos. Por lo tanto, a modo de ejemplo, la planta objeto y la planta control pueden cultivarse y cosecharse del suelo con aproximadamente los mismos niveles de contenido de metal(es) pesado(s), tal como Cd, de manera que pueden realizarse comparaciones entre los dos. Esto puede implicar que la planta objeto y la planta control se cultiven en la misma parte de un campo, por ejemplo, de manera que se expongan aproximadamente a los mismos niveles de Cd en el suelo. Los cambios en los niveles, relaciones, actividad o distribución de los genes o polipéptidos que se describen en la presente descripción, o los cambios en el fenotipo de la planta, particularmente la acumulación reducida de Cd y/o zinc pueden medirse mediante el uso de los métodos que se describen en la presente descripción mediante la comparación de una planta objeto con la planta control, adecuadamente, donde la planta objeto y la planta control se cultivaron y/o cosecharon mediante el uso de los mismos protocolos. La planta control puede proporcionar un punto de referencia para medir los cambios en el fenotipo de la planta objeto. La medición de los cambios en el fenotipo puede medirse en cualquier momento en una planta, incluso durante el desarrollo de la planta, la senescencia o después del curado. La medición de los cambios en el fenotipo puede medirse en plantas que se cultivaron bajo cualquier condición, incluso a partir de plantas que se cultivaron en cámara de cultivo, invernadero, o en un campo. Los cambios en el fenotipo pueden medirse mediante la medición del contenido de Cd y/o el contenido de zinc antes y/o durante y/o después del curado o secado mediante el uso de métodos que se conocen bien en la técnica.

El término “campo”, como se usa en la presente descripción, asume su significado normal en la técnica como un área de tierra abierta, especialmente una que puede ser o se planta con cultivos. El campo es parte del ambiente natural, en lugar de un ambiente artificial, tal como un laboratorio o un invernadero. Por lo tanto, a diferencia de un ambiente artificial, que será comúnmente un edificio o estructura artificial, el campo es parte del ambiente exterior abierto.

Como se discute en la presente descripción, la expresión o actividad de HMA(s) puede reducirse parcialmente en la planta mutante. Como se usa, en la presente descripción, el término “parcialmente reducido” significa que la expresión

o actividad de HMA(s) en la planta mutante está entre aproximadamente 1 % y 99 % menor que el nivel de expresión o actividad de HMA(s) en la planta control. Adecuadamente, la expresión o actividad de HMA(s) en la planta mutante está entre al menos aproximadamente 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % menor que el nivel de expresión o actividad de HMA(s) en la planta control. A modo de ejemplo, se espera que una mutación sin sentido que trunca una gran parte de la proteína HMA no muestre ninguna actividad enzimática, de esta manera da como resultado la pérdida completa de actividad (es decir, actividad cero). A modo de ejemplo adicional, para una mutación con cambio de sentido, la actividad enzimática puede ser la misma que la planta control, parcialmente reducida o puede no ser detectable (por ejemplo, pérdida completa o cero).

Descripción detallada

Las variantes que se aislaron del polipéptido de HMA4 (mutantes) se describen en la presente descripción que comprenden una secuencia del polipéptido que tiene al menos 65 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2 y al menos una mutación de aminoácido en comparación con las secuencias de tipo silvestre expuestas en la SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2. La SEQ ID NO:1 y la SEQ ID NO:2 son secuencias no mutadas. La SEQ ID NO:1 y la SEQ ID NO:2 corresponden a la secuencia de aminoácidos de la ATPasa de metales pasados de *Nicotiana tabacum* (NtHMA4.1) núm. de acceso de GenBank: CCQ77798 y la secuencia de aminoácidos de la ATPasa de metales pasados de *Nicotiana tabacum* (NtHMA4.2) núm. de acceso de GenBank: CCW03243.1, respectivamente. Adecuadamente, el polipéptido aislado comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que tiene al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % o 100 % de identidad de secuencia con el mismo y al menos una mutación de aminoácido. Ciertas plantas, tales como *N. tabacum*, contienen dos homeólogos de HMA4 que se denominan en la presente descripción HMA4.1 y HMA4.2.

En una planta, célula vegetal o material vegetal y similares, la función o actividad de los polipéptidos mutantes se modula, reduce, parcialmente inactiva, inhibe, elimina, desactiva o pierde. En un ejemplo, la función o actividad de un polipéptido mutante puede inhibirse, eliminarse, desactivarse o perderse de manera que la actividad del polipéptido no es detectable. En un ejemplo, la función o actividad de dos polipéptidos mutantes (por ejemplo, polipéptidos codificados por los homeólogos del mismo gen) pueden inhibirse, eliminarse, desactivarse o perderse de manera que la actividad del polipéptido no es detectable.

En otro ejemplo, la función o actividad de un polipéptido mutante (por ejemplo, un homeólogo de un gen) se pierde, inhibe o elimina de manera que la actividad del polipéptido no es detectable y la función o actividad de otro polipéptido mutante (por ejemplo, un segundo homeólogo del gen) se reduce o se reduce parcialmente de manera que la actividad del polipéptido de HMA es menor en comparación con un polipéptido de HMA de control pero aún es detectable. Una combinación de mutaciones ilustrativas de este tipo es el mutante doble homocigótico G251D /Q561*, en donde la mutación G251D reduce parcialmente la actividad de NtHMA4.1 (SEQ ID NO:1) y la mutación Q561* desactiva, inhibe o elimina la actividad de NtHMA4.2 (SEQ ID NO:2). Ya sea la actividad de la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO:2 se reduce parcialmente y la actividad de la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO:2 se pierde, inhibe o elimina siempre y cuando la actividad de uno de los polipéptidos de HMA4 se reduzca parcialmente y se pierda la actividad de uno de los HMA. Ya sea la actividad de la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO:2 puede reducirse parcialmente y la actividad de la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO:2 puede perderse, inhibirse o eliminarse siempre y cuando la actividad de uno de los polipéptidos de HMA4 se reduzca parcialmente y se pierda la actividad de uno de los HMA.

Adecuadamente, al menos uno de los HMA está completamente desactivado y al menos uno de los HMA comprende una mutación sin sentido o una mutación con cambio de sentido que se ubica en el dominio A, en el motivo DKTGT del dominio P o en el locus HP del dominio N.

En una planta, célula vegetal o material vegetal y similares, la actividad de NtHMA4.1 (SEQ ID NO:1) y NtHMA4.2 (SEQ ID NO:2) puede perderse, inhibirse o eliminarse en comparación con una planta control. Una combinación de mutaciones ilustrativas de este tipo es el mutante doble homocigótico Q293*/Q561*, en donde la mutación Q293* desactiva, inhibe o elimina la actividad de NtHMA4.1 (SEQ ID NO:1) y la mutación Q561* desactiva, inhibe o elimina la actividad de NtHMA4.2 (SEQ ID NO:2). Otros mutantes ilustrativos se describen en las Tablas 4 y 5. Se contemplan combinaciones o mezclas de las variantes (mutantes) de los polipéptidos HMA4.1 y HMA4.2 y polinucleótidos como se describe en la presente descripción.

Para todas las combinaciones, se contempla la misma combinación en el otro homeólogo, respectivamente. Por ejemplo, se contempla la combinación HMA4.1 E296K/ HMA4.2 Q561* y la combinación HMA4.1 Q561*/ HMA4.2 E296K.

Adecuadamente, las variantes de polipéptido de HMA4 provocan que la planta en la que se contienen muestre al menos aproximadamente un 27 %, 33 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 % o 95 % o más reducción de Cd en comparación con el control.

También se contemplan los fragmentos de las variantes de polipéptidos con la condición de que porten una o más de la(s) mutaciones(s) de aminoácidos. Los fragmentos de variantes de polipéptidos pueden variar de al menos aproximadamente 25 aminoácidos, aproximadamente 50 aminoácidos, aproximadamente 75 aminoácidos,

aproximadamente 100 aminoácidos aproximadamente 150 aminoácidos, aproximadamente 200 aminoácidos, aproximadamente 250 aminoácidos, aproximadamente 300 aminoácidos, aproximadamente 400 aminoácidos, aproximadamente 500 aminoácidos, aproximadamente 600 aminoácidos o hasta el polipéptido de longitud completa.

Las variantes pueden producirse mediante la introducción de cualquier tipo de alteraciones (por ejemplo, inserciones, deleciones, o sustituciones de aminoácidos; cambios en los estados de glicosilación; cambios que afectan el repliegamiento o las isomerizaciones, las estructuras tridimensionales o los estados de autoasociación), siempre y cuando el polipéptido mutante provoque que la planta en la que se expresa muestre al menos una reducción en la acumulación de Cd como se describe en la presente descripción.

Las variantes de polipéptidos incluyen mutantes que se producen mediante la introducción de cualquier tipo de alteraciones (por ejemplo, inserciones, deleciones, o sustituciones de aminoácidos; cambios en estados de glicosilación; cambios que afectan el repliegamiento o las isomerizaciones, estructuras tridimensionales, o estados de autoasociación), las que pueden modificarse genéticamente deliberadamente o aislarse de manera natural. Las sustituciones de aminoácidos deliberadas pueden realizarse sobre la base de la similitud en polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad y la naturaleza anfipática de los residuos siempre y cuando se retenga la actividad de unión secundaria de la sustancia. Por ejemplo, los aminoácidos cargados negativamente incluyen ácido aspártico y ácido glutámico; los aminoácidos cargados positivamente incluyen lisina y arginina; y los aminoácidos con grupos principales polares no cargados que tienen valores de hidrofiliidad similar incluyen leucina, isoleucina, valina, glicina, alanina, asparagina, glutamina, serina, treonina, fenilalanina, y tirosina. Las sustituciones conservadoras pueden realizarse, por ejemplo de conformidad con la Tabla más abajo. Los aminoácidos en el mismo bloque en la segunda columna y adecuadamente en la misma línea en la tercera columna pueden sustituirse entre sí:

ALIFÁTICO	No polar	Gly Ala Pro
		Ile Leu Val
	Polar - sin carga	Cys Ser Thr Met
		Asn Gly
	Polar - cargado	Asp Glu
		Lys Arg
AROMÁTICO		His Phe Trp Tyr

Un tipo adecuado de mutación es una mutación con cambio de sentido que es una mutación puntual en la que un único cambio de nucleótido resulta en un codón que codifica un aminoácido diferente. Las mutaciones con cambio de sentido pueden ser particularmente efectivas para inactivar parcialmente (por ejemplo, reducir) un polipéptido de HMA4, tal como HMA4.1 o HMA4.2.

Otro tipo adecuado de mutación es una mutación sin sentido que es una mutación puntual en la que un único cambio de nucleótido resulta en un codón de parada prematura o un codón sin sentido en el ARNm transcrito y un polipéptido de HMA4 truncado, incompleto y no funcional, tal como HMA4.1 o HMA4.2. Las mutaciones sin sentido pueden ser particularmente efectivas para inhibir o eliminar o desactivar la actividad de un polipéptido de HMA4, tal como HMA4.1 o HMA4.2.

Como se describe en la presente descripción, la expresión o actividad de uno de HMA4.1 o HMA4.2 se reduce al menos parcialmente y la expresión o actividad del otro HMA4.1 o HMA4.2 se pierde, se elimina o se reduce en comparación con una planta control en ciertos ejemplos. En un ejemplo, la expresión o actividad de uno de HMA4.1 o HMA4.2 se reduce parcialmente a través del uso de una mutación puntual sin sentido y la expresión o actividad del otro HMA4.1 o HMA4.2 se pierde, elimina o reduce a través del uso de una mutación puntual sin sentido.

Adecuadamente, las mutaciones que se describen en la presente descripción son mutaciones heterocigóticas u homocigóticas. Adecuadamente, las mutaciones que se describen en la presente descripción son mutaciones homocigóticas.

La(s) mutación(es) pueden ubicarse, por ejemplo, en una región reguladora de HMA4.1 o HMA4.2 o en la secuencia codificante de HMA4.1 o HMA4.2. En ciertos ejemplos, la(s) mutación(es) se ubican en la secuencia codificante de HMA4.1 o HMA4.2.

El polipéptido de HMA4 comprende varios dominios que se describen en la Tabla 7.

Para las combinaciones de mutantes que se describen en la presente descripción, la misma combinación puede incluirse en el otro homeólogo, respectivamente.

La expresión o actividad de al menos dos ATPasas de metales pesados (HMA) se reduce parcialmente de manera que una planta mutante o parte de esta que contiene las HMA exhibe al menos una reducción del 27 %, en comparación con la planta control, en la acumulación de cadmio en la hoja cuando la planta mutante se cultiva en el campo en presencia de cadmio de origen natural o de origen no natural. La expresión o actividad de una de las HMA

puede reducirse o perderse parcialmente y la expresión o actividad de la otra HMA puede perderse en comparación con una planta control.

- 5 Adecuadamente, la variante de polipéptido de HMA4 puede comprender al menos una mutación en una posición que corresponde a una posición de aminoácidos en el dominio A del polipéptido de HMA codificado por la SEQ ID NO: 3 y al menos una mutación en una posición que corresponde a una posición de aminoácidos en el lazo del dominio P/N del polipéptido de HMA codificado por la SEQ ID NO: 4.
- 10 Adecuadamente, la variante de polipéptido de HMA4 puede comprender al menos una mutación en una posición que corresponde a una posición de aminoácidos en el dominio A del polipéptido de HMA codificado por la SEQ ID NO: 4 y al menos una mutación en una posición que corresponde a una posición de aminoácidos en el lazo del dominio P/N del polipéptido de HMA codificado por la SEQ ID NO: 3.
- 15 Más adecuadamente, la variante comprende al menos una mutación en una posición que corresponde a las posiciones de los aminoácidos 251 a 296 del dominio A del polipéptido de HMA codificado por la SEQ ID NO: 3 y al menos una mutación en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 561 del lazo del dominio P/N del polipéptido de HMA codificado por la SEQ ID NO: 4.
- 20 Más adecuadamente, la variante comprende al menos una mutación en una posición que corresponde a las posiciones de los aminoácidos 251 a 296 del dominio A del polipéptido de HMA codificado por la SEQ ID NO: 4 y al menos una mutación en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 561 del lazo del dominio P/N del polipéptido de HMA codificado por la SEQ ID NO: 3.
- 25 Más adecuadamente, la variante comprende al menos una mutación en una posición que corresponde a la posición de los aminoácidos 251 o 293 o 296 del dominio A del polipéptido de HMA codificado por la SEQ ID NO: 3 y al menos una mutación en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 561 del lazo del dominio P/N del polipéptido de HMA codificado por la SEQ ID NO: 4.
- 30 Más adecuadamente, la variante comprende al menos una mutación en una posición que corresponde a la posición de los aminoácidos 251 o 293 o 296 del dominio A del polipéptido de HMA codificado por la SEQ ID NO: 4 y al menos una mutación en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 561 del lazo del dominio P/N del polipéptido de HMA codificado por la SEQ ID NO: 3.
- 35 Adecuadamente, la planta comprende al menos una mutación en una posición que corresponde a una posición de aminoácidos en el dominio A del polipéptido de HMA codificado por la SEQ ID NO: 3 y al menos una mutación en una posición que corresponde a una posición de aminoácidos en el dominio A del polipéptido de HMA codificado por la SEQ ID NO: 4.
- 40 Adecuadamente, la planta comprende al menos una mutación en una posición que corresponde a una posición de aminoácidos en el dominio A del polipéptido de HMA codificado por la SEQ ID NO: 4 y al menos una mutación en una posición que corresponde a una posición de aminoácidos en el dominio A del polipéptido de HMA codificado por la SEQ ID NO: 3.
- 45 Más adecuadamente, la variante comprende al menos una mutación en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 293 del dominio A del polipéptido de HMA codificado por la SEQ ID NO: 3 y al menos una mutación en una posición que corresponde a la posición de los aminoácidos 223 a 265 del dominio A del polipéptido de HMA codificado por la SEQ ID NO: 4.
- 50 Más adecuadamente, la variante comprende al menos una mutación en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 293 del dominio A del polipéptido de HMA codificado por la SEQ ID NO: 4 y al menos una mutación en una posición que corresponde a la posición de los aminoácidos 223 a 265 del dominio A del polipéptido de HMA codificado por la SEQ ID NO: 3.
- 55 Más adecuadamente, la variante comprende al menos una mutación en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 293 del dominio A del polipéptido de HMA codificado por la SEQ ID NO: 3 y al menos una mutación en una posición que corresponde a la posición de los aminoácidos 223 o 234 o 235 o 265 del dominio N del dominio A del polipéptido de HMA codificado por la SEQ ID NO: 4.
- 60 Más adecuadamente, la variante comprende al menos una mutación en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 293 del dominio A del polipéptido de HMA codificado por la SEQ ID NO: 4 y al menos una mutación en una posición que corresponde a la posición de los aminoácidos 223 o 234 o 235 o 265 del dominio N del dominio A del polipéptido de HMA codificado por la SEQ ID NO: 3.
- 65 Adecuadamente, la variante comprende al menos una mutación en una posición que corresponde a una posición de aminoácidos en el lazo del dominio P/N del polipéptido de HMA codificado por la SEQ ID NO: 3 y al menos una

mutación en una posición que corresponde a una posición de aminoácidos en el dominio P/N del polipéptido de HMA codificado por la SEQ ID NO: 4.

- 5 Adecuadamente, la variante comprende al menos una mutación en una posición que corresponde a una posición de aminoácidos en el lazo del dominio P/N del polipéptido de HMA codificado por la SEQ ID NO: 4 y al menos una mutación en una posición que corresponde a una posición de aminoácidos en el dominio P/N del polipéptido de HMA codificado por la SEQ ID NO: 3.
- 10 Más adecuadamente, la variante comprende al menos una mutación en una posición que corresponde a la posición de los aminoácidos 402 a 464 del lazo del dominio P/N del polipéptido de HMA codificado por la SEQ ID NO: 3 y al menos una mutación en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 561 del dominio P/N del polipéptido de HMA codificado por la SEQ ID NO: 4.
- 15 Más adecuadamente, la variante comprende al menos una mutación en una posición que corresponde a la posición de los aminoácidos 402 a 464 del lazo del dominio P/N del polipéptido de HMA codificado por la SEQ ID NO: 4 y al menos una mutación en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 561 del dominio P/N del polipéptido de HMA codificado por la SEQ ID NO: 3.
- 20 Más adecuadamente, la variante comprende al menos una mutación en una posición que corresponde a la posición de los aminoácidos 402 o 464 del dominio P del tercer lazo del polipéptido de HMA codificado por la SEQ ID NO: 3 y al menos una mutación en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 561 del dominio P/N del polipéptido de HMA codificado por la SEQ ID NO: 4.
- 25 Más adecuadamente, la variante comprende al menos una mutación en una posición que corresponde a la posición de los aminoácidos 402 o 464 del dominio P del tercer lazo del polipéptido de HMA codificado por la SEQ ID NO: 4 y al menos una mutación en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 561 del dominio P/N del polipéptido de HMA codificado por la SEQ ID NO: 3.
- 30 Adecuadamente, la variante comprende al menos una mutación en una posición que corresponde a una posición de aminoácidos en el lazo del dominio P/N del polipéptido de HMA codificado por la SEQ ID NO: 3 y al menos una mutación en una posición que corresponde a una posición de aminoácidos en el dominio A del polipéptido de HMA codificado por la SEQ ID NO: 4.
- 35 Adecuadamente, la variante comprende al menos una mutación en una posición que corresponde a una posición de aminoácidos en el lazo del dominio P/N del polipéptido de HMA codificado por la SEQ ID NO: 4 y al menos una mutación en una posición que corresponde a una posición de aminoácidos en el dominio A del polipéptido de HMA codificado por la SEQ ID NO: 3.
- 40 Más adecuadamente, la variante comprende al menos una mutación en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 438 del lazo del dominio P/N codificado por la SEQ ID NO: 3 y al menos una mutación en la posición del aminoácido 265 en el dominio A del polipéptido de HMA codificado por la SEQ ID NO: 4.
- 45 Más adecuadamente, la variante comprende al menos una mutación en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 438 del lazo del dominio P/N codificado por la SEQ ID NO: 4 y al menos una mutación en la posición del aminoácido 265 en el dominio A del polipéptido de HMA codificado por la SEQ ID NO: 3.
- 50 Adecuadamente, la variante comprende una o más de las mutaciones que se seleccionan del grupo que consiste en: (i) una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 293 de la SEQ ID NO:1 y una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 561 de la SEQ ID NO:2, adecuadamente, en donde las mutaciones son Q293* y Q561*, en donde * denota un codón de parada; (ii) una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 293 de la SEQ ID NO:1 y una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 265 de la SEQ ID NO:2, adecuadamente, en donde las mutaciones son Q293* y W265*, en donde * denota un codón de parada; (iii) una mutación con cambio de sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 296 de la SEQ ID NO:1 y una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 561 de la SEQ ID NO:2, adecuadamente, en donde las mutaciones son E296K y Q561*, en donde * denota un codón de parada; (iv) una mutación con cambio de sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 402 de SEQ ID NO:1 y una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 561 de SEQ ID NO:2, adecuadamente, en donde las mutaciones son T402I y Q561*, en donde * denota un codón de parada; (v) una mutación con cambio de sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 251 de la SEQ ID NO:1 y una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 561 de la SEQ ID NO:2, adecuadamente, en donde las mutaciones son G251D y Q561*, en donde * denota un codón de parada; (vi) una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 464 de la SEQ ID NO:1 y una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 561 de la SEQ ID NO:2, adecuadamente, en donde las mutaciones son Q464* y Q561*, en donde * denota un codón de parada; (vii) una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 293 de la SEQ ID NO:1 y una
- 65

mutación con cambio de sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 223 de una secuencia no mutada que se expone en la SEQ ID NO:2, adecuadamente, en donde las mutaciones son Q293* y L223F, en donde * denota un codón de parada; (viii) una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 293 de la SEQ ID NO:1 y una mutación con cambio de sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 234 de una secuencia no mutada que se expone en la SEQ ID NO:2, adecuadamente, en donde las mutaciones son Q293* y D234N, en donde * denota un codón de parada; (ix) una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 293 de la SEQ ID NO:1 y una mutación con cambio de sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 235 de una secuencia no mutada que se expone en la SEQ ID NO:2, adecuadamente, en donde las mutaciones son Q293* y G235E, en donde * denota un codón de parada; o (x) una mutación con cambio de sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 438 de la SEQ ID NO:1 y una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 265 de una secuencia no mutada que se expone en la SEQ ID NO:2, adecuadamente, en donde las mutaciones son H438Y y W265*, en donde * denota un codón de parada.

Adecuadamente, la variante comprende una o más de las mutaciones que se seleccionan del grupo que consiste en: (i) una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 293 de la SEQ ID NO:2 y una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 561 de la SEQ ID NO:1, adecuadamente, en donde las mutaciones son Q293* y Q561*, en donde * denota un codón de parada; (ii) una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 293 de la SEQ ID NO:2 y una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 265 de la SEQ ID NO:1, adecuadamente, en donde las mutaciones son Q293* y W265*, en donde * denota un codón de parada; (iii) una mutación con cambio de sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 296 de la SEQ ID NO:2 y una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 561 de la SEQ ID NO:1, adecuadamente, en donde las mutaciones son E296K y Q561*, en donde * denota un codón de parada; (iv) una mutación con cambio de sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 402 de la SEQ ID NO:2 y una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 561 de la SEQ ID NO:1, adecuadamente, en donde las mutaciones son T402I y Q561*, en donde * denota un codón de parada; (v) una mutación con cambio de sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 251 de la SEQ ID NO:2 y una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 561 de la SEQ ID NO:1, adecuadamente, en donde las mutaciones son G251D y Q561*, en donde * denota un codón de parada; (vi) una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 464 de la SEQ ID NO:2 y una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 561 de la SEQ ID NO:1, adecuadamente, en donde las mutaciones son Q464* y Q561*, en donde * denota un codón de parada; (vii) una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 293 de la SEQ ID NO:2 y una mutación con cambio de sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 223 de una secuencia no mutada que se expone en la SEQ ID NO:1, adecuadamente, en donde las mutaciones son Q293* y L223F, en donde * denota un codón de parada; (viii) una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 293 de la SEQ ID NO:2 y una mutación con cambio de sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 234 de una secuencia no mutada que se expone en la SEQ ID NO:1, adecuadamente, en donde las mutaciones son Q293* y D234N, en donde * denota un codón de parada; (ix) una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 293 de la SEQ ID NO:2 y una mutación con cambio de sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 235 de una secuencia no mutada que se expone en la SEQ ID NO:1, adecuadamente, en donde las mutaciones son Q293* y G235E, en donde * denota un codón de parada; o (x) una mutación con cambio de sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 438 de la SEQ ID NO:2 y una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 265 de una secuencia no mutada que se expone en la SEQ ID NO:1, adecuadamente, en donde las mutaciones son H438Y y W265*, en donde * denota un codón de parada.

Se contempla que cualquiera de las mutaciones sin sentido puede combinarse con cualquiera de las mutaciones con cambio de sentido que se describen en la presente descripción.

Un resumen de los datos que se obtienen mediante el uso de plantas que contienen las variantes mencionadas anteriormente cuando se cultivan afuera en el campo se expone en la Tabla 4, 5 y 6. Las plantas que comprenden el mutante doble Q293*/Q561* o Q293*/W265* o Q464*/Q561* o Q293*/G235E o E296K/Q561* o T402I/Q561* exhiben alrededor de un 80-96 % de reducción de Cd. Las plantas que comprenden el mutante doble G251D/Q561* exhiben alrededor de una reducción de Cd del 33-70 %. Las plantas que comprenden el mutante doble Q293*/L223F o Q293*/D234N exhiben una reducción de Cd de alrededor del 27-37 %. En una etapa temprana y bajo ciertas condiciones se observa un retraso en el desarrollo de las plantas para los mutantes dobles Q293*/Q561* o Q293*/W265* o Q464*/Q561* o Q293*/G235E o E296K/Q561* o T402I/Q561*. Sin embargo, en el tiempo de cosecha, no pueden observarse diferencias fenotípicas claras entre cada uno de los mutantes y el control. G251D/Q561* muestra un crecimiento y desarrollo normales. Aunque Q293*/Q561* o Q293*/W265* o Q464*/Q561* o E296K/Q561* o Q293*/G235E podrían mostrar lesiones necróticas en sus hojas en una etapa temprana, en dependencia de las condiciones ambientales, la presencia de lesiones necróticas no se observa en la mayoría de las condiciones en el tiempo de cosecha en el campo. Las otras combinaciones de mutaciones que se probaron (G382R/Q561*, V351M/Q561*, A188V/Q561*, Q293*/A369V, Q293*/A374V, T189I/Q561*, Q293*/S27L, Q293*/A188V, G128E/Q561*) no conducen a una reducción significativa o superior al 20 % de Cd. Adecuadamente, en ciertas modalidades, el

mutante doble no es G382R/Q561* o V351M/Q561* o A188V/Q561* o Q293*/A369V o Q293*/A374V o T189I/Q561* o Q293*/S27L o Q293*/A188V o G128E/Q561*.

Los datos para algunos de estos mutantes dobles cuando se cultivan en el invernadero se muestran en la Tabla 8. Como puede observarse a partir de una comparación de la Tabla 4 (ensayo de campo) y la Tabla 8 (invernadero), el nivel de reducción de Cd para varias combinaciones de mutaciones generalmente se corresponden entre sí.

Se probaron mutantes dobles adicionales en el invernadero. Los resultados de estos datos se presentan en la Tabla 9. En vista del acuerdo general sobre el nivel de reducción de Cd para los mutantes dobles que se presentan en las Tablas 4 y 8 para los datos de campo y los datos de invernadero, se predice que los datos de invernadero que se presentan en la Tabla 9 también corresponderán generalmente a los resultados que se obtendrán en el campo. La combinación de mutaciones H438Y/W265* se probó bajo condiciones de invernadero solo donde dio lugar a una reducción de Cd de alrededor del 58 %; no se observaron cambios fenotípicos (Tabla 9).

En ciertas modalidades, se prefieren los mutantes dobles Q293*/Q561* o Q293*/W265* o E296K/Q561* o T402I/Q561* o Q464*/Q561* o Q293*/G235E porque exhiben aproximadamente un 80 % o más de reducción de Cd en el campo. En una modalidad de esta combinación preferida, la planta mutante o parte de esta comprende una o más de las mutaciones que se seleccionan del grupo que consiste en: (i) una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 293 de la SEQ ID NO:1 y una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 561 de la SEQ ID NO:2, adecuadamente, en donde las mutaciones son Q293* y Q561*, en donde * denota un codón de parada; (ii) una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 293 de la SEQ ID NO:1 y una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 265 de la SEQ ID NO:2, adecuadamente, en donde las mutaciones son Q293* y W265*, en donde * denota un codón de parada; (iii) una mutación con cambio de sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 296 de la SEQ ID NO:1 y una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 561 de la SEQ ID NO:2, adecuadamente, en donde las mutaciones son E296K y Q561*, en donde * denota un codón de parada; (iv) una mutación con cambio de sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 402 de la SEQ ID NO:1 y una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 561 de la SEQ ID NO:2, adecuadamente, en donde las mutaciones son T402I y Q561*, en donde * denota un codón de parada; (v) una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 464 de la SEQ ID NO:1 y una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 561 de la SEQ ID NO:2, adecuadamente, en donde las mutaciones son Q464* y Q561*, en donde * denota un codón de parada; (vi) una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 293 de la SEQ ID NO:1 y una mutación con cambio de sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 235 de la SEQ ID NO:2, adecuadamente, en donde las mutaciones son Q293* y G235E, en donde * denota un codón de parada.

En una modalidad de esta combinación preferida, la planta mutante o parte de esta comprende una o más de las mutaciones que se seleccionan del grupo que consiste en: (i) una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 293 de la SEQ ID NO:2 y una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 561 de la SEQ ID NO:1, adecuadamente, en donde las mutaciones son Q293* y Q561*, en donde * denota un codón de parada; (ii) una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 293 de la SEQ ID NO:2 y una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 265 de la SEQ ID NO:1, adecuadamente, en donde las mutaciones son Q293* y W265*, en donde * denota un codón de parada; (iii) una mutación con cambio de sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 296 de la SEQ ID NO:2 y una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 561 de la SEQ ID NO:1, adecuadamente, en donde las mutaciones son E296K y Q561*, en donde * denota un codón de parada; (iv) una mutación con cambio de sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 402 de la SEQ ID NO:2 y una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 561 de la SEQ ID NO:1, adecuadamente, en donde las mutaciones son T402I y Q561*, en donde * denota un codón de parada; (v) una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 464 de la SEQ ID NO:2 y una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 561 de la SEQ ID NO:1, adecuadamente, en donde las mutaciones son Q464* y Q561*, en donde * denota un codón de parada; (vi) una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 293 de la SEQ ID NO:2 y una mutación con cambio de sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 235 de la SEQ ID NO:1, adecuadamente, en donde las mutaciones son Q293* y G235E, en donde * denota un codón de parada.

En ciertas modalidades, se prefieren los mutantes dobles G251D/Q561* o H438Y/W265* o Q293*/L223F o Q293*/D234N (por ejemplo, para su introducción en plantas, tales como tabaco, por ejemplo, tabaco Burley) porque exhiben una reducción de Cd del 27-70 % y probablemente no interfieran con el crecimiento. En una modalidad de esta combinación preferida, la planta mutante o parte de esta comprende una o más de las mutaciones que se seleccionan del grupo que consiste en: (i) una mutación con cambio de sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 251 de la SEQ ID NO:1 y una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 561 de la SEQ ID NO:2, adecuadamente, en donde las mutaciones son G251D y Q561*, en donde * denota un codón de parada; (ii) una mutación con cambio de sentido en una posición que corresponde a la

posición del aminoácido 438 de la SEQ ID NO:1 y una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 265 de la SEQ ID NO:2, adecuadamente, en donde las mutaciones son H438Y y W265*, en donde * denota un codón de parada; (iii) una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 293 de la SEQ ID NO:1 y una mutación con cambio de sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 223 de la SEQ ID NO:2, adecuadamente, en donde las mutaciones son Q293* y L223F, en donde * denota un codón de parada; (iv) una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 293 de la SEQ ID NO:1 y una mutación con cambio de sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 234 de la SEQ ID NO:2, adecuadamente, en donde las mutaciones son Q293* y D234N, en donde * denota un codón de parada.

En una modalidad de esta combinación preferida, la planta mutante o parte de esta comprende una o más de las mutaciones que se seleccionan del grupo que consiste en: (i) una mutación con cambio de sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 251 de la SEQ ID NO:2 y una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 561 de la SEQ ID NO:1, adecuadamente, en donde las mutaciones son G251D y Q561*, en donde * denota un codón de parada; (ii) una mutación con cambio de sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 438 de la SEQ ID NO:2 y una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 265 de la SEQ ID NO:1, adecuadamente, en donde las mutaciones son H438Y y W265*, en donde * denota un codón de parada; (iii) una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 293 de la SEQ ID NO:2 y una mutación con cambio de sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 223 de la SEQ ID NO:1, adecuadamente, en donde las mutaciones son Q293* y L223F, en donde * denota un codón de parada; (iv) una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 293 de la SEQ ID NO:2 y una mutación con cambio de sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 234 de la SEQ ID NO:1, adecuadamente, en donde las mutaciones son Q293* y D234N, en donde * denota un codón de parada.

En ciertas modalidades, se prefiere el mutante doble T402I/Q561* ya que exhibe una reducción de Cd de alrededor del 90 % y una morfología aceptable incluso en la etapa de crecimiento temprano. Por lo tanto, de conformidad con esta modalidad, la planta mutante o parte de esta comprende una mutación con cambio de sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 402 de la SEQ ID NO:1 y una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 561 de la SEQ ID NO:2, adecuadamente, en donde las mutaciones son T402I y Q561*, en donde * denota un codón de parada.

También se contemplan combinaciones de las mutaciones que se describen en la presente descripción. En particular, se contemplan diferentes combinaciones de cada una de las mutaciones únicas en los mutantes dobles. Ejemplos de tales combinaciones se muestran en las Tablas 11 y 12 y se describen más abajo.

En una modalidad, la variante comprende al menos una mutación en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 464 del dominio P del tercer lazo del polipéptido de HMA codificado por la SEQ ID NO: 3 y al menos una mutación en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 265 del segundo lazo citoplasmático del dominio A del polipéptido de HMA codificado por la SEQ ID NO: 4.

En una modalidad, la variante comprende al menos una mutación en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 464 del dominio P del tercer lazo del polipéptido de HMA codificado por la SEQ ID NO: 4 y al menos una mutación en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 265 del segundo lazo citoplasmático del dominio A del polipéptido de HMA codificado por la SEQ ID NO: 3.

En una modalidad, la variante comprende al menos una mutación en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 464 del dominio P del tercer lazo del polipéptido de HMA codificado por la SEQ ID NO: 3 y al menos una mutación en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 223 del segundo lazo citoplasmático del dominio A del polipéptido de HMA codificado por la SEQ ID NO: 4.

En una modalidad, la variante comprende al menos una mutación en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 464 del dominio P del tercer lazo del polipéptido de HMA codificado por la SEQ ID NO: 4 y al menos una mutación en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 223 del segundo lazo citoplasmático del dominio A del polipéptido de HMA codificado por la SEQ ID NO: 3.

En una modalidad, la variante comprende al menos una mutación en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 464 del dominio P del tercer lazo del polipéptido de HMA codificado por la SEQ ID NO: 3 y al menos una mutación en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 234 del segundo lazo citoplasmático del dominio A del polipéptido de HMA codificado por la SEQ ID NO: 4.

En una modalidad, la variante comprende al menos una mutación en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 464 del dominio P del tercer lazo del polipéptido de HMA codificado por la SEQ ID NO: 4 y al menos una mutación en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 234 del segundo lazo citoplasmático del dominio A del polipéptido de HMA codificado por la SEQ ID NO: 3.

posición que corresponde a la posición del aminoácido 402 de la SEQ ID NO:2 y una mutación con cambio de sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 234 de la SEQ ID NO:1, adecuadamente, en donde las mutaciones son T402I y D234N; (xii) una mutación con cambio de sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 402 de la SEQ ID NO:2 y una mutación con cambio de sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 235 de la SEQ ID NO:1, adecuadamente, en donde las mutaciones son T402I y G235E; (xiii) una mutación con cambio de sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 251 de la SEQ ID NO:2 y una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 265 de la SEQ ID NO:1, adecuadamente, en donde las mutaciones son G251D y W265*, en donde * denota un codón de parada; (xiv) una mutación con cambio de sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 251 de la SEQ ID NO:2 y una mutación con cambio de sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 223 de la SEQ ID NO:1, adecuadamente, en donde las mutaciones son G251D y L223F; (xv) una mutación con cambio de sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 234 de la SEQ ID NO:1, adecuadamente, en donde las mutaciones son G251D y D234N; (xvi) una mutación con cambio de sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 251 de la SEQ ID NO:2 y una mutación con cambio de sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 235 de la SEQ ID NO:1, adecuadamente, en donde las mutaciones son G251D y G235E; (xvii) una mutación con cambio de sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 438 de la SEQ ID NO:2 y una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 561 de la SEQ ID NO:1, adecuadamente, en donde las mutaciones son H438Y y Q561*, en donde * denota un codón de parada; (xviii) una mutación con cambio de sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 438 de la SEQ ID NO:2 y una mutación con cambio de sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 223 de la SEQ ID NO:1, adecuadamente, en donde las mutaciones son H438Y y L223F, en donde * denota un codón de parada; (xix) una mutación con cambio de sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 438 de la SEQ ID NO:2 y una mutación con cambio de sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 234 de la SEQ ID NO:1, adecuadamente, en donde las mutaciones son H438Y y D234N, en donde * denota un codón de parada; o (xx) una mutación con cambio de sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 438 de la SEQ ID NO:2 y una mutación con cambio de sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 235 de la SEQ ID NO:1, adecuadamente, en donde las mutaciones son H438Y y G235E, en donde * denota un codón de parada.

Un polinucleótido como se describe en la presente descripción contendrá generalmente enlaces fosfodiéster, aunque en algunos casos, se incluyen análogos de polinucleótidos que pueden tener cadenas principales alternativas, que comprenden, por ejemplo, enlaces fosforamidato, fosforotioato, fosforoditioato, u O-metilfosforoamidita; y cadenas principales y enlaces de polinucleótidos peptídicos. Otros análogos de polinucleótidos incluyen los que tienen cadenas principales positivas; cadenas principales no iónicas, y cadenas principales sin ribosa. Las modificaciones de la cadena principal de ribosa-fosfato pueden realizarse por una variedad de razones, por ejemplo, para aumentar la estabilidad y el tiempo de vida media de tales moléculas en ambientes fisiológicos o como sondas en un biochip. Pueden obtenerse mezclas de polinucleótidos y análogos de origen natural; alternativamente, mezclas de diferentes análogos de polinucleótidos, y pueden obtenerse mezclas de polinucleótidos y análogos de origen natural.

Las variantes aisladas de polinucleótidos de HMA4 (mutantes) se describen en la presente descripción comprenden una secuencia de polinucleótidos que tiene al menos 65 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:3 o la SEQ ID NO:4 y al menos una mutación de nucleótidos en comparación con las secuencias de tipo silvestre expuestas en la SEQ ID NO:3 o la SEQ ID NO:4. La SEQ ID NO:3 y la SEQ ID NO:4 son secuencias no mutadas. La SEQ ID NO:3 y la SEQ ID NO:4 corresponden a la secuencia de polinucleótidos de la ATPasa de metales pesados de *Nicotiana tabacum*(*NtHMA4.1*) núm. de acceso de GenBank: HF675181.1 y la ATPasa de metales pesados de *Nicotiana tabacum*(*NtHMA4.2*) núm. de acceso de GenBank: HF937054.1, respectivamente. Adecuadamente, el polinucleótido aislado comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que tiene al menos 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 85 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % o 100 % de identidad de secuencia con el mismo y al menos una mutación de nucleótido.

Adecuadamente, la planta comprende al menos una mutación en cada una de las SEQ ID NO:3 y SEQ NO:4 y/o un fragmento de gen que interfiere con la traducción de un transcrito de ARN que codifica las HMA expuestas en (ii), adecuadamente, donde en la mutación es una mutación con cambio de sentido o una mutación sin sentido.

Se conoce una variedad de análogos de polinucleótidos, que incluye, por ejemplo, enlaces fosforamidato, fosforotioato, fosforoditioato, O-metilfosforoamidita y cadenas principales y enlaces de polinucleótidos peptídicos. Otros análogos de polinucleótidos incluyen los que tienen cadenas principales positivas, cadenas principales no iónicas y cadenas principales sin ribosa. Se incluyen además polinucleótidos que contienen uno o más azúcares carbocíclicos.

Los parámetros básicos que afectan la elección de las condiciones de hibridación para los polinucleótidos y la guía para idear las condiciones adecuadas se describen por Sambrook y otros, 1989. Mediante el uso del conocimiento del código genético en combinación con las secuencias de aminoácidos que se describen en la presente descripción, pueden prepararse conjuntos de oligonucleótidos degenerados. Tales oligonucleótidos son útiles como cebadores,

por ejemplo, en las reacciones en cadena de la polimerasas (PCR), en donde los fragmentos de ADN se aíslan y se amplifican. En ciertas modalidades, pueden usarse cebadores degenerados como sondas para las genotecas. Dichas genotecas incluirían, pero no se limitan a, librerías de ADNc, librerías genómicas, e incluso librerías de ADN o etiquetas de secuencias de expresión electrónicas. Las secuencias homólogas identificadas mediante este método podrían usarse después como sondas para identificar homólogos de las secuencias identificadas en la presente descripción.

Además, son de uso potencial los polinucleótidos y oligonucleótidos (por ejemplo, cebadores o sondas) que hibridan en condiciones de rigurosidad reducidas, típicamente condiciones moderadamente rigurosas, y comúnmente condiciones altamente rigurosas para el(los) polinucleótido(s) como se describe en la presente descripción. Los parámetros básicos que afectan la elección de las condiciones de hibridación y la guía para idear las condiciones adecuadas pueden determinarse fácilmente por los expertos en la técnica en base a, por ejemplo, la longitud o composición de bases del polinucleótido. Una modo de lograr condiciones moderadamente rigurosas implica el uso de una solución de prelavado que contiene citrato de sodio estándar 5x, dodecil sulfato de sodio al 0,5 %, ácido etilendiaminotetraacético 1,0 mM (pH 8,0), tampón de hibridación de formamida aproximadamente al 50 %, citrato de sodio estándar 6x, y una temperatura de hibridación de aproximadamente 55 °C (u otras soluciones de hibridación similares, tales como una que contiene formamida aproximadamente al 50 %, con una temperatura de hibridación de aproximadamente 42 °C), y condiciones de lavado de aproximadamente 60 °C, en citrato de sodio estándar 0,5x, dodecil sulfato de sodio al 0,1 %. Generalmente, las condiciones altamente rigurosas se definen como las condiciones de hibridación anteriores, pero con lavado a aproximadamente 68 °C, citrato de sodio estándar 0,2x, dodecil sulfato de sodio al 0,1 %. La SSPE (SSPE 1x es cloruro de sodio 0,15 M, fosfato de sodio 10 mM, y ácido etilendiaminotetraacético 1,25 mM, pH 7,4) puede sustituirse por citrato de sodio estándar (citrato de sodio estándar 1x es cloruro de sodio 0,15 M y citrato de sodio 15 mM) en los tampones de hibridación y lavado; los lavados se realizan durante 15 minutos después que se completa la hibridación. Debe entenderse que la temperatura del lavado y la concentración de sales del lavado pueden ajustarse según sea necesario para lograr un grado de rigurosidad deseado mediante la aplicación los principios básicos que gobiernan las reacciones de hibridación y la estabilidad de los híbridos, como se conoce por los expertos en la técnica y se describe adicionalmente más abajo (ver, por ejemplo, Sambrook y otros, 1989). Cuando un polinucleótido hibrida con un polinucleótido objetivo de secuencia desconocida, se asume que la longitud del híbrido es la del polinucleótido con que hibrida. Cuando los polinucleótidos de secuencia conocida se hibridan, la longitud del híbrido puede determinarse mediante la alineación de las secuencias de los polinucleótidos y la identificación de la región o regiones de complementariedad de secuencias óptima. La temperatura de hibridación para los híbridos que se anticipa que sean menores de 50 pares de bases de longitud debe ser de 5 a 10 °C menos que la temperatura de fusión del híbrido, donde la temperatura de fusión se determina de conformidad con las siguientes ecuaciones. Para híbridos de menos de 18 pares de bases de longitud, la temperatura de fusión (°C)=2(número de bases A+T)+4(número de bases G+C). Para híbridos por encima de 18 pares de bases de longitud, la temperatura de fusión (°C)=81,5+16,6(log10 [Na+])+0,41(% G+C)-(600/N), donde N es el número de bases en el híbrido, y [Na+] es la concentración de iones de sodio en el tampón de hibridación ([Na+] para el citrato de sodio estándar 1x=0,165 M). Típicamente, cada polinucleótido que hibrida tiene una longitud que es al menos 25 % (comúnmente al menos 50 %, 60 %, o 70 %, y lo más común al menos 80 %) de la longitud de un polinucleótido con el cual hibrida, y tiene al menos 60 % de identidad de secuencia (por ejemplo, al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) con un polinucleótido con el cual hibrida.

También se contemplan polinucleótidos aislados. Un polinucleótido "aislado" está libre de secuencias (óptimamente secuencias codificantes de proteínas) que flanquean naturalmente el polinucleótido (por ejemplo, secuencias que se localizan en los extremos 5' y 3' del polinucleótido) en el ADN genómico del organismo del cual se deriva el polinucleótido. Por ejemplo, en varias modalidades, el polinucleótido aislado puede contener menos de aproximadamente 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb o 0,1 kb de secuencia de nucleótidos que flanquean naturalmente el polinucleótido en el ADN genómico de la célula de la que se deriva el polinucleótido.

Pueden usarse los constructos recombinantes para transformar plantas o células vegetales. Un constructo de polinucleótido recombinante puede comprender un polinucleótido que codifica una o más variantes de polipéptidos como se describe en la presente descripción, unido operativamente a una región reguladora adecuada para expresar la variante de polipéptido. Por lo tanto, un polinucleótido puede comprender una secuencia codificante que codifica la variante de polipéptido. La planta o célula vegetal puede comprender un genoma que se alteró mediante la integración estable del ADN recombinante. El ADN recombinante incluye ADN que se modificó genéticamente y se construyó fuera de una célula e incluye ADN que contiene ADN de origen natural o ADNc o ADN sintético. La planta puede incluir una planta regenerada a partir de una célula vegetal transformada originalmente y plantas de la progenie a partir de generaciones posteriores o cruces de una planta transformada. Adecuadamente, la modificación altera la expresión o actividad del polinucleótido de HMA o del polipéptido de HMA que se describe en la presente descripción en comparación con una planta control. En ciertas modalidades, se usan enfoques no GMO para reducir la acumulación de Cd a través del uso de inactivación génica. Por lo tanto, por ejemplo, se usan mutantes que presentan uno o más polimorfismos de nucleótidos que se obtienen a través del uso de uno o más productos químicos que se añaden exógenamente, tales como compuestos orgánicos mutagénicos, teratogénicos o carcinogénicos, por ejemplo metanosulfonato de etilo (EMS), que producen mutaciones aleatorias en el material genético. Puede tamizarse entonces una biblioteca de ADN de plantas tratadas en busca de mutaciones en los dos genes HMA4.

Se proporcionan además, vectores que contienen constructos de polinucleótidos recombinantes tales como los que se describen en la presente descripción. Las cadenas principales de vectores adecuadas incluyen, por ejemplo, las que se usan rutinariamente en la técnica tales como plásmidos, virus, cromosomas artificiales, cromosomas artificiales bacterianos, cromosomas artificiales de levadura o cromosomas artificiales de bacteriófago. Los vectores de expresión adecuados incluyen, sin limitarse a, plásmidos y vectores virales derivados de, por ejemplo, bacteriófago, baculovirus, y retrovirus. Numerosos vectores y sistemas de expresión están disponibles comercialmente. Los vectores pueden incluir, por ejemplo, orígenes de replicación, regiones de unión al armazón o marcadores. Un gen marcador puede conferir un fenotipo seleccionable en una célula vegetal. Por ejemplo, un marcador puede conferir resistencia a biocidas, tal como resistencia a un antibiótico (por ejemplo, kanamicina, G418, bleomicina, o higromicina), o a un herbicida (por ejemplo, glifosato, clorosulfuron o fosfinotricina). Adicionalmente, un vector de expresión puede incluir una secuencia etiqueta diseñada para facilitar la manipulación o detección (por ejemplo, purificación o localización) del polipéptido expresado. Las secuencias etiquetas, tales como luciferasa, beta-glucuronidasa, proteína fluorescente verde, glutatión S-transferasa, polihistidina, secuencias c-myc o hemaglutinina típicamente se expresan como una fusión con el polipéptido codificado. Tales etiquetas pueden insertarse en cualquier lugar dentro de la variante de polipéptido de HMA, que incluye lo mismo en el extremo carboxilo que en el extremo amino.

Una planta o célula vegetal puede transformarse al tener el polinucleótido recombinante integrado en su genoma para convertirse en transformada de manera estable. La planta o célula vegetal que se describe en la presente descripción puede transformarse de manera estable. Las células transformadas de manera estable típicamente retienen el polinucleótido introducido con cada división celular. Una planta o célula vegetal puede transformarse transitoriamente de manera que el polinucleótido recombinante no se integra en su genoma. Las células transformadas transitoriamente pierden típicamente todo o alguna porción del polinucleótido recombinante introducido con cada división celular, de manera que el polinucleótido recombinante introducido no puede detectarse en las células hijas después de un número suficiente de divisiones celulares. También se contempla el uso de la edición del genoma.

Un número de métodos están disponibles en la técnica para transformar una célula vegetal, todos los cuales se abarcan en la presente descripción, que incluyen biolística, técnicas con cañón de genes, transformación mediada por *Agrobacterium*, transformación mediada por vectores virales y electroporación. El sistema de *Agrobacterium* para la integración de ADN foráneo en cromosomas de plantas se ha estudiado, modificado, y explotado extensamente para la ingeniería genética de plantas. Las moléculas de ADN recombinante desnudo que comprenden secuencias de ADN que corresponden a la proteína objetivo purificada unida operativamente, en la orientación sentido o antisentido, a secuencias regulatorias, están unidas a secuencias de T-ADN apropiadas mediante métodos convencionales. Estas se introducen en protoplastos mediante técnicas con polietilenglicol o mediante técnicas de electroporación, las cuales son estándar. Alternativamente, tales vectores que comprenden moléculas de ADN recombinante que codifican la proteína objetivo purificada se introducen en células de *Agrobacterium* vivas, las que después transfieren el ADN dentro de las células vegetales. La transformación mediante ADN desnudo sin secuencias acompañantes del vector de T-ADN puede llevarse a cabo mediante la fusión de protoplastos con liposomas que contienen ADN o mediante electroporación. Puede usarse además, el ADN desnudo no acompañado por secuencias del vector de T-ADN, para transformar células mediante microproyectiles inertes, de alta velocidad.

La elección de incluir regiones regulatorias en un constructo recombinante depende de varios factores, que incluyen, pero no se limitan a, eficiencia, selectividad, inducibilidad, nivel de expresión deseado, y expresión preferencial en células o tejidos. Para un experto en la técnica, es una cuestión de rutina modular la expresión de una secuencia codificante de una variante de HMA mediante la selección y ubicación apropiada de las regiones regulatorias con relación a la secuencia codificante. La transcripción de un polinucleótido puede modularse de manera similar. Algunas regiones regulatorias adecuadas inician la transcripción solo, o predominantemente, en ciertos tipos celulares. Los métodos para identificar y caracterizar regiones regulatorias en ADN genómico de plantas se conocen en la técnica. Ejemplos de promotores incluyen promotores específicos de tejidos que se reconocen por factores específicos de tejidos presentes en diferentes tejidos o tipos celulares (por ejemplo, promotores específicos de la raíz, promotores específicos de brotes, promotores específicos de xilema), o presentes durante diferentes etapas del desarrollo, o presentes en respuesta a diferentes condiciones ambientales. Ejemplos de promotores incluyen promotores constitutivos que pueden activarse en la mayoría de los tipos celulares sin requerir inductores específicos. Ejemplos de promotores para controlar la producción de polipéptidos de ARNi incluyen los promotores del virus del mosaico de la coliflor 35S (CaMV/35S), SSU, OCS, lib4, usp, STLS1, B33, nos o los promotores de ubiquitina o faseolina. Los expertos en la técnica son capaces de generar variaciones múltiples de promotores recombinantes. Adicionalmente a los promotores de plantas, otros promotores adecuados pueden derivarse de un 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 de ARN 35S y 19S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), promotores constitutivos del virus del mosaico del tabaco, promotores 19S y 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), o el promotor 35S del virus del mosaico de la escrofularia).

Debe entenderse que la reducción o inhibición de la expresión o actividad de las HMA que se describen en la presente descripción pueden lograrse por varios medios. Por ejemplo, se contempla insertar una o más mutaciones en al menos uno de los genes que codifican las HMA, que incluyen delecciones, inserciones, mutaciones específicas de sitio, nucleasas de dedos de zinc.

En un ejemplo, se proporciona una planta mutante o parte de esta que tiene al menos una expresión o actividad parcialmente reducida de al menos dos ATPasas de metales pesados (HMA), dichas dos HMA comprenden, consisten o consisten esencialmente en: (i) polipéptidos que tienen al menos 65 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:1 y la SEQ ID NO:2; (ii) polinucleótidos que codifican los polipéptidos expuestos en (i); o (iii) polinucleótidos que

tienen al menos 65 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:3 y la SEQ ID NO:4 que codifican las HMA; en donde la planta mutante o parte de esta exhibe al menos una reducción del 27 %, en comparación con la planta control, en la acumulación de cadmio en la hoja cuando la planta mutante se cultiva en el campo en presencia de cadmio de origen natural o no natural.

La expresión o actividad de las HMA puede modularse a través del uso de una de más mutaciones que causan una reducción en la expresión o función de dicho gen o proteína codificada de esta manera. Además de las una o más mutaciones que se describen en la presente descripción, la planta mutante o célula vegetal puede tener una o más mutaciones adicionales en uno o más de otros genes o polipéptidos. En ciertas modalidades, los mutantes pueden tener una o más mutaciones adicionales en uno o más de otros genes o polipéptidos.

En otro ejemplo, se proporciona un método para reducir el nivel de cadmio en la hoja de una planta que se cultiva en el campo que comprende las etapas de: (a) reducir la expresión o actividad de dos ATPasas de metales pesados (HMA), dichas dos HMA comprenden, consisten o consisten esencialmente en: (i) polipéptidos que tienen al menos 65 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:1 y la SEQ ID NO:2; (ii) polinucleótidos que codifican los polipéptidos expuestos en (i); o (iii) polinucleótidos que tienen al menos 65 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:3 y la SEQ ID NO:4; que codifican las HMA; (b) cultivar la planta en el campo; (c) opcionalmente, medir el contenido de cadmio en la planta que se obtiene en la etapa (b); e (d) identificar una planta en la que el contenido de cadmio en la misma se reduce en comparación con una planta control en la que no se ha reducido la expresión o actividad de las HMA, adecuadamente, en donde la planta o parte de esta exhibe al menos una reducción del 27 %, en comparación con la planta control, en la acumulación de cadmio en la hoja cuando la planta se cultiva en el campo en presencia de cadmio de origen natural o no natural; adecuadamente, en donde el fenotipo de la planta mutante o parte de esta en el tiempo de cosecha es el mismo que la planta control al mismo tiempo de cosecha, adecuadamente, en donde la planta mutante o parte de esta no muestra una biomasa (por ejemplo, reducción del peso de la hoja) en el tiempo de cosecha en comparación con la planta control al mismo tiempo de cosecha. En ciertas modalidades, la expresión o actividad de las dos HMA se reduce mediante el enfoque de mutagénesis que se describe en la presente descripción o a través del uso de los mutantes que se describen en la presente descripción.

El "tiempo de cosecha" de una planta será inmediatamente evidente para un experto en la técnica. En otras palabras, el experto sabrá cuándo una planta está lista para la cosecha. A modo de ejemplo, la persona experta en la técnica sabe cuándo cosechar una planta de tabaco porque las hojas de la planta de tabaco comienzan a madurar. Para ciertas variedades de tabaco esto significa que las hojas comienzan a amarillarse, lo que se destina y desea para un curado adecuado. También existen variedades de tabaco que se curan de verde a marrón o de verde a amarillo a marrón. Las plantas pueden cosecharse en su totalidad o en parte una vez que la parte de la planta esté lista para cosecharse. Por ejemplo, para las plantas de tabaco, el tiempo de cosecha puede definirse para cada posición del tallo. Las hojas en la parte inferior del tallo de tabaco comenzarán a cambiar primero de color (*por ejemplo*, amarillo) y pueden cosecharse, y las hojas superiores se volverán amarillas más adelante para la cosecha. También se proporciona un método para identificar una o más alteraciones genéticas en una planta que se cultiva en el campo que se correlaciona con niveles reducidos de cadmio en la hoja en comparación con una planta control que se cultiva en el campo que no comprende la una o más alteraciones genéticas, dicho método que comprende las etapas de: (a) identificar una planta con niveles reducidos de cadmio en las hojas cuando se cultivan en el campo en comparación con una planta control que se cultiva en el campo, opcionalmente, en donde el fenotipo de la planta o parte de esta en el momento de la cosecha es el mismo que la planta control al mismo tiempo de cosecha, adecuadamente, en donde la planta o parte de esta no muestra una biomasa (por ejemplo, reducción del peso de la hoja) en el tiempo de cosecha en comparación con la planta control al mismo tiempo de cosecha; (b) proporcionar una muestra de ácido nucleico de la planta identificada en la etapa (a); e (c) identificar en la muestra de ácido nucleico de la etapa (b) una o más alteraciones genéticas en las secuencias de polinucleótidos que codifican las HMA que tienen al menos 65 % de identidad de secuencia con las secuencias no mutadas expuestas en la SEQ ID NO:1 y la SEQ ID NO:2 o la secuencia de polinucleótidos que tiene al menos 65 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:3 y la SEQ ID NO:4.

En algunas modalidades, una o más mutaciones favorables se identifican a través el cribado de una población de plantas mutantes. En algunas modalidades, una o más mutaciones favorables que se identifican a través de un enfoque de cribado pueden introducirse en una planta o célula vegetal diferente y la mutación que se introduce puede identificarse o seleccionarse mediante el uso de métodos conocidos por los expertos en la técnica, tales como análisis de transferencia de Southern, secuenciación de ADN, análisis de PCR o análisis fenotípico. Las mutaciones que afectan la expresión génica o que interfieren con la función de la proteína HMA codificada pueden determinarse mediante el uso de métodos que se conocen bien en la técnica.

Cualquier planta de interés, que incluye una célula vegetal o material vegetal puede modificarse por varios métodos conocidos por inducir mutagénesis, que incluyen mutagénesis dirigida a un sitio, mutagénesis dirigida a oligonucleótido, mutagénesis inducida químicamente, mutagénesis inducida por radiación, mutagénesis que utiliza bases modificadas, mutagénesis que utiliza ADN híbrido con espacios, mutagénesis por ruptura bicatenaria,

mutagénesis que utiliza cepas huéspedes deficientes en la reparación, mutagénesis por síntesis génica total, barajado de ADN y otros métodos equivalentes.

Pueden usarse variantes polipeptídicas mutantes para crear plantas mutantes o células vegetales que comprenden una o más variantes polipeptídicas mutantes. La actividad de HMA de la variante de polipéptido mutante puede ser superior, inferior o aproximadamente la misma que la del polipéptido sin mutar. Adecuadamente, la actividad de HMA de las variantes de polipéptido mutantes se inactiva parcialmente (por ejemplo, se reduce) o se pierde (por ejemplo, se inhibe o se elimina) como se describe en la presente descripción.

Las mutaciones en las secuencias de nucleótidos y polipéptidos que se describen en la presente descripción pueden incluir mutaciones artificiales o mutaciones sintéticas o mutaciones modificadas genéticamente. Las mutaciones en las secuencias de nucleótidos y polipéptidos que se describen en la presente descripción pueden ser mutaciones que se obtienen o pueden obtenerse mediante un proceso que incluye una etapa de manipulación *in vitro* o *in vivo*. Las mutaciones en las secuencias de nucleótidos y polipéptidos que se describen en la presente descripción pueden ser mutaciones que se obtienen o pueden obtenerse mediante un proceso que incluye la intervención del hombre. A modo de ejemplo, el proceso puede incluir mutagénesis mediante el uso de sustancias químicas que se añaden exógenamente, tales como compuestos orgánicos mutagénicos, teratogénicos o carcinogénicos, por ejemplo, metanosulfonato de etilo (EMS), que producen mutaciones aleatorias en el material genético. A modo de ejemplo adicional, el proceso puede incluir una o más etapas de ingeniería genética, tal como una o más de las etapas de ingeniería genética que se describen en la presente descripción o sus combinaciones. A modo de ejemplo adicional, el proceso puede incluir una o más etapas de cruce de plantas.

La actividad de uno o más polipéptidos de HMA en una planta se reduce o inhibe de conformidad con la presente descripción si la actividad del polipéptido de HMA es estadísticamente menor que la actividad del(los) mismo(s) polipéptido(s) de HMA en una planta que no se modificó para reducir o inhibir la actividad de ese polipéptido de HMA y que se cultivó y cosechó mediante el uso de los mismos protocolos. La actividad de un polipéptido de HMA en una planta se considera que se elimina cuando no es detectable mediante los métodos de ensayo que se describen en la presente descripción. Para analizar la actividad de transporte de Cd de una proteína HMA mutante, puede usarse un ensayo a base de levadura. En este ensayo, la secuencia de longitud completa puede clonarse en un vector de expresión de levadura y expresarse en un mutante de levadura *ycf1* sensible al Cd. Las células en la fase logarítmica se diluyen a una DO₆₀₀ diferente y se manchan en un medio que contiene Cd. La tolerancia al Cd de la cepa refleja la actividad de transporte de la proteína mutante de HMA. Como una alternativa, la actividad puede deducirse cuando se combina una secuencia de HMA mutada con una segunda mutación sin sentido de HMA que suprime completamente la actividad de transporte de HMA. Se espera que una mutación sin sentido que trunca una gran parte de la proteína no muestre ninguna actividad de transporte. Para una mutación con cambio de sentido, la actividad enzimática puede reducirse parcialmente o perderse completamente. Cuando los valores de Cd en un mutante doble que combina mutaciones sin sentido y con cambio de sentido son similares al control, puede deducirse que la mutación con cambio de sentido no tiene una influencia significativa en la actividad de la proteína. Cuando los valores de Cd y/o el fenotipo están entre una mutación sin sentido doble y el control, puede asumirse la actividad parcial de la mutación con cambio de sentido. Cuando los valores de Cd y el fenotipo son similares al mutante sin sentido doble de HMA, puede concluirse que la mutación con cambio de sentido suprime completamente la actividad de transporte.

Los métodos que introducen una mutación de manera aleatoria en una secuencia génica pueden incluir mutagénesis química, mutagénesis por EMS y mutagénesis por radiación. Los métodos que introducen una o más mutaciones dirigidas en una célula incluyen, pero no se limitan a, la tecnología de edición de genomas, particularmente la mutagénesis mediada por nucleasas con dedos de zinc (revisado en Petolino, 2015), el direccionamiento a lesiones locales inducidas en genomas (TILLING) (revisado en Chen y otros, 2014), la mutagénesis mediada por meganucleasas (ver, por ejemplo, Arnould y otros, 2011), TALEN (revisado en Wright y otros, 2014) y el sistema CRISPR/Cas (revisado en Bortesi y Fischer, 2015). Los métodos de edición de genoma/gen en plantas se revisaron, por ejemplo, en Puchta y Fauser (2013), Qiwei y Caixia, (2015) y Chen y Gao (2014).

También se contemplan combinaciones de los varios métodos que se describieron anteriormente. En otras palabras, la actividad o expresión de una HMA puede modularse mediante el uso de una técnica particular y una segunda HMA puede modularse mediante el uso de una técnica diferente.

Algunos ejemplos no limitantes de mutaciones son deleciones, inserciones, mutaciones sin sentido y con cambio de sentido de al menos un nucleótido, polimorfismos de un solo nucleótido y una repetición de una secuencia simple. Después de la mutación, puede realizarse el cribado para identificar deleciones que crean codones de parada prematuros o de cualquier otra manera genes no funcionales. El cribado de mutantes puede llevarse a cabo mediante secuenciación, o mediante el uso de una o más sondas o cebadores específicos para el gen o proteína. También pueden crearse mutaciones específicas en los polinucleótidos que puedan dar como resultado una expresión génica modulada, una estabilidad modulada del ARNm, o una estabilidad modulada de la proteína. Tales plantas se refieren en la presente descripción como plantas "de origen no natural" o "mutantes". Las plantas mutantes o de origen no natural pueden incluir al menos una porción de ácido nucleico extraño o sintético o artificial (por ejemplo, ADN o ARN) que no estaba presente en la planta antes de que se manipulara. El ácido nucleico extraño puede ser un solo nucleótido, dos o más nucleótidos, dos o más nucleótidos contiguos o dos o más nucleótidos no contiguos, tales como

al menos 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400 o 1500 o más nucleótidos contiguos o no contiguos.

En una modalidad, las semillas de las plantas se someten a mutagénesis y después se cultivan para obtener plantas mutantes de la primera generación, que luego se criban en busca de mutaciones en sus loci. Además se describe en la presente descripción que las plantas de la primera generación se dejan autopolinizar y las semillas de la planta de la primera generación pueden cultivarse para obtener plantas de la segunda generación, que pueden cribarse en busca de mutaciones en sus loci. Aunque el material vegetal con mutaciones (que incluye las semillas) puede cribarse en busca de mutaciones, una ventaja del cribado de las plantas de la segunda generación es que todas las mutaciones somáticas corresponden a mutaciones de la línea germinal. Un experto en la técnica comprenderá que una variedad de materiales vegetales, que incluyen, pero no se limitan a, semillas, polen, tejido vegetal o células vegetales, puede someterse a mutagénesis para crear las plantas mutantes. Sin embargo, el tipo de material vegetal que se somete a mutagénesis puede afectar cuando el ácido nucleico vegetal se analiza en busca de mutaciones. Por ejemplo, cuando el polen se somete a mutagénesis antes de la polinización de una planta sin mutaciones, las semillas que resultan de esa polinización se cultivan para obtener plantas de la primera generación. Cada célula de las plantas de la primera generación contendrán mutaciones creadas en el polen; por lo tanto, estas plantas de la primera generación pueden cribarse después en busca de mutaciones en lugar de esperar hasta la segunda generación.

Los mutágenos que crean principalmente mutaciones puntuales y delecciones, inserciones, transversiones, y/o transiciones cortas, que incluye mutágenos químicos o radiación, pueden usarse para crear las mutaciones. Los mutágenos incluyen, pero no se limitan a, metanosulfonato de etilo, metanosulfonato de metilo, N-etil-N-nitrosourea, trietilmelamina, N-metil-N-nitrosourea, procarbazona, clorambucilo, ciclofosfamida, sulfato de dietilo, monómero de acrilamida, melfalán, mostaza de nitrógeno, vincristina, dimetilnitrosamina, N-metil-N'-nitro-nitrosoguanidina, nitrosoguanidina, 2-aminopurina, 7,12 dimetil-benzo(a)antraceno, óxido de etileno, hexametilfosforamida, bisulfán, diepoxialcanos (diepoxioctano, diepoxibutano y similares), dihidrocloruro de 2-metoxi-6-cloro-9[3-(etil-2-cloro-etil)aminopropilamino]acridina y formaldehído.

Además, se contemplan las mutaciones espontáneas en el locus que pueden no haberse causado directamente por el mutágeno siempre y cuando resulten en el fenotipo deseado. Los agentes mutagénicos adecuados pueden incluir además, por ejemplo, radiación ionizante, tales como rayos X, rayos gamma, radiación con neutrones rápidos y radiación UV. Cualquier método de preparación de ácidos nucleicos de plantas, conocido por los expertos en la técnica, puede usarse para preparar el ácido nucleico de plantas para el cribado de mutaciones.

El ácido nucleico que se preparó a partir de plantas individuales, células vegetales, o material vegetal opcionalmente puede mezclarse para un cribado expedito para mutaciones en la población de plantas que se origina del tejido, células o material vegetal que se sometió a mutagénesis. Pueden cribarse una o más generaciones posteriores de plantas, células vegetales o material vegetal. El tamaño del grupo mezclado opcionalmente depende de la sensibilidad del método de cribado usado.

Después que las muestras de ácidos nucleicos se mezclan opcionalmente, pueden someterse a técnicas de amplificación específicas de polinucleótidos, tales como la reacción en cadena de la polimerasa. Cualquiera de uno o más cebadores o sondas específicos para el gen o las secuencias inmediatamente adyacentes al gen pueden utilizarse para amplificar las secuencias dentro de la muestra de ácidos nucleicos mezclada opcionalmente. Los ejemplos de cebadores de oligonucleótidos se describen en la presente descripción. Adecuadamente, el uno o más cebadores o sondas se diseñan para amplificar las regiones del locus donde es más probable que surjan mutaciones útiles. Más adecuadamente, el cebador se diseña para detectar mutaciones dentro de regiones del polinucleótido. Adicionalmente, es adecuado para el(los) cebador(es) y la(s) sonda(s) evitar los sitios polimórficos conocidos para facilitar el cribado en busca de mutaciones puntuales. Para facilitar la detección de los productos de amplificación, el uno o más cebadores o sondas pueden marcarse con el uso de cualquier método de marcaje convencional. El(los) cebador(es) o la(s) sonda(s) puede(n) diseñarse en base a las secuencias que se describen en la presente descripción mediante el uso de métodos que se comprenden bien en la técnica.

Para facilitar la detección de los productos de amplificación, el(los) cebador(es) o la(s) sonda(s) pueden marcarse mediante el uso de cualquier método de marcaje convencional. Estos pueden diseñarse a partir de las secuencias que se describen en la presente descripción mediante el uso de métodos que se comprenden bien en la técnica. Los polimorfismos pueden identificarse por medios que se conocen en la técnica y algunos se describen en la literatura.

En un aspecto adicional se proporciona un método para preparar una planta mutante. El método implica proporcionar al menos una célula de una planta que comprende un gen que codifica un polipéptido de HMA funcional como se describe en la presente descripción (o cualquiera de sus combinaciones como se describe en la presente descripción). Seguidamente, la al menos una célula de la planta se trata bajo condiciones efectivas para modular la actividad del(de los) polipéptido(s) de HMA que se describen en la presente descripción. La al menos una célula vegetal mutante se propaga después para obtener una planta mutante, donde la planta mutante tiene un nivel modulado del(de los) polipéptido(s) de HMA en comparación con el de una planta control. En una modalidad de este método para crear una planta mutante, la etapa de tratamiento implica someter la al menos una célula a un agente mutagénico químico como se describió anteriormente y en condiciones efectivas para obtener al menos una célula vegetal mutante. En otro

ejemplo de este método, la etapa de tratamiento implica someter al menos una célula a una fuente de radiación bajo condiciones efectivas para producir al menos una célula vegetal mutante. El término "planta mutante" incluye las plantas mutantes en las cuales el genotipo se modifica en comparación con una planta control.

En ciertas modalidades, la planta mutante, célula vegetal mutante o material vegetal mutante pueden comprender una o más mutaciones que se han producido naturalmente en otra planta, célula vegetal o material vegetal y confieren un rasgo deseado. Esta mutación puede incorporarse (por ejemplo, por introgresión) en otra planta, célula vegetal o material vegetal (por ejemplo, una planta, célula vegetal o material vegetal con un fondo genético diferente a la planta a partir de la cual se derivó la mutación) para crear una mutación que es de origen no natural en esa planta para conferir el rasgo a la misma. Por lo tanto, a modo de ejemplo, una mutación que se produjo naturalmente en una primera planta puede introducirse en una segunda planta, tal como una segunda planta con un fondo genético diferente a la primera planta. Por lo tanto la persona experta es capaz de buscar e identificar una planta que porta naturalmente en su genoma uno o más alelos mutantes de los genes que se describen en la presente descripción que confieren un rasgo deseado. El(los) alelo(s) mutante(s) que se produce(n) naturalmente pueden transferirse a la segunda planta mediante varios métodos que incluyen el mejoramiento, retrocruzamiento e introgresión para producir líneas, variedades o híbridos que tienen una o más mutaciones en los genes que se describen en la presente descripción. Las plantas que muestran un rasgo deseado pueden cribarse de una mezcla de plantas mutantes. Adecuadamente, la selección se lleva a cabo al utilizar el conocimiento de las secuencias de nucleótidos como se describe en la presente descripción. Consecuentemente, es posible cribar en busca de un rasgo genético en comparación con un control. Tal enfoque de cribado puede implicar la aplicación de técnicas convencionales de amplificación y/o hibridación de ácidos nucleicos como se discute en la presente descripción.

En otro ejemplo se proporciona un método para preparar una planta mutante que tiene niveles reducidos de Cd en comparación con una planta control que comprende las etapas de: (a) proporcionar una muestra a partir de una primera planta; (b) determinar si dicha muestra comprende mutaciones simultáneas en cada uno de los polipéptidos de HMA4 que se describen en la presente descripción que dan como resultado niveles reducidos de Cd en plantas que se cultivaron en el campo; y (c) transferir ambas mutaciones a una segunda planta. La(s) mutación(es) puede(n) transferirse a la segunda planta mediante el uso de varios métodos que se conocen en la técnica, tales como mediante ingeniería genética, manipulación genética, introgresión, mejoramiento de plantas, retrocruzamiento y similares. En una modalidad, la segunda planta tiene un fondo genético diferente a la primera planta.

También se proporciona un método para preparar una planta mutante que tiene niveles reducidos de Cd en comparación con una planta control que comprende las etapas de: (a) proporcionar una muestra a partir de una primera planta; (b) determinar si dicha muestra comprende mutaciones dobles en los polipéptidos de HMA4 que se describen en la presente descripción que dan como resultado niveles reducidos de Cd en plantas que se cultivaron en el campo; e (c) introducir ambas mutaciones a partir de la primera planta en una segunda planta. Además, la etapa de introgresión comprende el mejoramiento de plantas, opcionalmente incluye el retrocruzamiento y similares. Además, la segunda planta tiene un fondo genético diferente a la primera planta. Además, la primera planta no es un cultivar o un cultivar élite. También se describe que la segunda planta es un cultivar o un cultivar élite.

Un ejemplo adicional se refiere a una planta mutante (que incluye un cultivar o planta mutante de cultivar élite) que se obtuvo o que puede obtenerse mediante los métodos que se describen en la presente descripción. En ciertas modalidades, la "planta mutante" puede tener una o más mutaciones localizadas solo en una región específica de la planta, tal como dentro de la secuencia del uno o más polinucleótido(s) que se describen en la presente descripción. De conformidad con esta modalidad, la secuencia genómica restante de la planta será la misma o esencialmente la misma que la planta antes de la mutagénesis.

Varias modalidades se dirigen a plantas mutantes o células vegetales modificadas para modular los niveles de expresión génica, lo que produce de esta manera una planta o célula vegetal, tal como una planta de tabaco, en la cual se modula el nivel de expresión de un polipéptido de HMA dentro de los tejidos de interés en comparación con un control. Las composiciones y los métodos que se describen pueden aplicarse a cualquier especie del género *Nicotiana*, lo que incluye *N. rustica* y *N. tabacum* (por ejemplo, LA B21, LN KY171, TI 1406, Basma, Galpao, Perique, Beinhart 1000-1, y Petico).

El uso de cultivares de tabaco y cultivares de tabaco élite se contemplan, además, en la presente descripción. La planta mutante puede ser, por lo tanto, una variedad de tabaco o un cultivar de tabaco élite que comprende uno o más transgenes, o una o más mutaciones genéticas o una de sus combinaciones. La(s) mutación(es) genética(s) (por ejemplo, uno o más polimorfismos) pueden ser mutaciones que no existen naturalmente en la variedad de tabaco individual o cultivar de tabaco (por ejemplo, cultivar de tabaco élite) o pueden ser mutación(es) genética(s) que se producen naturalmente siempre y cuando la mutación no se produzca naturalmente en la variedad de tabaco individual o cultivar de tabaco (por ejemplo, cultivar de tabaco élite).

Las variedades particularmente útiles de *Nicotiana tabacum* incluyen los tabacos tipo Burley, tipo oscuro, tipo curado en atmósfera artificial, y tipo Oriental. Los ejemplos no limitantes de variedades o cultivares son: BD 64, CC101, CC 200, CC 27, CC 301, CC 400, CC 500, CC 600, CC 700, CC 800, CC 900, Coker 176, Coker 319, Coker 371 dorado, Coker 48, CD 263, DF911, tabaco Galpao DT 538 LC, GL 26H, GL 350, GL 600, GL 737, GL 939, GL 973, HB 04P,

HB 04P LC, HB3307PLC, Híbrido 403LC, Híbrido 404LC, Híbrido 501 LC, K 149, K 326, K 346, K 358, K394, K 399, K 730, KDH 959, KT 200, KT204LC, KY10, KY14, KY 160, KY 17, KY 171, KY 907, KY907LC, KY14xL8 LC, Crittenden pequeño, McNair 373, McNair 944, msKY 14xL8, Hoja estrecha Madole, Hoja estrecha Madole LC, 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, OXFORD 207, PD 7302 LC, PD 7309 LC, PD 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 D94, TN D950, TR (Tom Rosson) Madole, VA 309, VA359, AA 37-1, B13P, Xanthi (Mitchell-Mor), Bel-W3, 79-615, Samsun Holmes NN, KTRDC número 2 híbrido 49, Burley 21, KY8959, KY9, MD 609, PG01, PG04, PO1, PO2, PO3, RG11, RG 8, VA509, 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, Djebel 81, DVH 405, Galpão Común, HB04P, Hicks Broadleaf, Kabakulak Ellassona, Kutsage E1, LA BU 21, NC 2326, NC 297, PVH 2110, Ruso rojo, Samsun, Saplak, Simmaba, Talgar 28, Wíslica, 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 Habana. Se contemplan, además, subvariedades de baja conversión de lo anterior, incluso si no se identifican específicamente en la presente descripción. En una modalidad, se usa el tipo Burley de *Nicotiana tabacum*.

Las modalidades también se dirigen a composiciones y métodos para producir plantas mutantes que se modificaron para modular la expresión o actividad de un(os) polinucleótido(s) de HMA que se describen en la presente descripción (o cualquiera de sus combinaciones como se describe en la presente descripción). Ventajosamente, las plantas mutantes que se obtienen pueden ser similares o esencialmente las mismas en su apariencia global que las plantas control. Varias características fenotípicas tales como grado de madurez, número de hojas por planta, altura del rabillo, ángulo de inserción de las hojas, tamaño de las hojas (ancho y longitud), distancia de internodos, y relación lámina-nervadura pueden evaluarse mediante observaciones de campo.

Un ejemplo se refiere a una semilla de una planta mutante. Adecuadamente, la semilla es una semilla de tabaco. Un ejemplo adicional se refiere a polen o un óvulo de una planta mutante que se describe en la presente descripción. Además, se proporciona una planta mutante como se describe en la presente descripción que comprende además un ácido nucleico que confiere esterilidad masculina.

Un ejemplo aún adicional, se refiere a un material vegetal curado o seco, tal como hoja curada o seca o tabaco curado o seco, derivado o derivable de una planta o célula mutante, en donde la expresión de uno o más de los polinucleótidos de HMA que se describen en la presente descripción o la actividad de la proteína codificada de esta manera se reduce y lo que resulta en niveles reducidos de Cd en la misma.

Las modalidades también se dirigen a composiciones y métodos para producir plantas mutantes o células vegetales que se modificaron para modular la expresión o actividad del uno o más de los polinucleótidos de HMA o polipéptidos de HMA que se describen en la presente descripción, lo que puede resultar en plantas o componentes vegetales (por ejemplo, hojas, tales como hojas curadas o secas) o células vegetales con niveles reducidos de Cd como se describe en la presente descripción.

Adecuadamente, la apariencia visual de las plantas que se describen en la presente descripción es sustancialmente la misma que la de la planta control. Adecuadamente, la biomasa y el tamaño de las hojas no cambian esencialmente en comparación con la planta control. En una modalidad, el peso de la hoja de la planta mutante es esencialmente el mismo que el de la planta control. En una modalidad, el número de hojas de la planta mutante es esencialmente el mismo que el de la planta control. En una modalidad, el peso de la hoja y el número de hojas de la planta mutante son esencialmente los mismos que la planta control. En un ejemplo, la altura del tallo de las plantas mutante es esencialmente la misma que la de las plantas control, por ejemplo, a un, dos o tres meses después del trasplante al campo o 10, 20, 30 o 36 o más días después del desmoche. Por ejemplo, la altura del tallo de las plantas mutantes no es menor que la altura del tallo de las plantas control. En otro ejemplo, el contenido de clorofila de las plantas mutantes es esencialmente el mismo que el de las plantas control. En otro ejemplo, la altura del tallo de las plantas mutantes es esencialmente la misma que la de las plantas control y el contenido de clorofila de las plantas mutantes es esencialmente el mismo que el de las plantas control. En otros ejemplos, el tamaño o la forma o el número o la coloración de las hojas de las plantas mutantes son esencialmente los mismos que los de las plantas control.

Una reducción en la expresión en comparación con un control puede ser de aproximadamente 5 % a aproximadamente 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 100 %, lo que incluye una reducción en la actividad transcripcional o la expresión de polinucleótido o la expresión de polipéptido o una de sus combinaciones.

Una reducción en la actividad en comparación con un control puede ser de aproximadamente 5 % a aproximadamente 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 100 %.

Los polinucleótidos y los constructos recombinantes que se describen en la presente descripción pueden usarse para modular la expresión de NtHMA4 como se describe en la presente descripción en una especie vegetal de interés, adecuadamente tabaco. Los polinucleótidos y los constructos recombinantes que se describen en la presente descripción pueden usarse para expresar los polipéptidos mutantes de NtHMA4 como se describe en la presente descripción en una especie vegetal de interés, adecuadamente tabaco.

En ciertos ejemplos, el fenotipo de la hoja y la velocidad de crecimiento de la planta mutante o parte de esta es el mismo que la planta control. Un ejemplo de una mutación doble que confiere estas propiedades es G251D/Q561*.

En ciertos ejemplos, el fenotipo de la hoja de la planta mutante o parte de esta es el mismo que la planta control y la planta mutante o parte de esta exhibe en una etapa temprana un crecimiento retardado en comparación con la planta control. El crecimiento retardado en una etapa temprana no se considera problemático porque en el tiempo de cosecha, no se observan diferencias de biomasa en comparación con las plantas control. Un ejemplo de un mutante doble que confiere estas propiedades es T402I/Q561*.

En ciertos ejemplos, el fenotipo de la hoja de la planta mutante o parte de esta es el mismo que la planta control excepto por la presencia de lesiones necróticas en una etapa temprana y la planta mutante o parte de esta exhibe un crecimiento retardado en comparación con la planta control en una etapa temprana. La presencia de lesiones necróticas no es problemática porque no se observan lesiones necróticas bajo la mayoría de las condiciones en el tiempo de cosecha en el campo. Un ejemplo de un mutante doble que confiere estas propiedades es Q293*/Q561* o Q293*/W265* o E296K/Q561* o Q464*/Q561* o Q293*/G235E. Adecuadamente, la cantidad de crecimiento de las plantas mutantes o parte de estas como se describe en la presente descripción no se reduce en comparación con la planta control.

Adecuadamente, las plantas mutantes o parte de estas como se describe en la presente descripción no exhiben un fenotipo enano en comparación con la planta control. Adecuadamente, las plantas mutantes o parte de estas como se describe en la presente descripción no exhiben un fenotipo enano en el tiempo de cosecha en comparación con el tiempo de cosecha de la planta control.

Adecuadamente, las plantas mutantes o parte de estas como se describe en la presente descripción no muestran una reducción de la biomasa (peso de la hoja) en comparación con el control. Adecuadamente, las plantas mutantes o parte de estas como se describe en la presente descripción no muestran una reducción de la biomasa (peso de la hoja) en el tiempo de cosecha en comparación con el control.

En ciertos ejemplos, las plantas mutantes pueden suplementarse con zinc durante el crecimiento.

Varios ejemplos se dirigen a métodos para reducir el nivel de expresión de uno o más polinucleótidos que se describen en la presente descripción mediante la integración de múltiples copias del polinucleótido en un genoma vegetal, que comprende: transformar una célula vegetal huésped con un vector de expresión que comprende un promotor unido operativamente a uno o más polinucleótidos que se describen en la presente descripción. El polipéptido codificado por un polinucleótido recombinante puede ser un polipéptido nativo, o puede ser heterólogo a la célula.

Una población de plantas mutantes pueden cribarse o seleccionarse en busca de los miembros de la población que tienen un rasgo o fenotipo deseado. Por ejemplo, una población de la progenie de un solo evento de transformación puede cribarse para buscar las plantas que tienen un nivel deseado de la expresión o actividad del(de los) polipéptido(s) codificados de esta manera. Pueden usarse métodos físicos y bioquímicos para identificar los niveles de expresión o actividad. Estos incluyen análisis de Southern o amplificación por PCR para la detección de un polinucleótido; transferencias tipo Northern, protección de S1 RNasa, extensión de cebadores, o amplificación por RT-PCR para detectar transcritos de ARN; ensayos enzimáticos para detectar la actividad de enzima o ribozima de polipéptidos y polinucleótidos; y electroforesis en gel de proteínas, transferencias tipo Western, inmunoprecipitación, e inmunoensayos con unión a enzimas para detectar polipéptidos. Otras técnicas tales como hibridación in situ, tinción enzimática, e inmunotinción y ensayos de enzimas pueden usarse además para detectar la presencia o expresión o actividad de polipéptidos o polinucleótidos.

En la presente descripción se describe células vegetales o plantas mutantes que comprenden uno o más polinucleótidos recombinantes, uno o más constructos de polinucleótidos, uno o más ARN bicatenarios, uno o más conjugados o uno o más vectores/vectores de expresión.

Sin limitación, las plantas mutantes que se describen en la presente descripción pueden modificarse para otros propósitos ya sea antes o después de que se module la expresión o la actividad de conformidad con la presente descripción. Adecuadamente, las plantas mutantes permanecen como plantas no GMO a pesar de estas modificaciones adicionales. Una o más de las siguientes modificaciones genéticas pueden presentarse en las plantas mutantes. En un ejemplo, uno o más genes que están involucrados en la conversión de intermediarios metabólicos

nitrogenados se modifican lo que da como resultado plantas (tales como hojas) que cuando se curan, producen niveles más bajos de al menos una nitrosamina específica del tabaco que las plantas control. Los ejemplos no limitantes de genes que puede modificarse incluyen, como se describe en la presente descripción, genes que codifican una asparagina sintetasa, tales como *CYP82E4*, *CYP82E5* y *CYP82E10* que participa en la conversión de nicotina a nor nicotina y se describen en los documentos WO2006091194, WO2008070274, WO2009064771 y PCT/US2011/021088 y como se describe en la presente descripción. En otra modalidad, se modifican uno o más genes que están involucrados en la captación de metales pesados o el transporte de metales pesados lo que resulta en plantas o partes de plantas (tales como hojas) que tienen un menor contenido de metales pesados que las plantas control o partes de estas sin la(s) modificación(es). Los ejemplos no limitantes incluyen genes en la familia de proteínas asociadas a la resistencia a multifármacos, la familia de facilitadores de la difusión de cationes (CDF), la familia de proteínas similares a Irt, Zrt (ZIP), la familia de intercambiadores de cationes (CAX), la familia de transportadores de cobre (COPT), la familia de ATPasas tipo P de metales pesados (por ejemplo, HMA, como se describe en el documento WO2009074325), la familia de homólogos de proteínas de macrófagos asociadas a la resistencia natural (NRAMP), y la familia de transportadores de casete de unión a ATP (ABC) (por ejemplo, MRP, como se describe en el documento WO2012/028309, que participan en el transporte de metales pesados, como el Cd. El término metal pesado como se usa en la presente descripción incluye metales de transición. Los ejemplos de otras modificaciones incluyen tolerancia a herbicidas, por ejemplo, el glifosato es un ingrediente activo de muchos herbicidas de amplio espectro. Las plantas transgénicas resistentes al glifosato se desarrollaron mediante la transferencia del gen *aroA* (una glifosato EPSP sintetasa de *Salmonella typhimurium* y *E. coli*). Las plantas resistentes a la sulfonilurea se producen mediante la transformación del gen *ALS* mutante (acetolactato sintetasa) de *Arabidopsis*. La proteína OB del fotosistema II del híbrido *Amaranthus* mutante se transfirió a plantas para producir plantas transgénicas resistentes a la atrazina; y las plantas transgénicas resistentes al bromoxinilo se producen mediante la incorporación del gen *bxn* de la bacteria *Klebsiella pneumoniae*. Otra modificación ilustrativa resulta en plantas que son resistentes a insectos. Las toxinas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) pueden proporcionar una forma efectiva de retrasar la emergencia de plagas resistentes a Bt, como se ilustró recientemente en brócoli donde los genes piramidales *cry1Ac* y *cry1Cde* de Bt controlaron las polillas de dorso de diamante resistentes a cualquiera de las proteínas individuales y retrasaron significativamente la evolución de insectos resistentes. Otra modificación ilustrativa da como resultado plantas que son resistentes a enfermedades causadas por patógenos (por ejemplo, virus, bacterias, hongos). Se modificaron plantas que expresan el gen *Xa21* (resistencia al tizón bacteriano) con plantas que expresan tanto un gen de fusión de Bt como un gen de quitinasa (resistencia al barrenador amarillo del tallo y tolerancia a la cubierta). Otra modificación ilustrativa resulta en una capacidad reproductiva alterada, tal como la esterilidad masculina. Otra modificación ilustrativa resulta en plantas que son tolerantes al estrés abiótico (por ejemplo, sequía, temperatura, salinidad) y se han producido plantas transgénicas tolerantes mediante la transferencia de la enzima de acil glicerol fosfato de *Arabidopsis*; los genes que codifican la manitol deshidrogenasa y sorbitol deshidrogenasa que se implican en la síntesis de manitol y sorbitol mejoran la resistencia a la sequía. Otras modificaciones ilustrativas pueden resultar en plantas con almacenamiento mejorado de proteínas y aceites, plantas con eficiencia fotosintética mejorada, plantas con vida útil prolongada, plantas con contenido de carbohidratos mejorado y plantas resistentes a hongos; plantas que codifican una enzima que se involucra en la biosíntesis de alcaloides. También se contemplan plantas transgénicas en las que se moduló la expresión de S-adenosil-L-metionina (SAM) y/o cistationina gamma-sintasa (CGS).

Uno o más de tales rasgos pueden introgresarse en las plantas mutantes a partir de otro cultivar o pueden transformarse directamente en ellas. La introgresión del(de los) rasgo(s) en las plantas mutantes puede lograrse mediante cualquier método de mejoramiento de plantas conocido en la técnica, por ejemplo, mejoramiento genealógico, retrocruzamiento, mejoramiento por dobles haploides, y similares (ver, Wernsman, E. A., y Ruffy, R. C. 1987. Capítulo Diecisiete. Tobacco. Páginas 669-698 En: *Cultivar Development. Crop Species*. W. H. Fehr (ed.), MacMillan Publishing Co, Inc., Nueva York, N.Y 761 pp.). Las técnicas basadas en biología molecular que se describieron anteriormente, en particular RFLP y marcadores microsatélites, pueden usarse en tales retrocruzamientos para identificar las progenies que tienen el mayor grado de identidad genética con el parental recurrente. Esto permite acelerar la producción de variedades que tienen al menos 90 %, adecuadamente al menos 95 %, más adecuadamente al menos 99 % de identidad genética con el parental recurrente, aún más adecuadamente idénticas genéticamente al parental recurrente, y que comprenden además, el(los) rasgo(s) introgresado(s) a partir del parental donante. Dicha determinación de identidad genética puede basarse en marcadores moleculares conocidos en la técnica.

La última generación de retrocruzamiento puede autofecundarse para proporcionar progenie de mejoramiento pura para el(los) ácido(s) nucleico(s) que se transfiere. Generalmente, las plantas resultantes tienen esencialmente todas las características morfológicas y fisiológicas de las plantas mutantes, además del(de los) rasgo(s) transferido(s) (por ejemplo, uno o más rasgos de un solo gen). El protocolo de retrocruzamiento exacto dependerá del rasgo que se altera para determinar un protocolo de prueba apropiado. Aunque los métodos de retrocruzamiento se simplifican cuando el rasgo que se transfiere es un alelo dominante, también puede transferirse un alelo recesivo. En este caso, puede ser necesario introducir una prueba de la progenie para determinar si el rasgo deseado se ha transferido exitosamente.

Varios ejemplos proporcionan plantas mutantes así como también biomasa en la que el nivel de expresión de polinucleótidos de *NtHMA4* se reduce para reducir el contenido de Cd en el mismo.

Las partes de dichas plantas, particularmente plantas de tabaco, y más particularmente la lámina y la nervadura de las hojas de plantas de tabaco, pueden incorporarse o usarse para fabricar varios productos consumibles que incluyen,

pero no se limitan a, materiales formadores de aerosol, dispositivos formadores de aerosol, artículos para fumar, artículos fumables, productos sin humo, y productos de tabaco. Ejemplos de materiales formadores de aerosol incluyen, pero no se limitan a, composiciones de tabaco, tabacos, extracto de tabaco, tabaco cortado, picadura, tabaco curado o seco, tabaco expandido, tabaco homogeneizado, tabaco reconstituido, y tabacos para pipas. Los artículos para fumar y los artículos fumables son tipos de dispositivos formadores de aerosol. Los ejemplos de artículos para fumar o artículos fumables incluyen, pero no se limitan a, cigarrillos, cigarros y tabaco. Los ejemplos de productos sin humo comprenden tabacos de mascar, y rapé. En ciertos dispositivos formadores de aerosol, en lugar de la combustión (o quemado), una composición de tabaco u otro material formador de aerosol se calienta, por ejemplo, mediante uno o más elementos de calentamiento eléctrico para producir un aerosol. Típicamente en tales artículos para fumar calentados, un aerosol se genera por la transferencia de calor desde una fuente de calor a un sustrato formador de aerosol separado físicamente, que puede localizarse dentro, alrededor o corriente abajo de la fuente de calor. Durante la acción de fumar, se liberan compuestos volátiles desde el sustrato formador de aerosol mediante la transferencia de calor desde la fuente de calor y se arrastran en el aire aspirado a través del artículo para fumar. A medida que los compuestos liberados se enfrían, se condensan, para formar un aerosol que el usuario inhala. Tales dispositivos incluyen, por ejemplo, los dispositivos generadores de aerosol calentados eléctricamente en los cuales un aerosol se genera mediante la transferencia de calor desde uno o más elementos de calentamiento eléctrico del dispositivo generador de aerosol al sustrato formador de aerosol de un artículo para fumar calentado.

En otro tipo de dispositivo formador de aerosol calentado, el aerosol se produce por la transferencia de calor de un elemento combustible carburante o fuente de calor a un material formador de aerosol separado físicamente, que puede localizarse dentro, cerca o corriente abajo de la fuente de calor. Los productos de tabaco sin humo y varios materiales formadores de aerosol que contienen tabaco pueden contener tabaco en cualquier forma, que incluye partículas secas, fragmentos, gránulos, polvos, o una suspensión, depositados, mezclados, rodeados por, o combinados de cualquier otra manera con otros ingredientes en cualquier formato, tales como hojuelas, capas, lengüetas, espumas, o perlas. Como se usa en la presente descripción, el término 'humo' se usa para describir un tipo de aerosol que se produce por los artículos para fumar, tales como cigarrillos, o por combustión de un material formador de aerosol.

En una modalidad, se proporciona además material vegetal curado a partir de las plantas de tabaco mutantes que se describen en la presente descripción. Los expertos en la técnica conocen los procesos de curado de las hojas verdes de tabaco e incluyen sin limitación curado al aire, curado al fuego, curado en atmósfera artificial y curado al sol. El proceso de curado de hojas verdes de tabaco depende del tipo de tabaco cosechado. Por ejemplo, la variedad Burley y ciertas cepas oscuras usualmente, se curan al aire, y el tabaco para pipa, el tabaco de mascar, y el rapé usualmente, se curan al fuego.

Los productos de tabaco sin humo que incorporan plantas de tabaco como se describe en la presente descripción pueden fabricarse en cualquier formato adecuado para la comodidad en la cavidad bucal de un consumidor. Los productos de tabaco sin humo contienen tabaco en cualquier forma, que incluye partículas secas, fragmentos, gránulos, polvos, o una suspensión, depositados, mezclados, rodeados por, o combinados de cualquier otra manera con otros ingredientes en cualquier formato, tal como hojuelas, capas, lengüetas, espumas, o perlas. Los productos de tabaco sin humo pueden envolverse con un material, que puede ser comestible o no comestible. Los contenidos líquidos de los productos de tabaco sin humo pueden encerrarse en una forma, tal como perlas, para impedir la interacción con una envoltura soluble en agua. La envoltura puede tener forma de bolsa para encerrar parcial o completamente las composiciones que incorporan el tabaco, o para funcionar como un adhesivo para contener una pluralidad de lengüetas, perlas, u hojuelas de tabaco. Una envoltura puede encerrar además, una composición de tabaco moldeable que se adapta a la forma de la boca de un consumidor. Una envoltura que puede desintegrarse oralmente puede encerrar tabaco sin humo, por ejemplo, como rapé seco o tabaco soluble, y puede formarse en un equipo de termoformación continua o formación/llenado/sellado horizontal u otro equipo de empaque adecuado mediante el uso de capas comestibles (que pueden contener tabaco o no). Los materiales ilustrativos para construir una envoltura incluyen composiciones de películas que comprenden HPMC, CMC, pectina, alginatos, pululano, y otros polímeros formadores de películas comestibles, comercialmente viables. Las envolturas que no se desintegran oralmente pueden componerse de telas tejidas o no tejidas, de papel recubierto o no recubierto, o de capas plásticas perforadas o porosas de cualquier otra manera. Las envolturas pueden incorporar agentes saborizantes y/o colorantes. Los productos sin humo pueden ensamblarse junto con una envoltura con la utilización de cualquier método conocido por los expertos en la técnica de empaques comerciales, que incluye métodos tales como el empaque de ampolla y el empaque en barras, en el cual puede formarse un pequeño empaque mediante una máquina de empaque de formación/llenado/sellado vertical.

En otra modalidad, se proporciona además material vegetal seco a partir de las plantas mutantes que se describen en la presente descripción. Los expertos en la técnica conocen los procesos de secado de hojas e incluyen, sin limitación, secado al aire y secado al sol. El proceso exacto de secado de hojas depende del tipo de planta que se cosecha. Adecuadamente, el material vegetal se seca después de la cosecha. Por lo tanto, en la presente descripción se contempla el uso de material seco y material seco posterior a la cosecha. El proceso de secado puede activar uno o más genes asociados a la senescencia. La expresión de la actividad de los genes y proteínas que se describen en la presente descripción puede monitorizarse durante el curado o secado.

En otra modalidad, se describen productos de tabaco que incluyen materiales formadores de aerosol que contienen tabaco, que comprenden material vegetal tal como, hojas, hojas curadas o secas adecuadamente, a partir de plantas de tabaco mutantes que se describen en la presente descripción. Los productos de tabaco que se describen en la presente descripción pueden ser un producto de tabaco mezclado que puede comprender, además, tabaco no modificado.

La cantidad de Cd en la planta que se cultivó en el campo, parte de la planta, material vegetal, producto vegetal o producto de tabaco que se describe en la presente descripción puede reducirse en al menos aproximadamente 33 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 % o 95 % o más, cuando se compara con la contraparte de tipo silvestre. A medida que HMA4 actúa en la translocación de Cd de la raíz al brote, reducir o eliminar la actividad o expresión de HMA4 puede conducir a una reducción de la acumulación de Cd en las hojas y a un aumento de la acumulación de Cd en las raíces.

En ciertas modalidades, puede ser conveniente cultivar las plantas que se describen en la presente descripción en presencia de fertilizantes. En una modalidad, el fertilizante puede comprender o consistir en Zn que se añade al campo ya sea antes o durante el tiempo que se cultivan las plantas. Este suplemento puede ayudar a reponer o restaurar el contenido de Zn en la planta mientras todavía tiene niveles reducidos de Cd. Este suplemento puede ayudar a restaurar el fenotipo de la planta mientras todavía tiene niveles reducidos de Cd. La adición del Zn puede aumentar la altura del tallo y/o el peso de la hoja.

Las semillas de las plantas que se describen en la presente descripción pueden acondicionarse y empacarse en material de empaque por medios conocidos en la técnica para formar un artículo de fabricación. Los materiales de empaque tales como papel y tela se conocen bien en la técnica. Un empaque de semilla puede tener una etiqueta, por ejemplo, un marcador o etiqueta asegurado al material de empaque, una etiqueta impresa en el empaque que describe la naturaleza de las semillas en el mismo.

Las composiciones, métodos y kits para genotipar las plantas para la identificación, selección o mejoramiento pueden comprender un medio para detectar la presencia de un polinucleótido (o una de sus combinaciones como se describe en la presente descripción) en una muestra de polinucleótido. En consecuencia, se describe una composición que comprende uno de más cebadores para amplificar específicamente al menos una porción de uno o más de los polinucleótidos y opcionalmente una o más sondas y opcionalmente uno o más reactivos para llevar a cabo la amplificación o detección.

En una modalidad, se proporciona además material vegetal curado o seco a partir de plantas mutantes que se describen en la presente descripción. Por ejemplo, los procesos de curado o secado de hojas de tabaco se conocen por los expertos en el campo e incluyen sin limitación curado al aire, curado al fuego, curado en atmósfera artificial y curado al sol. El proceso de curado de hojas verdes de tabaco depende del tipo de tabaco que se cosechó como se describe en la presente descripción.

En otra modalidad, se describen productos de tabaco que incluye productos de tabaco que comprenden material vegetal tal como, material vegetal curado adecuadamente, tal como hojas curadas o secas, a partir de plantas mutantes que se describen en la presente descripción o que se producen mediante los métodos que se describen en la presente descripción. Los productos de tabaco que se describen en la presente descripción pueden comprender, además, tabaco no modificado.

En otra modalidad, se describen productos de tabaco que comprenden material vegetal, adecuadamente hojas, tales como hojas curadas o secas, a partir de plantas mutantes que se describen en la presente descripción. Por ejemplo, el material vegetal puede añadirse al interior o fuera del producto de tabaco, de modo que al quemarse se libera un aroma conveniente. El producto de tabaco de conformidad con esta modalidad puede incluso ser un tabaco no modificado o un tabaco modificado. El producto de tabaco de conformidad con esta modalidad puede incluso derivarse a partir de una planta mutante que tiene modificaciones en uno o más genes distintos a los genes que se describen en la presente descripción.

La invención se describe adicionalmente en los ejemplos más abajo, que se proporcionan para describir la invención en más detalles. Estos ejemplos, que expone un modo preferido que se contempla en la presente para llevar a cabo la invención, tienen la intención de ilustrar y no de limitar la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Materiales y métodos

Secuencias de *HMA4*

NtHMA4.1 (secuencia de proteínas: SEQ ID NO:1, Genbank: CCQ77798.1; secuencia de nucleótidos: SEQ ID NO:3, Genbank: HF675181.1) y NtHMA4.2 (secuencia de proteínas: SEQ ID NO:2, Genbank: CCW03243.1; secuencia de nucleótidos: SEQ ID NO:4, Genbank: HF937054.1)

Material vegetal

TN90 (PI 543792, TC 586, base de datos USDA-GRIN), K326 (PI 552505, TC 319, base de datos USDA-GRIN). AA37 es presumiblemente un cruce entre un tabaco oscuro sudamericano y un germoplasma Burley americano.

Generación de plantas de ARNi de HMA4

Para la construcción de un constructo de ARNi de *HMA4*, se usa una secuencia del exón 7 de *HMA4.1* (5'-TGAGAGCAAGTCAGGTCATCCGATGGCAGCCGCTCTGGTGGACTATGCACAATCAAATTCGGTTGAGCCAAAGCCTGATAGAGTTGAGCAGTTTCAAATTTTCCTGGTGAAGGGATATTTGGAAGAATTGATGGAATGGAAATCTATGT CGGGAAATAGGAAAATTTCTTCAAGAGCTGGATGTACCACAG-3') en la dirección sentido y antisentido y se emplea parte del intrón adyacente (5'-TAAATGGTTGAATCATTTCTTATGCTCATAGTAGAGATAAAACATCAGAGTTATAATTATAAGTATATGATTCTCCAGTTAATTTGCTGTTAGATTTTCTTTGACCTGTTTAGCTAATGCGG TGGATGTTTGAAT-3') como lazo de horquilla. El constructo está diseñado con sitios Gateway y sintetizado por Genearth (Invitrogen, Life Technologies, Regensburg, Alemania). Luego se transfiere a un vector de expresión mediante el uso de la tecnología Gateway y las enzimas correspondientes (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos). El *Agrobacterium tumefaciens* se transforma con el vector de expresión y se usa para la transformación del disco de hoja de tabaco mediante el uso de métodos que se describieron previamente (Horsch y otros, 1985). Los transformantes primarios T0 se cultivan en el suelo y sus raíces se analizan para determinar la expresión de *HMA4*. Se identifican las líneas con mejor rendimiento (baja expresión de *HMA4*) y las plantas de generación T1 y de tipo silvestre se cultivan en medio de agar y las raíces totales se analizan nuevamente para determinar la expresión de *HMA4*.

Líneas mutantes de EMS y TILLING

Una población mutante se crea mediante el tratamiento de semillas de tabaco AA37 con el agente mutagénico metanosulfonato de etilo (EMS). Una biblioteca de ADN de aproximadamente 9800 plantas que se trataron con EMS de generación M2 (que representan la progenie segregante de 1050 variantes de generación M1) se criba en busca de mutaciones en los dos genes *HMA4*. Se secuencian y analizan cinco amplicones para detectar mutaciones en *HMA4.1* y en *HMA4.2*, respectivamente. Los siguientes pares de cebadores se usan para la amplificación: *HMA4.1*-Exón1: cebador directo 5'-GCATGTTCTTATAAGAGAACTC-3', cebador inverso 5'-GTGAATTTATTTAACAAGCCACA-3'; *HMA4.1*-Exón2: cebador directo 5'-CCAAAATTGTTTCTGCTTCTCC-3', cebador inverso 5'-CGTCATATAAATTGGGACAAAAG-3'; *HMA4.1*-Exón4/5: cebador directo 5'-GTGTCTTTATTTTCTCACTGATA-3', cebador inverso 5'-TAGTGACGTGATTCATAAGACAA-3'; *HMA4.1*-Exón6: cebador directo 5'-ATCAGTCCTTTCACTTGACCC-3', cebador inverso 5'-AACCATTAGAGCCATTTTCAGAA-3'; *HMA4.1*-Exón7/8: cebador directo 5'-GATACTGCAATACAAAAGCACAT-3', cebador inverso 5'-CACTTACTTGGAATACGTTCT-3'; *HMA4.2*-Exón1: cebador directo 5'-TTGCTACTCTGGGTTGCTAC-3', cebador inverso 5'-TCAAGTTTAAAGTTTGCTTCTAC-3'; *HMA4.2*-Exón2: cebador directo 5'-TGTGCATACATAACGTAAATCG-3', cebador inverso 5'-ATCAAATACCACATAAGTAGGG-3'; *HMA4.2*-Exón4/5: cebador directo 5'-TTTAGTCACTTTGACATAAATGG-3', cebador inverso 5'-AAGACAGAGAACAAGTTTCACAT-3'; *HMA4.2*-Exón6: cebador directo 5'-TCAGTCCTTTGCTTGACCT-3', cebador inverso 5'-GAGAATGTGGTACTCGCAAG-3'; *HMA4.2*-Exón7/8: cebador directo 5'-ATACATTGAGGACACATAATCG-3', cebador inverso 5'-TATACCCATTCTGACCCTTG-3'. Los productos de amplificación se secuencian de conformidad con el método de Sanger en ABI XL3730 (Applied Biosystems, Life Technologies, Foster City, CA, Estados Unidos). Los cebadores de amplificación se usan igualmente para la secuenciación, excepto para *HMA4.2*-Exón6, donde se usa un cebador inverso anidado 5'-TTATGAATATATGCTACAAATCAC-3' para la secuenciación. Para seleccionar líneas mutantes con impacto en la función de las proteínas, se eligen mutaciones de parada así como también mutaciones con cambio de sentido.

Condiciones del invernadero para el cultivo de plantas.

Las siguientes soluciones se usan para la fertilización, todas las soluciones se compran a Yara Benelux B.V. (Vlaardingen, Países Bajos): "Curado en atmósfera artificial": macroelementos: 666,5 mg de NO₃- I-1, 18 mg de NH₄+ I-1 (total de 165,39 mg de N I-1), 88,78 mg de P₂O₅ I-1, 306,25 mg de K₂O I-1, 49,99 mg de Mg I-1, 185,61 mg de Ca I-1, 369,60 mg de SO₄2- I-1; microelementos: 0,839 mg de Fe I-1, 0,549 mg de Mn I-1, 0,262 mg de Zn I-1, 0,216 mg de BI-1, 0,048 mg de Cu I-1, 0,048 mg de Mo I-1. "Burley": macroelementos: 850,3 mg de NO₃- I-1, 18,5 mg de NH₄+ I-1 (total de 207,35 mg de N I-1), 91,31 mg de P₂O₅ I-1, 383,65 mg de K₂O I-1, 49,99 mg de Mg I-1, 185,61 mg de Ca I-1, 369,60 mg de SO₄2- I-1; microelementos: 0,839 mg de Fe I-1, 0,549 mg de Mn I-1, 0,327 mg de Zn I-1, 0,324 mg de B I-1, 0,048 mg de Cu I-1, 0,048 mg de Mo I-1. Las líneas de ARNi de *HMA4* se fertilizan en dos experimentos paralelos con solución "Curado en atmósfera artificial" o "Burley". El contenido variable de nitrato en las soluciones no tiene un efecto diferencial sobre los niveles de Cd o el fenotipo de *HMA4*. (Los datos que se presentan en este estudio son de plantas fertilizadas con solución "Curado en atmósfera artificial".) Las líneas AA37 se fertilizan con la solución "Burley". Para la adición de Zn, se aplica 0,1 g de Zn en forma de ZnSO₄.H₂O (Landor, Birsfelden, Suiza), diluido en 100 ml de H₂O. Todas las plantas se cultivan en macetas de 10 l, en un ciclo de luz:oscuridad de 16 h:8 h.

Ensayos de campo

El ensayo de campo se lleva a cabo en un campo en Suiza (Vaud). Todas las plantas se siembran en bandejas flotantes (de conformidad con las prácticas agrícolas) y se cultivan en un invernadero antes del trasplante. Las plantas se agrupan en clases genotípicas. Las plantas se agrupan en unidades experimentales que se repiten seis veces en el campo. En el primer año, para cada combinación de mutaciones, se cultivan 10 plantas que portan ambas mutaciones en un estado homocigótico adyacentes con 10 plantas homocigóticas solo para la mutación en *HMA4.1*, 10 plantas homocigóticas solo para la mutación en *HMA4.2* y 10 plantas que son plantas segregantes nulas para ambos genes *HMA4*. Para los mutantes sin sentido dobles, también se incluyen otros dos genotipos (en tres réplicas): 10 plantas que son mutantes sin sentido homocigóticos para *HMA4.1* y mutantes sin sentido heterocigóticos para *HMA4.2* y 10 plantas que son mutantes sin sentido homocigóticos para *HMA4.2* y mutantes sin sentido heterocigóticos para *HMA4.1*, estos últimos grupos solo contienen un alelo no mutante funcional. En el segundo año, para cada combinación de mutaciones, se cultivan 20 plantas que portan ambas mutaciones en un estado homocigótico adyacentes con 20 plantas que son plantas segregantes nulas para ambos genes *HMA4*. El campo se fertiliza de conformidad con las prácticas estándar para el cultivo Burley.

Dos ensayos de campo se llevan a cabo en un año en dos campos en dos regiones de cultivo de tabaco que contienen alto contenido de cadmio. Para cada combinación de mutaciones, se cultivan 20 plantas que portan ambas mutaciones en un estado homocigótico adyacentes con 20 plantas que fueron plantas segregantes nulas para ambos genes *HMA4*.

Análisis de expresión mediante el uso de qPCR

El ARN total se extrae del tabaco mediante el uso del Kit RNeasy Plant Mini (Qiagen, Hilden, Alemania). El ARN se digiere mediante el uso de la DNasa libre de RNasa RQ1 (Promega, Madison, WI, Estados Unidos) y se transcribe de manera inversa mediante el uso de un cebador oligo dT17, dTNP, Inhibidor de RNasina Plus y Transcriptasa inversa M-MLV, RNasa (H-), mutante de punto (todos de Promega, Madison, WI, Estados Unidos). La qRT-PCR se realiza en el sistema Mx3005P (Stratagene, Agilent, Waldbronn, Alemania). Las reacciones de amplificación se llevan a cabo con el cebador directo de *HMA4.1* (5'-TCATGCAGAAATAAGAAGTGCCAG-3') y el cebador inverso de *HMA4.1* (5'-ATGGATGCTTAGAGAGTCCAGGA-3') o con el cebador directo de *HMA4.2* (5'-GTTATGCGGAAATAAGAAGTGCCCTA-3') y el cebador inverso de *HMA4.2* (5'-CATGGATGCTTAGAGAGTCCAGAC-3') mediante el uso de QRT Low Rox de 2 etapas de SYBR (Thermo Scientific, Surrey, Reino Unido). Se usa como un estándar interno, el gen de actina9 con cebador directo (5'-CTATTCTCCGCTTTGGACTTGGCA-3') y cebador inverso (5'-AGGACCTCAGGACAACGGAAACG-3').

Extracción de ADN y genotipado de plantas

Las muestras de hojas se extraen mediante el uso de BioSprint 96 (Qiagen, Hilden, Alemania) junto con el kit de ADN de plantas BioSprint 96 (Qiagen, Hilden, Alemania). Las muestras de ADN se usan en una reacción TaqMan para determinar el genotipo de la planta. La Taqman se lleva a cabo mediante el uso del sistema de detección de secuencias ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems, Life Technologies, Foster City, CA, Estados Unidos) y la mezcla maestra TaqMan Fast Advanced (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos). Se emplean los siguientes cebadores y sondas de Taqman (Microsynth, Balgach, Suiza) (Applied Biosystems, Life Technologies, Warrington, Reino Unido): *HMA4.1* Q293*: sonda-mutante 5'-AGGATGGCATAGCT-3', sonda de tipo silvestre (WT) 5'-AGGATGGCACAGCT-3', cebador directo 5'-CTGGCACTACAAATCTAAATGGTAGTATAGTATTT-3', cebador inverso 5'-CTGGTGATATAATTTAGCACACTTTGTCG-3'; *HMA4.1* E296K: sonda-mutante 5'-CACAGCTTGTCAAAG-3', sonda WT 5'-CACAGCTTGTCGAAG-3', cebador directo 5'-CTGGCACTACAAATCTAAATGGTAGTATAGTATTT-3', cebador inverso 5'-CTGGTGATATAATTTAGCACACTTTGTCG-3'; *HMA4.1* T402I: sonda mutante 5'-TTTGACAAAACAGGGATTA-3', sonda WT 5'-TTTGACAAAACAGGGACTA-3', cebador directo 5'-CCATGTGTTGCGCACTTTCA-3', cebador inverso 5'-AACTCGGTCACCATAAATTCTCCTT-3'; *HMA4.1* G251D: sonda-mutante 5'-AGAAAACACTGACAGACG-3', sonda WT 5'-AAAACACTGACAGGCG-3', cebador directo 5'-AAGTCGTAAATGTTGATGAAGTCAAGG-3', cebador inverso 5'-CAGCCCAGACCGTTGAATCTC3'; *HMA4.1* V351M: sonda-mutante 5'-CTTTGGTCACATTGGTGAGT-3', sonda WT 5'-TTGGTCACATTGGTGAGT-3', cebador directo 5'-GGCTATATCAGCTTCTTTGGCAATT-3', cebador inverso 5'-AACACATGGCAACTGGTGTAGATAGA-3'; *HMA4.1* G382R: sonda mutante 5'-TTCTGTTTAAAGAGCAGAG-3', sonda WT 5'-TCTGTTTAAAGGAGCAGAGTA-3', cebador directo 5'-CCATGTGTTGCGCACTTTCA-3', cebador inverso 5'-AACTCGGTCACCATAAATTCTCCTT-3'; *HMA4.2* W265*: sonda mutante 5'-ATAGATTCAACGGTCTAGG-3', sonda WT 5'-TTCAACGGTCTGGGC-3', cebador directo 5'-GGTGAAACTATACCTATTGATGGAGTTGTAA-3', cebador inverso 5'-CACTAAATAAATGAAGCATGAAGGAATACTAC-3'; *HMA4.2* Q561*: sonda-mutante 5'-CAACCATGTGTAGGAT-3', sonda WT 5'-TGCCAACCATGTGCAG-3', cebador directo 5'-TTGGTGTAAGAAGCAATGAGAGAG-3', cebador inverso 5'-ATCATTTCAGCGTATTGCAGAAATTT-3'.

Análisis de la composición elemental

En el tiempo de cosecha, las posiciones del tallo medio-inferior de las plantas maduras se cosechan en muestras mezcladas para cada terreno de campo (1 hoja por planta). A partir de plantas de invernadero individuales, se cosechan dos hojas de posición del tallo medio-inferior (la misma posición de la hoja para todas las plantas). El material que se cosechó se seca en el horno a 60 °C hasta que se seca completamente.

El análisis de las muestras se lleva a cabo mediante ALS (Praga, República Checa). Las muestras se homogenizan y mineralizan mediante ácidos y peróxido de hidrógeno antes del análisis. El Zn y Cd se miden mediante espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) de conformidad con CZ_SOP_D06_02_002 (US EPA 200.8, CSN EN ISO 17294-2).

5 Análisis bioinformático

Las puntuaciones de tolerancia a mutaciones se derivan mediante el uso del software SIFT (Ng y Henikoff, 2003), en base a una base de datos de secuencias de plantas de UniProt (descargado el 30 de diciembre de 2012). Las bibliotecas de ARN-seq se fabrican mediante el uso del kit de preparación de muestras de ARN Illumina TruSeq y se secuencian en un Illumina HiSeq-2500. La llamada de base y la desmultiplexación de muestras se realizan mediante el uso del software de control Illumina HiSeq y el software de línea CASAVA. Las lecturas se mapean al genoma publicado previamente (Sierro y otros, 2014) mediante el uso del software Tophat2 (Kim y otros, 2013; versión 2.0.11). La expresión génica diferencial se calcula mediante el uso de Cuffdiff (Trapnell y otros, 2013, versión 2.2.1).

15 Estadísticas

Cuando el valor analítico está por debajo del LOQ, el valor del LOQ se considera para el cálculo y la representación gráfica. Para la evaluación de la significación, se realizan pruebas T bilaterales, mediante el uso de la corrección de Satterthwaite para la heterogeneidad de la varianza. Para los experimentos de campo, se realizaron pruebas t emparejadas en relación con los terrenos de mutantes y sus correspondientes terrenos de control. Los valores de p brutos se calcularon para la probabilidad de que la media sea al azar (mutante) $< 0,8 * \text{media (control)}$, para determinar una reducción significativa de Cd/Zn por debajo de la incertidumbre de medición (20 %).

25 Ejemplo 2 - Identificación de ortólogos de los transportadores de HMA2/3/4 de *A. thaliana* y análisis de expresión de *NtHMA4*

Los transportadores de Arabidopsis HMA2, HMA3 y HMA4 están estrechamente relacionados. Mientras que HMA2 y HMA4 están involucrados en la translocación de Zn y Cd de la raíz al brote (Wong y Cobbett, 2009), HMA3 está en la acumulación de Cd por almacenamiento vacuolar de raíz de Zn, Cd, Co y Pb (Gravot y otros, 2004; Morel y otros, 2009). En base a las secuencias de Arabidopsis, el genoma del tabaco se criba para determinar los ortólogos de *AtHMA2/3/4* supuestos y dos homólogos de HMA4, HMA4.1 y HMA4.2, heredados de *N. sylvestris* y *N. tomentosiformis* respectivamente, se encuentran en *N. tabacum*.

El patrón de expresión de *HMA4.1* y *HMA4.2* se investiga en los dos cultivares principales de tabaco, TN90 y K326. Los tipos de tabaco curado en atmósfera artificial (K326) requieren una fertilización menos rica en nitrógeno en comparación con el tabaco tipo Burley (TN90) (Lewis y otros, 2012). Estas diferencias en las prácticas de fertilización también explican parcialmente por qué se encontró que el contenido de Cd era mayor en el tabaco tipo Burley en comparación con el tabaco curado en atmósfera artificial (Lugon-Moulin y otros, 2006). El patrón de expresión de *NtHMA4.1* y *NtHMA4.2* se analiza en diferentes tejidos de plantas de tabaco TN90 y K326, cultivadas en el campo. En estos dos cultivares, se encuentra que ambos genes se expresan especialmente en los tejidos de las raíces y las flores, pero también en menor medida en todos los demás tejidos (Figura 1). Este patrón está de acuerdo con los datos de expresión de GUS informados por Hussain y otros (2004) para Arabidopsis y por Hermand y otros (2014) para tabaco.

45 Ejemplo 3 - Efecto del silenciamiento de *NtHMA4* sobre la acumulación de Cd de la hoja y el fenotipo

Para evaluar el potencial de los genes de tabaco de *NtHMA4* como dianas para reducir el Cd, los constructos de ARNi se diseñan contra ambos homólogos de *NtHMA4*. Los fragmentos de ADN se clonan en vectores binarios bajo el control del promotor MMV constitutivo (Dey y Maiti, 1999) y se transforman en los dos cultivares TN90 y K326 mencionados anteriormente. Para cada tipo de tabaco, se selecciona una línea de ARNi, en base a la expresión reducida de ambos homeólogos de *HMA4* (Figura 2). Se cultivan en el suelo cinco plantas por línea y sus respectivos controles no transformados, con y sin suplemento de Zn.

Las plantas representativas de cada línea se representan en la Figura 3a. Su contenido respectivo en Cd y Zn se muestra en la Figura 3b y c. Tanto las líneas de ARNi de *HMA4* de TN90 como de K326 son muy bajas en Cd (alrededor del $\text{LOQ}=0,05 \text{ ppm}$) en comparación con las plantas control ($>0,55 \text{ ppm}$ de Cd) en ambos cultivares. Además de esta reducción en Cd de más de 10 veces, se observa una reducción de Zn de alrededor de 4 veces. Con respecto a la biomasa vegetal (altura del tallo y peso de la hoja) la línea de ARNi de *HMA4* de K326 funciona muy bien y no es significativamente más pequeña, con hojas incluso ligeramente más pesadas que las plantas control (Figura 3d, e). La forma de las hojas difiere solo ligeramente, las hojas transgénicas son más redondas con venas más gruesas (Figura 3a). Por el contrario, las líneas de ARNi de *HMA4* de TN90 muestran crecimiento reducido y parches necróticos en las hojas (Figura 3a, d). Las hojas son más gruesas en comparación con el control TN90 WT (Figura 3f). En base a las mediciones de peso seco y fresco, estas plantas exhiben un mayor contenido de agua (Figura 3g). El experimento se repite bajo alta fertilización de nitrato, sin embargo, el suministro de nitrógeno no afecta los niveles de Cd y el fenotipo (datos no mostrados). En conclusión, estos resultados demuestran que silenciar ambos homeólogos de *HMA4*

en ambos cultivares de tabaco reduce el Cd de la hoja más de 10 veces y el Zn alrededor de 4 veces. Sin embargo, a pesar de una reducción similar de Cd/Zn en ambas variedades, los efectos fenotípicos fueron muy diferentes entre K326 y TN90 con un mejor rendimiento de K326.

Curiosamente, se observa que el tratamiento de plantas de ARNi de *HMA4* con Zn repone el contenido de Zn de la planta casi a niveles del control y restaura el fenotipo de la planta normal (Burley) en TN90 mientras se mantienen los niveles de Cd reducidos (Figuras 3a-c, barras sombreadas). La adición de Zn aumenta la altura del tallo y el peso de la hoja en la línea de ARNi de TN90 y disminuye el contenido de agua y el grosor de las hojas tanto en las plantas de ARNi de *HMA4* de TN90 como en K326 (Figura 3d-g, barras sombreadas). Esto muestra que el Zn puede complementar el ARNi de *HMA4* y restaurar el fenotipo WT, manteniendo más del 90 % de reducción del contenido de Cd.

Ejemplo 4 – La reducción de Cd en el campo requiere la combinación de mutaciones de *NtHMA4*

Para el mejoramiento del tabaco, se criba una población EMS del cultivar AA37 en busca de mutaciones en *HMA4*. AA37 es un cultivar que se deriva de un cruzamiento entre un tabaco oscuro sudamericano y un germoplasma Burley americano, por lo tanto, está más estrechamente relacionado con TN90 que con K326 (Fricano y otros, 2012). Los perfiles de expresión comparables sugieren que ambos homeólogos de *HMA4* (Figura 1 y Figura 2) están implicados en la translocación de Zn y Cd de la raíz al brote. Por lo tanto, los exones que codifican dominios catalíticamente importantes se analizan en busca de mutaciones puntuales en ambas copias de *HMA4*. Todas las sustituciones de aminoácidos identificadas en *NtHMA4.1* y *NtHMA4.2* se analizan para determinar el posible impacto sobre la función de las proteínas mediante el uso del programa SIFT (Ng y Henikoff, 2003). Una pequeña puntuación SIFT (<0,05) implica que es probable que un residuo de aminoácido no se tolere al nivel funcional. En *NtHMA4.1* y en *NtHMA4.2* se identifican 36 y 33 mutaciones, respectivamente, que incluyen 2 mutaciones sin sentido en cada uno de los homeólogos y 15 mutaciones con cambio de sentido en cada homeólogo con una relación de puntuación SIFT por debajo de 0,05 (Tabla 10). La puntuación SIFT se usa como una herramienta para facilitar la selección de mutaciones.

Las mutaciones en ambas isoformas de *HMA4* se combinan mediante cruces. Tales cruces incluyen al menos una mutación sin sentido y una segunda mutación que fue una mutación sin sentido o una mutación con cambio de sentido prevista de SIFT. Antes de cada prueba de invernadero y campo, la descendencia segregante se cultiva en bandejas flotantes, se genotipifica mediante el uso de Taqman y se agrupa en clases individuales antes del trasplante al suelo.

En un experimento de invernadero, se prueban seis combinaciones de mutaciones. Para cada uno de ellos, se cultivan ocho plantas que portan dos mutaciones homocigóticas junto con ocho plantas homocigóticas para una sola mutación en *HMA4.1*, ocho plantas homocigóticas solo para una mutación en *HMA4.2* y ocho plantas de segregación nula para ambos genes de *HMA4*. Para los mutantes sin sentido dobles, también se incluyen otros dos genotipos: ocho plantas que son mutantes sin sentido homocigóticos para *HMA4.1* y mutantes sin sentido heterocigóticos para *HMA4.2* y ocho plantas que son mutantes sin sentido homocigóticos para *HMA4.2* y mutantes sin sentido heterocigóticos para *HMA4.1*, estos últimos grupos solo contienen un alelo no mutante funcional. Después de cinco y once semanas de crecimiento en el suelo (a), se cosechan las hojas de la posición del tallo inferior para determinar el peso fresco (b) y el análisis de Cd, Zn (Figura 4c, d).

A diferencia de los mutantes simples sin sentido simples y los mutantes sin sentido con un alelo de *HMA4* funcional, solo el mutante sin sentido doble *HMA4.1* Q293*/*HMA4.2* Q561* muestra una reducción de Cd similar a la reducción que se observó para las plantas de ARNi de *HMA4*. Después de cinco semanas de crecimiento en el suelo, los mutantes sin sentido dobles homocigóticos muestran una reducción de Cd de 0,6 ppm en plantas control a niveles alrededor del límite de cuantificación (LOQ = 0,05 ppm), mientras que el contenido de Zn solo se reduce en un tercio (Figura 4c, d). El análisis de Cd después de once semanas muestra que las plantas de invernadero con crecimiento vegetal adicional diluyeron el Cd en la biomasa creciente. La media de los niveles del control están en alrededor de 0,3 ppm de Cd mientras que las dos líneas mutantes dobles analizadas muestran niveles de Cd por debajo del límite de cuantificación (Figura 4c). Curiosamente, los mutantes sin sentido únicos y las plantas mutantes que portan solo un alelo de *HMA4* funcional muestran contenido de Zn intermedio mientras que exhiben niveles de Cd de control. Estos niveles de Zn parecen suficientes para un crecimiento normal, ya que no se observa diferencia de crecimiento en estas plantas, en comparación con el control. Los mutantes sin sentido dobles homocigóticos por otro lado muestran una reducción del 50 % en el peso de la hoja después de cinco semanas de crecimiento. Sin embargo, después de once semanas, las plantas mutantes alcanzan el mismo tamaño que el control (Figura 4a, b), solo la floración se retrasa ligeramente.

De las otras combinaciones mutantes investigadas después de cinco semanas de crecimiento, otras dos combinaciones (E296K/Q561* y T402I/Q561*) muestran una reducción de Cd similar a la del mutante sin sentido doble mientras que contiene solo un tercio del contenido de Zn de control (Figura 5a, b). Estas dos líneas muestran igualmente un crecimiento retardado: en una etapa temprana T402I/Q561* mostró aproximadamente un 25 % de reducción del peso de la hoja y E296K/Q561* mostró un 50 % de reducción del peso de la hoja (Figura 5c). Después del crecimiento durante seis semanas más, no existen diferencias significativas en el tamaño y la altura de las hojas entre los controles y los mutantes dobles. Sin embargo, en las líneas mutantes dobles la formación de flores se retrasa ligeramente. Otras dos combinaciones de mutaciones (G382R/Q561* y G251D/Q561*) no muestran una reducción

significativa de Cd. Todos los datos de Cd y Zn se resumen en la Tabla 8. Para el grupo de control en la Tabla 8 los valores de todas las plantas control individuales se agrupan entre sí.

5 En conjunto, estos experimentos muestran que ambos genes de *HMA4* necesitan verse afectados al menos parcialmente para reducir significativamente los niveles de Cd.

Ejemplo 5 - Validación de la reducción de Cd en dos ensayos de campo bajo condiciones moderadas de Cd

10 Dos experimentos de campo se realizan en condiciones moderadas de cadmio para confirmar los datos del invernadero. En el primer experimento, los mismos grupos de genotipo (mutantes simples, mutantes dobles y plantas control) se cultivan en seis terrenos replicados. Cada unidad de réplica contiene 10 plantas del mutante doble, el control HMA4 WT y los dos mutantes simples, respectivamente. Para los mutantes sin sentido dobles, también se incluyen los otros dos genotipos que contienen un alelo no mutante funcional (mutantes sin sentido homocigóticos para HMA4.1/ mutantes sin sentido heterocigóticos para HMA4.2 y mutantes sin sentido heterocigóticos para HMA4.1/ mutantes sin sentido homocigóticos para HMA4.2). Las plantas se cultivan durante 14 semanas en un campo en Suiza. Se investigan los fenotipos de las plantas y las hojas en la posición media del tallo se cosechan, se secan y se someten al análisis de Cd/Zn. Los valores de *p* se calculan para la probabilidad de que la reducción observada en Cd en el mutante en más del 20 % en comparación con el control sea al azar.

20 Globalmente, el campo y los datos del invernadero son correspondientes. Mientras los mutantes únicos no muestran ninguna reducción de Cd en comparación con los controles (Tabla 2), las mismas líneas de mutantes dobles que fueron bajas en Cd en el invernadero (T402I/Q561*; E296K/Q561*; Q293*/Q561*), así como también un mutante doble sin sentido adicional (Q293*/W265*), muestran igualmente más de diez veces el contenido de Cd reducido en condiciones de campo con una probabilidad $p < 0,05$ (valordep más alto = 0,0054) de que el valor de la media del mutante doble se reduce al menos un 20 % (Tabla 4). Además de estas cuatro líneas, la línea G251D/Q561* muestra una reducción de Cd del 30 %, sin embargo, en esta línea el contenido de Cd no se reduce significativamente más del 20 % (valor dep = 0,1029). Mientras el contenido de Zn se reduce en aproximadamente un 70 % en el invernadero, las líneas de Cd bajo (T402I/Q561*; E296K/Q561*; Q293*/Q561*; Q293*/W265*) que se cultivaron en el campo muestran solo un máximo de aproximadamente un 50 % de reducción de Zn (Tabla 4). En el primer ensayo de campo, el peso de la hoja se reduce en la línea E296K/Q561*, mientras que en las otras tres líneas de Cd bajo (T402I/Q561*; Q293*/Q561*; Q293*/W265*) el peso de la hoja no se afecta significativamente (Figura 6b). La morfología de las plantas y las hojas no se afecta por las mutaciones. Sin embargo, para las líneas E296K/Q561*, Q293*/Q561* y Q293*/W265*, se observan manchas necróticas en las hojas inferiores, especialmente en una etapa de crecimiento temprano. Los mutantes dobles T402I/Q561* y G251D/Q561* muestran los mejores fenotipos y no muestran lesiones necróticas en ningún momento. Estas dos líneas apenas se distinguen de sus controles.

En un segundo ensayo de campo, las mismas combinaciones de mutaciones se cultivan junto con combinaciones adicionales (18 en total) en el campo. Esta vez, una unidad experimental contiene 20 plantas mutantes dobles de *HMA4* homocigóticas y 20 plantas control de *HMA4* WT. Los mutantes únicos no se analizan de nuevo. Los datos de Cd/Zn se muestran en la Tabla 5; los gráficos de los datos de Cd y los datos fenotípicos se representan en la Figura 7. Las mismas líneas que muestran una reducción de Cd en el primer ensayo de campo muestran nuevamente una reducción de Cd comparable; excepto la línea G251D/Q561* que incluso muestra una reducción de Cd del 70 % esta vez. Además de estas líneas, se analizan una o más mutaciones sin sentido dobles (Q464*/Q561*) y muestra como se esperaba una reducción de Cd muy fuerte del 94 %. Igualmente, la nueva combinación de mutaciones Q293*/G235E muestra una reducción de Cd del 94 %. Las combinaciones de mutaciones Q293*/L223F y Q293*/D234N exhiben reducción de Cd intermedia (37 % y 27 %, respectivamente). Las líneas Q293*/Q561*, Q293*/W265*, Q464*/Q561*, Q293*/G235E, E296K/Q561*, T402I/Q561*, G251D/Q561* y Q293*/L223F muestran una reducción significativa de Cd superior al 20 % ($p < 0,05$; valor de *p* más alto = 0,0007). La línea Q293*/D234N muestra una reducción de Cd del 27 %, pero la reducción no es mayor del 20 % con $p < 0,05$. Todos los demás mutantes dobles que se analizaron solo muestran una reducción de Cd inferior al 20 % y, por lo tanto, no son interesantes para el desarrollo posterior. Las combinaciones de mutaciones Q293*/Q561* y Q293*/W265*, Q464*/Q561*, Q293*/G235E y E296K/Q561* muestran manchas necróticas en las hojas y una reducción de la velocidad de crecimiento en una etapa temprana. Sin embargo, en el tiempo de cosecha, no se observa una diferencia clara entre estos mutantes dobles y sus controles. El peso seco de la hoja de la mayoría de las líneas mutantes en el campo es similar a sus plantas control (Figura 7b). En algunos casos, el peso seco de la hoja difiere ligeramente de los controles, sin embargo, sin correlacionarse con la reducción de Cd.

Ejemplo 6 - Validación de la reducción de Cd en dos ensayos de campo bajo condiciones de Cd alto

60 En dos ensayos de campo pequeño, se cultivan cinco combinaciones prometedoras de mutaciones de Cd bajo (la combinación de mutaciones sin sentido doble Q293*/Q561* así como también las combinaciones Q293*/G235E, E296K/Q561*, T402I/Q561* y G251D/Q561*) así como también sus controles respectivos en dos regiones conocidas por su alto contenido de Cd. Los datos de Cd/Zn se muestran en la Tabla 6; los gráficos de los datos de Cd y fenotípicos se muestran en la Figura 8. Las plantas control acumulan alrededor de 3 ppm de Cd, mientras que el contenido de Cd se reduce en ≥ 80 % y en ≥ 90 % para las combinaciones de mutaciones Q293*/Q561*, Q293*/G235E, E296K/Q561* y T402I/Q561* en la primera (campo 3) y segunda región (campo 4), respectivamente. Para la combinación

G251D/Q561* la reducción de Cd es de alrededor del 45 % en ambas ubicaciones de campo. Para todas las líneas, la probabilidad de que la media esté por debajo del 20 % es significativa ($p < 0,05$; valor de p más alto = 0,0068). No se observa impacto sobre el peso de la hoja (Figura 8b).

En conjunto, los datos de campo muestran que bajo condiciones de campo agrícola, incluso en diferentes regiones, las combinaciones de mutaciones de *HMA4* tienen el potencial de reducir el contenido de Cd de 5 a 10 veces. El desarrollo y el rendimiento de las plantas no parecen verse afectados en una etapa posterior en el cultivar AA37.

Ejemplo 7 - NtHMA4 es la enzima clave para la translocación de Cd de la raíz al brote

En las líneas de ARNi de *HMA4* así como también los mutantes sin sentido dobles de *HMA4* que se describen en la presente descripción, el Cd de la hoja puede reducirse en más de 10 veces, lo que indica que la transferencia de Cd de la raíz a brote en el tabaco es esencialmente dependiente de HMA4. Las mutaciones en ambos genes *HMA4* son necesarias para cultivar el tabaco con bajo contenido de Cd. Bajo condiciones de invernadero y de campo, los mutantes sin sentido dobles de *HMA4* exhiben una reducción de Cd del 90 %. Bajo todas las condiciones de Cd que se probaron, una mutación sin sentido en solo uno de los genes *HMA4* no es capaz de reducir el contenido de Cd en plantas de tabaco.

Curiosamente, bajo condiciones de Cd extremadamente altas de origen no natural, se observó una reducción del 50 % de Cd en plantas que portan solo una mutación sin sentido en uno de los genes de *NtHMA4* (Hermand, 2014). Esto corresponde a lo que se observó en *Arabidopsis*, donde en medio de agar con alto contenido de Cd, la desactivación de *AtHMA4* redujo el contenido de Cd en los brotes en más del 50 %, mientras que la desactivación simultánea de ambos genes transportadores conduce a una reducción aún mayor (Wong y Cobbett, 2009). Nuestro estudio sobre *NtHMA4.1* y *NtHMA4.2* demuestra que los resultados de los sistemas artificiales deben confirmarse en condiciones de suelo y campo para evaluar el impacto de una mutación para el mejoramiento de plantas.

Como para muchas especies de cultivo, existen diversos cultivares de tabaco. Muestran grandes diferencias, por ejemplo, en los requisitos de fertilización y la acumulación de aminoácidos y azúcares (Lewis y otros, 2012). En los tres cultivares que se analizaron, TN90, K326 y AA37, la interrupción de HMA4 muestra un efecto comparable, es decir, en todos estos cultivares se logra una reducción de Cd en más del 90 %. Sin embargo, a pesar del efecto comparable que se observó en la reducción de Cd y Zn, el rendimiento de las plantas es muy diferente. Mientras K326 se ve solo ligeramente afectado por la falta de HMA4, muestra forma de hoja más redonda y aumento de las venas de las hojas con biomasa constante y tamaño de las plantas, TN90 muestra un crecimiento fuertemente reducido y lesiones necróticas, mientras que AA37, que no es una planta Burley típica como TN90, muestra solo efectos pequeños. Esto subraya las diferencias metabólicas entre los cultivares de tabaco con respecto a la homeostasis del Zn. El suministro de Zn al suelo es capaz de restaurar el fenotipo, lo que indica que otros transportadores pueden compensar para HMA4 y mediar la captación de Zn, aunque en un nivel inferior.

Ejemplo 8 - El Cd bajo combinado con el fenotipo no afectado requiere el ajuste con precisión de ambos homeólogos de NtHMA4

Para minimizar los efectos fenotípicos de la doble desactivación de *HMA4*, se identifica una segunda mutación en uno de los genes *HMA4*. El objetivo es que cuando se mejore esta combinación en una variedad de opciones, sea suficiente reducir el Cd significativamente, pero sin afectar el fenotipo vegetal. Mientras en el mutante de EMS AA37 de fondo un efecto es especialmente visible en una etapa de crecimiento temprano, no se puede observar un impacto claro sobre el crecimiento y la biomasa en una etapa posterior. Sin embargo, de conformidad con los datos de las líneas de ARNi de *HMA4* (Figura 3) de conformidad con la variedad de interés y especialmente en las variedades Burley, puede ocurrir un impacto negativo en el crecimiento.

A continuación, se describen combinaciones de mutaciones que se consideran especialmente útiles para el mejoramiento adicional de las plantas. Además de los mutantes de doble desactivación de *HMA4* (Q293*/Q561*, Q293*/W265*, Q464*/Q561*), se identificaron combinaciones adicionales con reducción de Cd comparable (80-90 %):

Mientras que los mutantes dobles E296K/Q561* y Q293*/G235E muestran un fenotipo similar al de los mutantes de doble desactivación en una etapa temprana (lesiones necróticas, crecimiento reducido), las plantas mutantes T402I/Q561* muestran un mejor crecimiento y no exhiben parches necróticos en las hojas en una etapa temprana. La combinación G251D/Q561* proporciona una reducción de Cd del 30 al 70 % y un fenotipo que no puede distinguirse del control. Dos combinaciones de mutaciones más (Q293*/L223F y Q293*/D234N) solo muestran una baja reducción de Cd (37 % y 27 %, respectivamente, en un ensayo de campo).

Se realizó un segundo experimento de invernadero con combinaciones de mutaciones adicionales en las que la combinación H438Y/W265* mostró una reducción de Cd del 58 % y ningún impacto sobre el fenotipo (Tabla 9).

Las combinaciones de mutaciones que se describieron anteriormente ofrecen la posibilidad de dosificar el contenido de Cd y Zn y encontrar la combinación de mutaciones óptima para cada cultivar. Para un cultivar tal como Burley, que

se ve más afectado por la falta de HMA4 como se muestra en líneas transgénicas (Figura 3), podría ser necesario usar una solución intermedia (por ejemplo G251D/Q561*, H438Y/W265*, Q293*/L223F o Q293*/D234N).

A continuación, se investigó la localización de las mutaciones (Figura 9). Las ATPasas de metales pesados comprenden tres dominios que son importantes para la función catalítica: los dominios de fosforilación (P), unión a nucleótidos (N) y accionador (A). El dominio P se compone de las partes de los extremos N- y C- del tercer lazo citoplasmático. La parte central del lazo es el dominio N. Un motivo DKTGT se encuentra en el dominio P. Se predice que el residuo de aspartato en este motivo se fosforile en la enzima activa durante la catálisis. En el dominio A, el lazo TGE(S) catalíticamente activo sobresale de la estructura, que interactúa con el sitio fosforilado en el dominio de unión a ATP (Banci y otros, 2009).

Se encuentran cinco mutaciones funcionales que tienen un impacto en la captación de Cd en el dominio A (accionador) del transportador (L223F, D234N, G235E, G251D, E296K) con G251* que se localiza en el motivo TGES. Se conoce de otros transportadores de HMA que las mutaciones que ocurren en el dominio A desestabilizan el doblez del dominio o afectan las interacciones con los otros dominios de la enzima (Banci y otros, 2009). La mutación T402I se encuentra en el motivo DKTGT, el dominio P (fosforilación) en el tercer lazo citoplasmático de la proteína. La mutación H438Y se encuentra en el motivo HP del dominio N (unión a nucleótidos) en el tercer lazo citoplasmático de la proteína que podría actuar mediante la alteración de la coordinación de nucleótidos.

En conclusión, dos mutaciones son necesarias para inhibir la translocación de Cd, una de ellas es una desactivación completa y la segunda una mutación sin sentido o una con cambio de sentido probablemente ubicada en el dominio A, en el motivo DKTGT del dominio P o en el locus HP del dominio N en la segunda copia de *HMA4*.

En conjunto, este trabajo destaca la necesidad de identificar un sistema adecuado para medir el efecto de las mutaciones de *HMA4* y sus combinaciones sobre el contenido de Cd y el fenotipo. Este trabajo muestra la importancia de ajustar con precisión el sistema de translocación de la raíz al brote de *HMA4* para obtener tabaco con bajo contenido de Cd sin alteraciones fenotípicas para todos los cultivares en interés.

Referencias

- Arnould, S., Delenda, C., Grizot, S., Desseaux, C., Pâques, F., Silva, G.H., y Smith, J. (2011). The I-Crel meganuclease and its engineered derivatives: applications from cell modification to gene therapy. *Protein Eng Des Sel.* 24(1-2):27-31.
- Banci, L., Bertini, I., Cantini, F., Migliardi, M., Natile, G., Nushi, F., y Rosato, A. (2009). Solution structures of the actuator domain of ATP7A and ATP7B, the Menkes and Wilson disease proteins. *Biochemistry* 48(33): 7849-7855
- Bortesi, L., y Fischer, R. (2015). The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnol Adv.* 33(1):41-52.
- Chen, K, y Gao, C. (2014). Targeted genome modification technologies and their applications in crop improvements. *Plant Cell Rep.* 33(4):575-583.
- Chen, L., Hao, L., Parry, M.A., Phillips, A.L., y Hu, Y.G. (2014). Progress in TILLING as a tool for functional genomics and improvement of crops. *J Integr Plant Biol.* 56(5):425-443.
- Dey, N., y Maiti, I.B. (1999). Structure and promoter/leader deletion analysis of mirabilis mosaic virus (MMV) full-length transcript promoter in transgenic plants. *Plant Mol Biol.* 40(5):771-82.
- Fricano, A., Bakaher, N., Del Corvo, M., Piffanelli, P., Donini, P., Stella, A., Ivanov, N.V., y Pozzi, C. (2012). Molecular diversity, population structure, and linkage disequilibrium in a worldwide collection of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) germplasm. *BMC Genet.* 13:18. doi: 10.1186/1471-2156-13-18.
- Gravot, A., Lieutaud, A., Verret, F., Auroy, P., Vavasseur, A., and Richaud, P. (2004). AtHMA3, a plant P1B-ATPase, functions as a Cd/Pb transporter in yeast. *FEBS Lett.* 561(1-3):22-28.
- Hermand, V., (2012) Analyse fonctionnelle de deux Heavy Metal ATPases de *Nicotiana tabacum*. Recuperado de Internet: URL: http://www.supagro.fr/theses/extranet/12-001_0_HERMAND_diffusion.pdf [recuperado el 2016-06-28]
- Hermand, V., Julio, E., Dorlhac de Borne, F., Punshon, T., Ricachenevsky, F.K., Bellec, A., Gosti, F., y Berthomieu, P. (2014) Inactivation of two newly identified tobacco heavy metal ATPases leads to reduced Zn and Cd accumulation in shoots and reduced pollen germination. *Metallomics*, 6(8), 1427-1440.
- Horsch, R. B., Fry, J. E., Hoffmann, N.L., Wallroth, M., Eichholtz, D., Rogers, S. G. y Fraley, R. T. (1985). A Simple and General Method for Transferring Genes into Plants. *Science*, 227, 1229-1231

Hussain, D., Haydon, M.J., Wang, .Y, Wong, E., Sherson, S.M., Young, J, Camakaris J, Harper JF, Cobbett CS. (2004) P-type ATPase heavy metal transporters with roles in essential zinc homeostasis in Arabidopsis. *Plant Cell*, 16(5), 1327-1339.

Kim, D., Pertea, G., Trapnell, C., Pimentel, H., Kelley, R., y Salzberg, S.L. (2013). TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biology* 14:R36.

Korenkov, V., King, B., Hirschi, K., y Wagner, G.J. (2009). Root-selective expression of AtCAX4 and AtCAX2 results in reduced lamina cadmium in field-grown *Nicotiana tabacum* L. *Plant Biotechnol J* 7(3):219-226.

Lewis, R.S., Parker, R.G., Danehower, D.A., Andres, K., Jack, A.M., Whitley, D.S., y Bush, L.P. (2012) Impact of alleles at the Yellow Burley (Yb) loci and nitrogen fertilization rate on nitrogen utilization efficiency and tobacco-specific nitrosamine (TSNA) formation in air-cured tobacco. *J Agric Food Chem.* 60, 6454-6461.

Liedschulte, V., Laparra, H., Battey, J., Goepfert, S., y Bovet, L. Missense or nonsense mutations in either *HMA4.1* or *HMA4.2* do not significantly reduce cadmium content in the leaves of tobacco plants grown under field conditions. Poster session presented at: The 12th Solanaceae conference; 2015 Oct 25-29; Bordeaux, France.

Lugon-Moulin, N., Martin, F., Krauss, M.R., Ramey, P.B., y Rossi L. (2006) Cd concentration in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) from different countries and its relationship with other elements. *Chemosphere* 63, 1074-1086.

Morel, M., Crouzet, J., Gravot, A., Auroy, P., Leonhardt, N., Vavasseur, A., y Richaud, P. (2009). AtHMA3, a P1B-ATPase allowing Cd/Zn/Co/Pb vacuolar storage in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, 149(2),894-904.

Ng, P.C., y Henikoff, S. (2003). SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res.* 31(13):3812-4.

Petolino, J.F. (2015). Genome editing in plants via designed zinc finger nucleases. *In Vitro Cell Dev Biol Plant.* 51(1):1-8.

Puchta, H., y Fauser, F. (2013). Gene targeting in plants: 25 years later. *Int J Dev Biol.* 57(6-8):629-37.

Qiwei, S., y Caixia, G. (2015). Research progress of genome editing and derivative technologies in plants. *Yi Chuan.* 37(10):953-973.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., y Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 9, 671-675, 2012.

Sierro, N., Battey, J.N.D., Ouadi, S., Bakaher, N., Bovet, L., Willig, A., Goepfert, S., Peitsch, M.C., y Ivanov, N.V. (2014) The tobacco genome sequence and its comparison with those of tomato and potato. *Nature Communications* 5, Article number: 3833

Trapnell, C., Hendrickson, D., Sauvageau, M., Goff, L., Rinn, J.L., y Pachter, L. (2013). Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq. *Nature Biotechnology* 31: 46–53.

Wong, C.K., y Cobbett C.S. (2009) HMA P-type ATPases are the major mechanism for root-to-shoot Cd translocation in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.*, 181(1), 71-78.

Wright, D.A., Li, T., Yang, B., y Spalding, M.H. (2014) TALEN-mediated genome editing: prospects and perspectives. *Biochem J.* 462(1):15-24.

Cualquier publicación citada o que se describe en la presente descripción proporciona información relevante que se describió antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Las declaraciones en la presente descripción no deben interpretarse como una admisión de que los inventores no tienen derecho a anteceder tales descripciones.

SECUENCIAS

SEQ ID NO:1

Secuencia de aminoácidos de la ATPasa de metales pesados de *Nicotiana tabacum*(NtHMA4.1) núm. de acceso de GenBank: CCQ77798.

```

1 MVESEKMMNET KNLSKSYFDV LGICCTSEVV LVEKILKNLE GVKEVSVIVT TKTIVIVINDS
61 LLISFQQIVK ALNQARLEAS IRVKGEKNYQ KKWPSFFAIG SGILLGLSFL KYFFAPFQWL
121 ALAAVAVGIP PIIFRGVAAV RNLTLDINIL VLIAVAGSIV LHDYWEAGTI VFLFTIAEWL
181 ESRASHKATA AMSSLVNIVP PTAVLAESGE VVNVDVKNL SILAVKAGET IPIDGVVMEG
241 ECDVDEKTLT GESFPVSKQI DSTVWAGTTN LNGYISVKT ALAEDCAVAR MAQLVEDAQN
301 KKSKTORYID KCAKYTPAI VAISASLAIV PTALRVHNRN EWYRLALVTL VSACPICALVL
361 STPVAMCCAL SKAATSGLLF KGAEYLETLA KIKIMAFDKT GTITRGEFMV TEFKSLVDGL
421 GLNTLLYWVS SIESKSGHPM AAALVDYAQS NSVEPKPDRV EQFQNFPGEG IFGRIDGMEI
481 YVGNRKISSR AGCTTVPEIE GDSFQKGSVG YIFLGSSPAG IFGLSDVCRI GVKEAMRELK
541 QMGIKTAMLT GDCYAAANHV QDQLGGAMDE FQAELLPEDK ATIIGKFQKE APTAMIGDGL
601 NDAPALATAD IGISMGISGS ALAKETGHVI LMTNDIGRIP KAARLARRVR RKIVENMIIS
661 VVTKAAIVAL AIAGYPLVWA AVLADTGTCL LVILNSMLLL RVGTHRHGKK CCRSATPSHA
721 PNHKDKASCC KSENAPQLCC SDIESQKKCT SQSCSSEVCV PRCQPVSSGS KSCGNNQCPD
781 SVENSGFHSR PRPQCCSSKM ASKACQSAVS ESKSCGNNQC PDSVENSGFH SHPRPQCCSS
841 KMASKACQSA VSESKSCGNN QCPDSVENSG FHSHPRPQCC SLKMASKACQ SAVSESKSCG
901 NNQCPDSVEN SGFHSHPRPQ CCSSKMAAKA CQSAVSESKS CGNNNCSESI YKSSCHSLTS
961 SLVCSSKMSA PQCHSATSSS KSCGSTKCSN FSDKKCCQYD KIPQTCSTKK SAPGCQSAVS
1021 GSKSCGDSKC SSKDNSSHP SHPDHQICTS KLCAPQSQA TSSSRTCGNM KCSDTNSKNS
1081 CYSHTNSESC SSKMSGPACK TANSGRLCTG NKKCLDSANE NSFHSLTNPL CEELLEKES
1141 LDLARKDRES NHDLSHGCS D EHDHLNLDK AHDSCALQEC CYSVQGNKTD VSETGIQEA
1201 HCD SINQTCQ TAISGSMTCG NNKSLDSL SI HGCHSHDSL H KESNLEQKS LDVAGEGKS
1261 PHAVGQGCSD KEHNHSHPEK AYDSCATDDC CFSVQVHGID DVSRSEIQET AHCDSTKQST
1321 VIPSSCEHEP KDQVNHCGSH SKSIPTDEEL AKLVRRCKY KPCHDVRS GC RKHAAECGPT
1381 VRSTINILRD NHHHLDCSG RKVCSLLEKR HIGGCCDSFR KECCAKNNHL GASFGGLSE
1441 IVIE

```

SEQ ID NO:2

Secuencia de aminoácidos de la ATPasa de metales pesados de *Nicotiana tabacum*(NtHMA4.2) núm. de acceso de GenBank: CCW03243.1.

```

1 MVESEKMMNDT KNLSKSYFDV LGICCTSEVV LVEKILKNLE GVKEVSVIVT TKTIVIVINDS
61 LLISQQQIVK ALNQARLEAS IRVKGEKNYQ KKWPSPPFAIG SGILLGLSFL KYFFAPFQWL
121 ALAAVAVGIP PIIFRGVAAV RNLTLDINIL VLIAVTGSIV LHDYWEAGTI VFLFTIAEWL
181 ESRASHKATA AMSSLVNIVP PTAVLAESGE VVNVDVKNL SILAVKAGET IPIDGVVMEG
241 ECDVDEKTLT GESFPVSKQI DSTVWAGTTN LNGYISVKT ALAEDCAVAR MAQLVEDAQN
301 KKSKTORYID KCAKYTPAI VAISASLAIV PTALRVHNRN EWYRLALVTL VSACPICALVL
361 STPVAMCCAL SKAATSGLLF KGAEYLETLA KIKIMAFDKT GTITRGEFMV TEFKSLVDGL
421 GLNTLLYWVS SIESKSGHPM AAALVDYAQS NSVEPKPDRV EQFQNFPGEG IFGRIDGMEI
481 YVGNRKISSR AGCTTVPEIE GDSFQKGSVG YIFLGSSPAG IFGLSDVCRI GVKEAMRELK
541 QMGIKTAMLT GDCYAAANHV QDQLGGAMDE FQAELLPEDK ATIIGKFQKE APTAMIGDGL
601 NDAPALATAD IGISMGISGS ALAKETGHVI LMTNDIGRIP KAARLARRVR RKIVENMIIS
661 VVTKAAIVAL AIAGYPLVWA AVLADTGTCL LVILNSMLLL RVGTHRHGKK CCRSATPSHA
721 PNHKDKASCC KSENAPQLCC SDIESQKKCT SQSCSSEVCV PRCQPVSSGS KSCGNNQCPD
781 SVENSGFHSR PRPQCCSSKM ASKACQSAVS ESKSCGNNQC PDSVENSGFH SHPRPQCCSS
841 KMASKACQSA VSESKSCGNN QCPDSVENSG FHSHPRPQCC SLKMASKACQ SAVSESKSCG
901 NNQCPDSVEN SGFHSHPRPQ CCSSKMAAKA CQSAVSESKS CGNNNCSESI YKSSCHSLTS
961 SLVCSSKMSA PQCHSATSSS KSCGSTKCSN FSDKKCCQYD KIPQTCSTKK SAPGCQSAVS
1021 GSKSCGDSKC SSKDNSSHP SHPDHQICTS KLCAPQSQA TSSSRTCGNM KCSDTNSKNS
1081 CYSHTNSESC SSKMSGPACK TANSGRLCTG NKKCLDSANE NSFHSLTNPL CEELLEKES
1141 LDLARKDRES NHDLSHGCS D EHDHLNLDK AHDSCALQEC CYSVQGNKTD VSETGIQEA
1201 HCD SINQTCQ TAISGSMTCG NNKSLDSL SI HGCHSHDSL H KESNLEQKS LDVAGEGKS
1261 PHAVGQGCSD KEHNHSHPEK AYDSCATDDC CFSVQVHGID DVSRSEIQET AHCDSTKQST
1321 VIPSSCEHEP KDQVNHCGSH SKSIPTDEEL AKLVRRCKY KPCHDVRS GC RKHAAECGPT
1381 VRSTINILRD NHHHLDCSG RKVCSLLEKR HIGGCCDSFR KECCAKNNHL GASFGGLSE
1441 IVIE

```

SEQ ID NO:3

Secuencia de polinucleótidos de la ATPasa de metales pesados de *Nicotiana tabacum*(NtHMA4.1) núm. de acceso de GenBank: HF675181.1.

ES 2 989 556 T3

1 agagsaggag aaaaatgggtg gaaagtga aaatgaatga aacaaagaag ttgagcaaga
 61 gctattttga tgttttggga atttgtgtga cttcagsagt tgttctagtt gaaaaaattc
 121 tcaagaatct tgaagggtt aaagagggtt cagtaattgt cacaacaaag actgtcattg
 181 ttattcatga ttctctctc atttctcgc aacaaattgt taaagcattg aatcaagcaa
 241 gattagaagc aagcatasga gtgaaggag agaaaaacta ccaaaagsaa tggccaagt
 301 catttgcaat tggcagtgga atattgtttg gactctcatt tttgaagta ttttttgca
 361 ctttccaatg gtttagcatt gcagctgttg cagttgggat tctccaatt atttttagag
 421 gtgtggctgc cgtgggaac ctcactcttg acatcaacat tcttgtttta atagcagtgg
 481 ctggatcaat tgtttttcac gattattggg aagctggtao tttgtcttc ttattcgcaa
 541 ttgcagaatg gotagagta agggcaagtc acaaggctac cgtgctatg tcatcactgg
 601 tcaatatagt cctccaaca gcagttttag ctgaagggg agaagtogta aatgttgatg
 661 aagtcaaggt gaatagcatt cttgctgtga aagctggta aactatacct attgatggag
 721 ttgtagtga aggggaatgt gacgtggag agaaaaact gacaggcag tctttccag
 781 ttctcaagca aagagattca cgggtctggg ctggcaacta aaactaaat ggtatatca
 841 gtgttaagac tacggctttg gctgaagatt gtgoggtggc taggatggca cagcttgctg
 901 aagatgctca gaacaagaaa tcaaaaaccc aagatatac cgaagctgt gctaastatt
 961 atacaacagc aattgtggct atactagctt ctttggcaat tgttctact gcatcaagag
 1021 ttcacaatcg aaatgaatgg tatcgtttgg ctttggtao attgggtagt gcatgtcgt
 1081 gtgcacttgt tctctctaca ccagttgcca tgtgttgogc actttcaaa gcagcaactg
 1141 cgggtcttct gttaaaagga gcagagtacc ttgagactct agctaaaac aaatcattgg
 1201 cttttgacaa aacagggact ataactaaag gagaatttat ggtgacagag ttcaagtctc
 1261 tgattgatgg ttttagtctc actacactgc tttactgggt ttcaagcatt gagagcaagt
 1321 caggctctcc gatggcagcc gctctgttg actatgcaca atcaaatcc gttgagcaa
 1381 agcttgatag agttgagcag tttcaaaatt tctctgtga agggatattt ggaagaattg
 1441 atggaatgga actctatgct gggaaatgga aaattttctc sagagctgga tgtccacag
 1501 taccagaat agagggtgat agtttcaag gaaagtctgt tggatacata ttttgggat
 1561 catctccagc tggaaatttc agtcttccg atgtttgtog aattgggtga aaagaagcaa
 1621 tgagagaact gaagcagatg ggtatcaaaa ccgcatgct tactgtgat tgttatgag
 1681 ctgccaacca tgtgcaggat cagttaggtg gagctttgga tgaatttcaa gcagaactcc
 1741 taccagagga caaggcaaca atcatcaagg gttttcagaa ggaagctcca acagcgatga
 1801 tagggaagc ccttaatgat gctctgcat tagcaacagc tgcatttggc atctcatgg
 1861 gaactctctg gtcagctctc gctaaagaaa caggcatgt tatactaatg acaaatgaca
 1921 tcggaagaat accgaaagct gcaagctctg ctagaagagt tgaaggaag attgttgaga
 1981 atatgatatt atcagctgtt acaaggctg ccatagttgc attggcaata gcaggttato
 2041 cattgttttg gctgtctgtc ctgcagata ctgggacatg cttgctagtg attttgaaca
 2101 gcatgctact tctacagaga ggcacagca gacatggga aaatgttg agatcttcta
 2161 ctctctcgca tgcctccac cacaagaca aagcttcagc ttgcaagtc gaaaatgctc
 2221 ccagctgtg ttgctctgat attgagtcac aaagaaatg tacaagtaa tcatgctcgt
 2281 ccaggtgtg tgttcaaga tgtcaacctg tctctcagg atcaaatgca tgtggaata
 2341 atcagtgccc agactcatt gaaatagtg gttttcattc tctcgcgt cctcaatgct
 2401 gctcgtcgaa gatggctgt aaagcatgca aatctgcagt ttcaaatca aagctatgog
 2461 gaaataatca gtgcccagac tccgttgaaa atagtgttt tcatctcat cccgtctg
 2521 aatgtgtctc gtgaagatg gctgctaag cgtgccaac tgcagttca gaatcaaggt
 2581 catgtggaaa taatcagtg ccagactccg ttgaaaatag tggtttctat tctcatccc
 2641 guctccatg ctgttcatg sagatggctg ctgaagcagg ccaatctgca ctttcagaat
 2701 caaagtcatt tggaaataac aattgtcag actcattca caagagtaat tgtcattctt
 2761 taactaactc tctagtatgt tcttcaaga tgtctgctcc acaatgtcat tctgctactt
 2821 caagcaacaa atcatgtgga agtaaccaat gctcagactt cagtgaacaa aaatgttctc
 2881 aatccagaaa aattctcaa acgtgctota caaagaagtc tgtccagga tgtcaatctg
 2941 cagtttctgg gtctaaatca tgtggaata gcaagtgttc agactcaaa gacaatagta
 3001 gcatctctc acatccagat catcaaacat gcatgtctaa gttgtgtgt ccaacaagcc
 3061 aatctgcaac ttcaagctcc aggcactgtg gaaatacaaa gtgctcggac acaaatagca
 3121 agaattcttg ttattccaaa accaactctg aatcatgctc ttcaagatg tctggtccat

ES 2 989 556 T3

3181 catgcaaaac tgctaattca ggttcaagggt catgcagaaa taagaagtgc caggactctg
 3241 caaccgagaa cagttttcat tcaccactta ctaatccact cagtggggaa aagctttcgg
 3301 agcagaaaaag cttggattta gtccgaaaag ataaggaatc aagtcatgat cttcgtcatg
 5 3361 gctgctctga cgaggaacat gatcatacaa atttagacaa ggcatatgac agttgtgcct
 3421 tacaagaatg ttgttattcg gttcaaggca ataaaactga tgtatcagaa actggaatcc
 3481 aggaaaactgc tcattgtgac agcaccaatc aaacatgcc aactgcaagt tcaggatcga
 10 3541 tgacatgcgg aaatgataag atcctggact ctctaagcat ccatggttgt cattcgcgatg
 3601 ataatccact ccacgaggag aacaacttgg agcagaaaat cttggatggt gttggagaag
 3661 gtataaaaatc acctcatgct gtcggtcatg gctgttcgga caaggaacac gatcactcac
 3721 atccagaaaa ggcatatgac agttgtgcaa cagatgattg ttgtttttca gttcaagtcc
 15 3781 atggcattga cgacgtatca aaaagtgaat ttcaagaaac tgctcattgt gacagcacia
 3841 agcagagcat ggtcatctcc agcagctgca aacatgaacc aaaagatcag gtaaactcact
 3901 gtggacttca ctctaaaact actccaactg atgaagaact agccaagctg gttagaagat
 3961 gctgcaaata caaaccatgc cagcagctcc gttctggctg caggaagcat gctgcagaat
 20 4021 gtggtccaac cgttcgatca accatcaata tcttacggga caaccatcat cattacctag
 4081 actgcagtgg tcgtaagggt tgttcgctgt tggagaagag acacatcggg ggatgctgtg
 4141 acagcttcag aaaagaatgt tgtgccaaga aaaaacacct tggagcaagt tttggaggag
 25 4201 gtttatcaga aattgtcata gtagtagatgc aatccgaagt gtacat

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 989 556 T3

SEQ ID NO:4

Secuencia de polinucleótidos de la ATPasa de metales pesados de *Nicotiana tabacum*(*NtHMA4.2*) núm. de acceso de GenBank: HF937054.1.

```

5      1 atagaaagaa gagaatggtg gaaagtgaga aaatgaatga cacaaagaat ctgagcaaga
      61 gctatatttga tgttttggga atttgctgta cttcagaagt tgttcttgtt gaaaaaatc
     121 tcaagaatct tgaaggggtt aaagaggttt cagtaattgt cacaacaaag actgtcattg
10    181 ttattcatga ttctctctc atttctcagc aacaaattgt taaagcattg aatcaagcaa
     241 gattagaagc aagtataaga gtgaaaggag agaaaaacta ccaaagaaa tggccaagtc
     301 catttgcaat tggcagtgga atattgcttg gactctcatt tttgaagtac ttttttgcac
15    361 ctttccaatg gttagcactt gcagctgttg cagttgggat tcttccaatt attttttaggg
     421 gtgtggctgc cgtgcgaaac ctactcttg acatcaacat tcttgtttta atagcagtga
     481 cgggatcaat tgttttacac gattattggg aagctggtac tattgtcttc ttattcacca
     541 ttgcagaatg gctagagtca agggcaagtc acaaggctac tgctgctatg tcatcactgg
20    601 tcaatatagt ccctccaaca gcagttttag ctgaaagtgg agaagtcgta aatggtgatg
     661 aagtcaagtt gaatagcatt cttgctgtta aagctggtga aactatacct attgatggag
     721 ttgtaatgga aggggaatgt gacgtggacg agaaaacact gacaggcgag tcgtttccag
     781 tttctaagca aatagattca acggtctggg ctggcactac aaatctaaat ggctatatca
25    841 gtgttaagac tacggctttg gctgaagatt gtgcggtggc taggatggcg cagcttgctg
     901 aagatgctca gaacaagaaa tcaaaaaccc aaagatacat tgacaagtgt gctaaatatt
     961 atacaccagc aattgtggct atatcagctt ctttggaat agttcctact gcattaagag
30   1021 ttcacaatcg aaatgagtgg tatcgcttg ctttggtcac gttggtgagt gcatgtccgt
    1081 gtgcacttgt gctatctaca ccagttgcca tgtgttgtgc actttctaaa gcagcaacgt
    1141 ccggtcttct gtttaaagga gcagagtacc ttgagactct tgctaaaatc aaaatcatgg
    1201 cttttgacaa aacagggaact ataactagag gagaatttat ggtgaccgag ttcaagtctc
35   1261 tggttgatgg tcttggtctc aatacactgc tttactgggt ttcaagtatt gagagcaagt
    1321 caggatcatc gatggcagcc gctctggttg actatgcaca atcaaattcc gttgagccaa
    1381 agcctgatag agttgagcag tttcaaaatt ttctggtga agggatattt ggaagaattg
40   1441 atggaatgga aatctatgtc gggaatagga aaatttcttc aagagctgga tgtactacag
    1501 taccagaaat agaggggtgat agtttccaag gaaagtctgt tggatacata tttttgggat
    1561 catctcccgc tggaattttc ggtctttcog atgtttgtcg aattggtgta aaagaagcaa
    1621 tgagagagct gaagcagatg ggtatcaaaa ccgcgatgct tactggtgat tgttatgcag
45   1681 ctgccaacca tgtgcaggat cagttaggtg gagctatgga tgaatttcaa gcggaactct
    1741 taccagagga caaggcaaca atcatcaagg gttttcagaa ggaagctcca acagcgatga
    1801 taggcgacgg ccttaatgat gctcctgcat tagcaacagc tgacattggc atctcaatgg
50   1861 gcatctctgg gtcagctctc gcgaaagaaa caggccatgt tataactaatg acaaatgaca
    1921 tcggaagaat accaaaagct gcacgtcttg ctagaagagt tcgaaggaag attggtgaga
    1981 atatgattat atcagtcggt acaaaggccg ccatagttgc attggcaata gcaggttatc
    2041 cattggtttg ggctgctgtc ctgcgggata ctgggacatg cttgctagtg atcttgaaca
55   2101 gcatgctact tctacgagta ggacacaca gacatgggaa aaaatgttgt agatctgcta
    2161 ctcttctgca tgctcccaac cacaaagaca aagcttcttg ttgcaagtgc gaaaatgctc
    2221 cgcagctgtg ttgctctgat attgagtcac aaaagaaatg tacgagtcaa tcatgctcgt
    2281 ccgaggtgtg tgttccaaga tgtcaacctg tctcctcggg atcaaagtca tgtggaaata
60   2341 atcagtgcc agactccgtt gaaaatagtg gttttcatc tcatccccgt cctcaatgct

```

65

2401 gctcgctcgaa gatggcttct aaagcatgcc aatctgcagt ttcagaatca aagtcagtgtg
 2461 gaaataatca gtgccagac tccgttgaaa atagtgggtt tcattctcat ccccgccctc
 2521 aatgctgctc gtctaagatg gcttctaag catgccaatc tgcagtttca gaatcaaagt
 5 2581 catgtggaaa taatcagtgc ccagactccg ttgaaaatag tggttttcat tctcatcccc
 2641 gtcctcaatg ctgctcggtg aagatggctt ctaaagcatg ccaatctgca gtttcagaat
 2701 caaagtcagt tggaaataat cagtgccag actccgttga aaatagtggg tttcattctc
 10 2761 atccccgtcc tcaatgctgc tcgtcgaaga tggctgctaa agcatgccaa tctgcagttt
 2821 cagaatcaaa gtcagtgtga aataacaatt gctcggagtc catttacaag agtagttgtc
 2881 attctttaac aagttctcta gtatgttctt ccaagatgtc tgctccacaa tgtcattctg
 2941 ccaactcaag ctccaaatca tgtggaagta ccaagtgtc caacttcagt gacaaaaaat
 15 3001 gttgccata tgacaaaatt cctcaaactg gctctacca gaagtctgct ccaggatgtc
 3061 aatctgcagt ttctgggtct aaatcatgtg gagatagcaa gtgttcagac tcgaaagaca
 3121 atagtagcca tcttccacat cccgatcatc aaatatgcac gtctaagttg tgtgctccac
 20 3181 aaagccaatc tgcaacttca agctccagga catgtggaaa tatgaagtgc tcggacacca
 3241 atagcaagaa ttcttgttat tcacatacca actctgaatc atgctcttca aagatgtctg
 3301 gtccagcatg caaaactgct aattcagggt caaggttatg cggaaataag aagtgcctag
 3361 actctgcaaa cgagaacagt tttcattcac ttactaatcc actctgtgag gaaaagcttt
 25 3421 tggagaagga aagcttggat ttagcccgaa aagataggga atcaaatcat gatcttagtc
 3481 atgggtgtct tgacgaggaa catgatcatc taaatttaga caaggcacat gacagttgtg
 3541 ccttacaaga atgttgttat tctgttcaag gcaataaaac tgatgtatca gaaactggaa
 3601 tccaggaagc tgctcattgt gacagcatca atcaaacatg ccaaactgca atttcaggat
 30 3661 caatgacatg cggaaataat aagagtctgg actctctaag catccatggg tgtcattcac
 3721 atgatagtcc actccacaag gagagcaact tggagcagaa aagcttggat gttgctggag
 3781 aagggtataaa atcacctcat gctgtcggtc aaggctgttc ggacaaggag cacaatcaat
 35 3841 cgcattccaga aaaggcgtat gacagttgtg caacagacga ttgttgtttt tcagttcaag
 3901 tccatggcat tgacgacgta tcaagaagtg aaattcaaga aactgctcat tgtgacagca
 3961 caaacagag cacggtcatc cccagcagct gcgaacatga accaaaagat caggtaaact
 4021 actgtggatc tcaactctaaa agtattccaa ctgatgaaga actagccaag ctggttagaa
 40 4081 gatgctgcaa atacaaacca tgccacgatg tccgctctgg ctgcaggaag catgctgcag
 4141 aatgtggtcc aaccgttcga tcaaccatca atatcttacg ggacaacat catcatcatc
 4201 tagactgcag tggctgtaag gtttgttcgc tgttgagaa gagacacatt ggtggatgct
 4261 gtgacagctt cagaaaagaa tgttgtgcca agaacaatca ccttgagca agtttggag
 45 4321 gaggtttatc agaaattgtc atagagtaga tgcaatctga agtgtacata tgttgt

Tabla 1

Mutación	Denominación de la mutación (WO'913)	Nivel de Cd en la hoja (ppm)	% de reducción de Cd frente al control	Nivel de Zn en la hoja (ppm)	% de reducción de Zn frente al control
Control	E3-277-tipo silvestre	92,3 ± 26,5 (media ± DE, n=4)	-	92	
R529* homocigótico	E3-277 - Mutante (HMA-DT R342*)	7,2 (media, n=2)	92 %	62,3	32 %
Control	BB16NN (Control)	~560	-		
E387K homocigótico	276B5 (Hma-B E200K)	~160	~71 %		
E387K homocigótico	276B8 (Hma-B E200K)	~250	~55 %		
E387K homocigótico	276B18 (Hma-B E200K)	~250	~55 %		
Control	277S (tipo silvestre)	525,0	-		
R529* heterocigótico	277Htz (HMA-DT R342*)	232,6	56 %		
Control	425S (tipo silvestre)	207,0	-		

W265* homocigótico	425M (Hma-AS W78*)	36,1	83 %		
Control	90S (tipo silvestre)	77,2	-		
L294F homocigótico	90M (HMA-AS L107F)	25,7	67 %		

Resumen de los datos de Cd y Zn en mutantes de HMA únicos como se describe en el documento WO2012/041913A1. La denominación de los mutantes en el documento WO'913 difiere de la denominación de los mutantes en la presente descripción y los mutantes que se describen en Hermand y otros, 2014. Esto se debe a la secuencia incompleta que se usó en el documento WO'913. En la primera columna, se usa la denominación estándar correspondiente.

Tabla 2

Mutación	Nivel de Cd en los brotes (ppm)	% de reducción de Cd frente al control	Nivel de Zn (ppm)	% de reducción de Zn frente al control
Control	~135	-	2300	-
P294S con cambio de sentido	~50	63 %	2900	0 %
E387K con cambio de sentido	~70	48 %	1700	26 %
W265* sin sentido	~50	63 %	1100	52 %
G515R con cambio de sentido	~70	48 %	2000	13 %
R259* sin sentido	~60	56 %	1500	35 %

Resumen de los datos que se informan en las Figuras 4a y 4c de Hermand y otros. (2014) *Metallomics*. 6(8): 1427-1440

Tabla 3

Ensayo de campo 1 (región con Cd moderado): Datos de campo de mutantes únicos

Mutación	Control: Nivel de Cd en la hoja (ppm)	Mutante: Nivel de Cd en la hoja (ppm)	% de reducción de Cd en mut frente a ctrl	valor de p	Control: Nivel de Zn en la hoja (ppm)	Mutante: Nivel de Zn en la hoja (ppm)	% de reducción de Zn en mut frente a ctrl	valor de p
HMA4.1 W265*	0,91 ± 0,1	0,92 ± 0,13	0 %	0,9731	19,2 ± 7,4	23,8 ± 6,3	0 %	0,9906
HMA4.1 Q561*	0,87 ± 0,11	1 ± 0,09	0 %	1,0000	18,6 ± 6,9	16,6 ± 4,7	11 %	0,9983
HMA4.2 Q293*	0,85 ± 0,13	0,89 ± 0,12	0 %	0,9997	18,9 ± 4,6	17,7 ± 3,7	6 %	0,9115
HMA4.2 E296K	0,89 ± 0,07	0,92 ± 0,1	0 %	0,9946	24,5 ± 15,8	13,4 ± 3,6	45 %	0,1779
HMA4.2 T402I	0,87 ± 0,09	0,93 ± 0,15	0 %	0,9984	21,9 ± 5,8	14,4 ± 1,6	34 %	0,0557
HMA4.2 G251D	0,88 ± 0,15	0,93 ± 0,07	0 %	0,9984	16 ± 3,9	15,1 ± 2,8	6 %	0,9700
HMA4.2 G382R	0,93 ± 0,06	0,93 ± 0,09	0 %	0,9995	14,8 ± 2,6	17,3 ± 5,7	0 %	0,9840
HMA4.2 V351M	0,83 ± 0,11	0,95 ± 0,12	0 %	0,9957	17,8 ± 5,4	14,2 ± 2	20 %	0,6459

Valores de Cd/Zn (media ± desviación estándar) de muestras mezcladas de terrenos de mutantes únicos homocigóticos y sus controles de segregación nula cultivados en un experimento de campo a gran escala. El % de reducción de Cd/Zn se calcula en comparación con los valores de control. El valor de *p* (prueba T pareada) se calcula para la probabilidad de que la media (línea mutante) sea al azar <0,8 * media (línea de control). Para las líneas con una reducción significativa de Cd/Zn >20 % (*p* < 0,05), los valores de *p* se marcan en negrita. En el ensayo de campo, para siete combinaciones de mutaciones, los mutantes únicos, mutantes dobles y plantas control respectivos se cultivaron en seis terrenos replicados (5 para Q293*/Q561*, 4 para E296/Q561* y 3 para Q293*/W265*). Cada unidad de réplica contiene 10 plantas del mutante doble, el control HMA4 WT y los dos mutantes simples, respectivamente. Como las mutaciones Q293* y Q561* se producen en varias combinaciones, los datos para estas mutaciones únicas se basan en 8 y 33 valores de terrenos respectivamente. Las plantas mutantes únicas no muestran una reducción de la biomasa (peso de la hoja) en comparación con el control que puede observarse en la Figura 6.

Tabla 4

Ensayo de campo 1 (región con Cd moderado): Datos de campo de mutantes dobles

Combinación de mutaciones (HMA4.1 /HMA4.2)	Control: Nivel de Cd en la hoja (ppm)	Mutante: Nivel de Cd en la hoja (ppm)	% de reducción de Cd en mut frente a ctrl	valor de p	Control: Nivel de Zn en la hoja (ppm)	Mutante: Nivel de Zn en la hoja (ppm)	% de reducción de Zn en mut frente a ctrl	valor de p
Q293*/Q561*	0,82 ± 0,15	0,058 ± 0,008	93 %	0	18,6 ± 3	12,9 ± 5,1	31 %	0,1204
Q293*/W265*	0,91 ± 0,1	0,069 ± 0,012	92 %	0,0013	19,2 ± 7,4	21,6 ± 20	0 %	0,6331
E296K/Q561*	0,89 ± 0,07	0,093 ± 0,104	90 %	0,0054	24,5 ± 15,8	12,1 ± 4,7	51 %	0,0377
T402I/Q561*	0,87 ± 0,09	0,042 ± 0,003	95 %	0	21,9 ± 5,8	10 ± 1,9	54 %	0,0043

G251D/Q561*	0,88 ± 0,15	0,59 ± 0,13	33 %	0,1029	16 ± 3,9	14 ± 2,6	13 %	0,9056
G382R/Q561*	0,93 ± 0,06	0,83 ± 0,07	11 %	0,9993	14,8 ± 2,6	15,6 ± 4,3	0 %	0,9990
V351M/Q561*	0,83 ± 0,11	0,91 ± 0,06	0 %	0,9994	17,8 ± 5,4	18,7 ± 5,1	0 %	0,9794

Valores de Cd/Zn (media ± desviación estándar) de muestras mezcladas de terrenos de mutantes dobles homocigóticos y sus controles de segregación nula cultivados en un experimento de campo a gran escala. El % de reducción de Cd/Zn se calcula en comparación con los valores de control. El valor de p (prueba T pareada) se calcula para la probabilidad de que la media (línea mutante) sea al azar $<0,8 * \text{media (línea de control)}$. Para las líneas con una reducción significativa de Cd/Zn $>20\%$ ($p < 0,05$), los valores de p se marcan en negrita. En el ensayo de campo, se siembran lotes de semillas segregantes de siete combinaciones de mutaciones y se analizan para su genotipo. Para cada combinación de mutaciones, se cultivan cuatro grupos de genotipos en seis terrenos replicados (5 para Q293*/Q561*, 4 para E296/Q561* y 3 para Q293*/W265*). Cada unidad de réplica contiene 10 plantas del mutante doble, el control HMA4 WT y los dos mutantes simples, respectivamente. Los datos fenotípicos (peso fresco de la hoja) se muestran en la Figura 6.

Tabla 5
Ensayo de campo 2 (región con Cd moderado): Datos de campo de mutantes dobles

Combinación de mutaciones (HMA4.1 / HMA4.2)	Control: Nivel de Cd en la hoja (ppm)	Mutante: Nivel de Cd en la hoja (ppm)	% de reducción de Cd en mut frente a ctrl	valor de p	Control: Nivel de Zn en la hoja (ppm)	Mutante: Nivel de Zn en la hoja (ppm)	% de reducción de Zn en mut frente a ctrl	valor de p
Q293*/Q561*	0,61 ± 0,07	0,064 ± 0,021	89 %	0	37,4 ± 5,5	13,7 ± 3,6	63 %	0,0007
Q293*/W265*	0,49 ± 0,12	0,058 ± 0,005	88 %	0,0007	33,5 ± 7,4	13,2 ± 1,7	61 %	0,0151
Q464*/Q561*	0,66 ± 0,07	0,043 ± 0,003	94 %	0	37,1 ± 7,5	9,4 ± 1,6	75 %	0
Q293*/G235E	0,64 ± 0,06	0,04 ± 0	94 %	0	33,7 ± 5,9	8,5 ± 1,8	75 %	0
E296K/Q561*	0,61 ± 0,12	0,047 ± 0,018	92 %	0	33,8 ± 6,9	10,7 ± 2,4	68 %	0,0002
T402I/Q561*	0,71 ± 0,14	0,041 ± 0,002	94 %	0	39,2 ± 5,3	9,3 ± 0,7	76 %	0
G251D/Q561*	0,74 ± 0,13	0,22 ± 0,06	70 %	0	34,5 ± 6,7	9,1 ± 1,1	74 %	0,0002
Q293*/L223F	0,61 ± 0,11	0,38 ± 0,09	37 %	0,0002	36,5 ± 5,6	25,4 ± 3,1	31 %	0,0118
Q293*/D234N	0,47 ± 0,03	0,34 ± 0,05	27 %	0,1494	30,5 ± 7,1	10,8 ± 0,8	65 %	0,0072
A188V/Q561*	0,58 ± 0,06	0,48 ± 0,1	17 %	0,5872	36,7 ± 6,5	34,9 ± 7,6	5 %	0,9866
G382R/Q561*	0,65 ± 0,12	0,56 ± 0,07	14 %	0,8572	36,8 ± 6,4	35,2 ± 5,8	4 %	0,9997
Q293*/A369V	0,46 ± 0,04	0,4 ± 0,05	14 %	0,9007	33,3 ± 4,3	32 ± 4,1	4 %	0,9929
Q293*/A374V	0,47 ± 0,07	0,43 ± 0,06	9 %	0,9645	36,5 ± 7,9	31,9 ± 4,8	12 %	0,958
V351M/Q561*	0,66 ± 0,05	0,63 ± 0,06	6 %	0,9823	34,1 ± 5,2	32,9 ± 4,7	4 %	0,9999
T189I/Q561*	0,69 ± 0,09	0,67 ± 0,11	3 %	0,9829	40,8 ± 4,4	45,3 ± 7,2	0 %	1
Q293*/S27L	0,58 ± 0,09	0,61 ± 0,06	0 %	0,9996	32,8 ± 5,2	34,8 ± 7,7	0 %	0,9977
Q293*/A188V	0,48 ± 0,07	0,51 ± 0,08	0 %	0,9999	30,6 ± 7,7	29,8 ± 3,4	3 %	0,9761
G128E/Q561*	0,71 ± 0,08	0,85 ± 0,15	0 %	0,9997	36,4 ± 7,4	31,1 ± 5,2	15 %	0,9737

Valores de Cd/Zn (media ± desviación estándar) de muestras mezcladas de terrenos de mutantes dobles homocigóticos y sus controles de segregación nula cultivados en un experimento de campo a gran escala. El % de reducción de Cd/Zn se calcula en comparación con los valores de control. El valor de p (prueba T pareada) se calcula para la probabilidad de que la media (línea mutante) sea al azar $<0,8 * \text{media (línea de control)}$. Para las líneas con una reducción significativa de Cd/Zn $>20\%$ ($p < 0,05$), los valores de p se marcan en negrita. En el ensayo de campo, para 18 combinaciones de mutaciones, los mutantes dobles y sus plantas control se cultivaron en seis terrenos replicados (4 para Q293*/W265* y para Q293*/D234N). Cada unidad de réplica contenía 20 plantas del mutante doble y el control de HMA4 WT, respectivamente. Los datos fenotípicos (peso seco de la hoja) se muestran en la Figura 7.

Tabla 6
Datos de campo de los ensayos de campo 3 y 4: regiones con Cd alto

Campo 3: región 1 con Cd alto

Combinación de mutaciones (HMA4.1 / HMA4.2)	Control: Nivel de Cd en la hoja (ppm)	Mutante: Nivel de Cd en la hoja (ppm)	% de reducción de Cd en mut frente a ctrl	valor de p	Control: Nivel de Zn en la hoja (ppm)	Mutante: Nivel de Zn en la hoja (ppm)	% de reducción de Zn en mut frente a ctrl	valor de p
Q293*/Q561*	3,05 ± 0,71	0,61 ± 0,24	80 %	0,0003	94,8 ± 15,5	22,9 ± 5,7	76 %	0,0000

	Q293*/G235E	3,49 ± 0,79	0,58 ± 0,26	84 %	0,0003	114,3 ± 19,1	21,8 ± 5,1	81 %	0,0000
	E296K/Q561*	3,09 ± 0,82	0,4 ± 0,19	87 %	0,0001	112,7 ± 22,8	20,1 ± 4,5	82 %	0,0000
5	T402I/Q561*	2,38 ± 0,8	0,47 ± 0,16	80 %	0,0009	81,9 ± 9,7	20,8 ± 2,5	75 %	0,0001
	G251D/Q561*	2,89 ± 0,75	1,56 ± 0,38	46 %	0,0014	107 ± 18,6	25,3 ± 4,6	76 %	0,0000

Campo 4: región 2 con Cd alto

10	Combinación de mutaciones (HMA4.1 / HMA4.2)	Control: Nivel de Cd en la hoja (ppm)	Mutante: Nivel de Cd en la hoja (ppm)	% de reducción de Cd en mut frente a ctrl	valor de p	Control: Nivel de Zn en la hoja (ppm)	Mutante: Nivel de Zn en la hoja (ppm)	% de reducción de Zn en mut frente a ctrl	valor de p
15	Q293*/Q561*	2,65 ± 2,52	0,16 ± 0,08	94 %	0,0068	32,1 ± 10,7	11,4 ± 1,1	65 %	0,0303
	Q293*/G235E	3,81 ± 2,88	0,18 ± 0,04	95 %	0,0006	38 ± 8,2	12,3 ± 1,6	68 %	0,0018
	E296K/Q561*	2,9 ± 2,5	0,13 ± 0,02	96 %	0,0009	36,3 ± 8,6	14,5 ± 1,6	60 %	0,0052
	T402I/Q561*	2,81 ± 1,98	0,27 ± 0,11	90 %	0,0001	30,7 ± 9,2	16,4 ± 2,7	47 %	0,0439
20	G251D/Q561*	4,01 ± 1,84	2,27 ± 0,97	43 %	0,0056	38,8 ± 10,6	14,2 ± 1,8	63 %	0,0107

Valores de Cd/Zn (media ± desviación estándar) de muestras mezcladas de terrenos de mutantes dobles homocigóticos y sus controles de segregación nula cultivados en dos experimentos de campo en regiones con cadmio elevado. El % de reducción de Cd/Zn se calcula en comparación con los valores de control. El valor de *p* (prueba T pareada) se calcula para la probabilidad de que la media (línea mutante) sea al azar $<0,8 * \text{media (línea de control)}$. Para las líneas con una reducción significativa de Cd/Zn $>20\%$ ($p < 0,05$), los valores de *p* se marcan en negrita. En el ensayo de campo, para cinco combinaciones de mutaciones, los mutantes dobles y sus plantas control se cultivaron en cinco terrenos replicados. Cada unidad de réplica contenía 20 plantas del mutante doble y el control de HMA4 WT, respectivamente. Solo se analizaron los terrenos con crecimiento aceptable tanto para mutantes como para controles (5 terrenos para la mayoría de las líneas, excepto: en el campo 3: 4 terrenos para T402I/Q561*; en el campo 4: 4 terrenos para G251D/Q561* y 3 terrenos para Q293*/Q561*). Los datos fenotípicos (peso de la hoja curadas) se muestran en la Figura 8.

Tabla 7

35	Residuos de aminoácidos	Longitud (aminoácidos)	Descripción
	1 - 90	90	Secuencia extremo N citoplasmático (dominio HMA)
	91 - 112	22	Dominio transmembrana 1
40	113 - 115	3	Secuencia extracelular
	116 - 135	20	Dominio transmembrana 2
	136 - 142	7	primer lazo citoplasmático
	143 - 163	21	Dominio transmembrana 3
	164 - 164	1	Secuencia extracelular
45	165 - 183	21	Dominio transmembrana 4
	186 - 311	126	segundo lazo citoplasmático (dominio A)
	312 - 334	23	Dominio transmembrana 5
	335 - 342	8	Secuencia extracelular
	343 - 360	18	Dominio transmembrana 6
50	361 - 653	293	tercer lazo citoplasmático (dominio P y dominio N)
	654 - 673	20	Dominio transmembrana 7
	674 - 677	4	Secuencia extracelular
	678 - 697	20	Dominio transmembrana 8
55	698 - 1403 (HMA4.1)/ 1444 (HMA4.2)	706 (HMA4.1)/ 747 (HMA4.2)	Secuencia extremo C citoplasmático

La estructura del dominio de HMA4 se dedujo de alineaciones de secuencias con las proteínas HMA2 y HMA4 de Arabidopsis y su respectiva anotación del dominio por UniProt (AtHMA2: Q9SZW4; AtHMA4: O64474).

Tabla 8

Datos de invernadero de mutantes dobles seleccionados

60	Mutación combinación	Nivel de Cd en la hoja (ppm)	% de reducción de Cd frente al control	Nivel de Zn en la hoja (ppm)	% de reducción de Zn frente al control
65	Control	0,66 ± 0,24	-	32,5 ± 12,1	-
	Q293*/Q561*	0,059 ± 0,015	91 %	10,7 ± 3,43	67 %

E296K/Q561*	0,051 ± 0,003	92 %	8,18 ± 2,61	75 %
T402I/Q561*	0,077 ± 0,016	88 %	7,99 ± 1,20	75 %
G251D/Q561*	0,42 ± 0,12	37 %	15,3 ± 13,2	53 %
G382R/Q561*	0,55 ± 0,13	(17 %)	22,5 ± 5,77	31 %
V351M/Q561*	0,53 ± 0,15	(19 %)	19,8 ± 4,60	39 %

Valores de Cd/Zn (media ± desviación estándar) de ocho plantas (seis plantas para Q293*/A374V) que son mutantes dobles homocigóticos (las mutaciones que se indican como "mutación homocigótica en HMA4.1/mutación homocigótica en HMA4.2") y los controles de segregación nula de todos los mutantes dobles (54 plantas en total). El % de reducción de Cd/Zn se calcula en comparación con los valores de control. Para hacer que la tabla sea menos compleja, las 54 plantas control se analizaron juntas en la tabla anterior y los valores de Cd/Zn de los terrenos de mutantes dobles se compararon con todos los controles. (Se realizaron las pruebas T y los valores entre corchetes indican que no hay una reducción significativa en $P < 0,05$). Las plantas en este experimento se cultivan en macetas grandes en el invernadero. Se indican la morfología de las plantas y el rendimiento analizado después de cuatro y once semanas de crecimiento en macetas.

Tabla 9
Datos de invernadero de mutantes dobles adicionales seleccionados

Mutación Combinación	Nivel de Cd en la hoja (ppm)	% de reducción de Cd frente al control	Nivel de Zn en la hoja (ppm)	% de reducción de Zn frente al control
Control	0,31 ± 0,09	-	33,9 ± 4,57	-
H438Y/W265*	0,13 ± 0,06	58 %	12,2 ± 2,4	64 %
L36F/Q561*	0,38 ± 0,16	0 %	28,8 ± 5,34	15 %

Valores de Cd/Zn en las hojas (media ± desviación estándar de 9 plantas replicadas para H438Y/W265* y de 6 plantas replicadas para L36F/Q561*) de dos combinaciones adicionales de mutantes de *HMA4* homocigóticos (las mutaciones se indican como "mutación homocigótica en HMA4.1/ mutación homocigótica en HMA4.2") y el mismo número de controles de segregación nula para cada mutante doble. El % de reducción de Cd/Zn se calcula en comparación con los valores de control.

Tabla 10

Exón	Cambio AA	Puntuación SIFT WT	Mut. Puntuación SIFT	Mut. SIFT/SIFT WT	Exón	Cambio AA	Puntuación SIFT WT	Mut. Puntuación SIFT	Mut. SIFT/SIFT WT
HMA4.1- Ex 1	S16R	1	0,022	0,022	HMA4.2- Ex 1	M7I	0,377	0,359	0,954
HMA4.1- Ex 1	V30I	0,454	0,074	0,164	HMA4.2- Ex 1	D19N	1	0,008	0,008
HMA4.1- Ex 1	L36F	1	0,003	0,003	HMA4.2- Ex 1	S27L	1	0,018	0,018
HMA4.1- Ex 1	E44K	1	0,291	0,291	HMA4.2- Ex 1	L31F	1	0,028	0,028
HMA4.1- Ex 1	T50I	0,277	0,066	0,238	HMA4.2- Ex 1	L62F	1	0,033	0,033
HMA4.1- Ex 2	E78K	1	0,167	0,167	HMA4.2- Ex 2	G106E	0,513	0,238	0,465
HMA4.1- Ex 2	A98V	1	0,540	0,540	HMA4.2- Ex 2	L145F	1	0,165	0,165
HMA4.1- Ex 2	G128E	1	0,029	0,029	HMA4.2- Ex 4/5	A188V	1	0,003	0,003
HMA4.1- Ex 2	P130L	0,095	0,281	2,948	HMA4.2- Ex 4/5	P200L	1	0,005	0,005
HMA4.1- Ex 2	A138V	1	0,184	0,184	HMA4.2- Ex 4/5	S221N	0,545	0,096	0,176
HMA4.1- Ex 4/5	A188V	1	0,004	0,004	HMA4.2- Ex 4/5	L223F	1	0,019	0,019
HMA4.1- Ex 4/5	T189I	1	0,015	0,015	HMA4.2- Ex 4/5	A224V	1	0,152	0,152
HMA4.1- Ex 4/5	A191T	1	0,093	0,093	HMA4.2- Ex 4/5	D234N	1	0	0
HMA4.1- Ex 4/5	V217I	1	0,280	0,280	HMA4.2- Ex 4/5	G235E	1	0,001	0,001
HMA4.1- Ex 4/5	G251D	1	0	0	HMA4.2- Ex 4/5	G251D	1	0	0
HMA4.1- Ex 4/5	A266T	1	0,005	0,005	HMA4.2- Ex 4/5	W265*			PARADA
HMA4.1- Ex 4/5	A287V	0,635	1	1,575	HMA4.2- Ex 6	P331T	0,120	0,038	0,318
HMA4.1- Ex 4/5	Q293*			PARADA	HMA4.2- Ex 6	P331S	0,120	0,019	0,154
HMA4.1- Ex 4/5	E296K	1	0	0	HMA4.2- Ex 6	T349M	0,286	0,021	0,075
HMA4.1- Ex 4/5	C312Y	1	0,348	0,348	HMA4.2- Ex 6	V364V	1	0,089	0,089
HMA4.1- Ex 6	T349I	0,153	0,101	0,658	HMA4.2- Ex 6	A369V	1	0,001	0,001
HMA4.1- Ex 6	V351M	1	0,003	0,003	HMA4.2- Ex 6	A374V	1	0,008	0,008
HMA4.1- Ex 6	S376F	1	0,017	0,017	HMA4.2- Ex 6	G419D	0,583	1	1,715
HMA4.1- Ex 6	G382R	1	0,002	0,002	HMA4.2- Ex 7/8	S452F	1	0,005	0,005
HMA4.1- Ex 6	T402I	1	0	0	HMA4.2- Ex 7/8	D476Y	1	0,001	0,001
HMA4.1- Ex 6	E407K	1	0,340	0,340	HMA4.2- Ex 7/8	G506R	1	0,006	0,006
HMA4.1- Ex 7/8	S434N	1	0,018	0,018	HMA4.2- Ex 7/8	V509F	1	0,057	0,057
HMA4.1- Ex 7/8	G437S	0,161	1	6,219	HMA4.2- Ex 7/8	G510E	1	0,401	0,401

ES 2 989 556 T3

HMA4.1- Ex 7/8	H438Y	1	0	0	HMA4.2- Ex 7/8	P518S	0,459	0,187	0,407
HMA4.1- Ex 7/8	A448T	1	0,003	0,003	HMA4.2- Ex 7/8	A519V	1	0,562	0,562
HMA4.1- Ex 7/8	Q464*			PARADA	HMA4.2- Ex 7/8	G523S	1	0,759	0,759
HMA4.1- Ex 7/8	R474K	0,366	1	2,731	HMA4.2- Ex 7/8	T546I	1	0,061	0,061
HMA4.1- Ex 7/8	M478I	0,243	0,028	0,117	HMA4.2- Ex 7/8	Q561*			PARADA
HMA4.1- Ex 7/8	T494I	0,651	0,145	0,222					
HMA4.1- Ex 7/8	V496I	1	0,181	0,181					
HMA4.1- Ex 7/8	H559Y	1	0,429	0,429					

Lista de mutaciones identificadas y validadas en HMA4.1 y HMA4.2. Se indican los cambios de aminoácidos y las puntuaciones SIFT correspondientes. Las mutaciones interesantes se resaltan en negrita (mutación sin sentido o mutación con cambio de sentido con puntuación SIFT del aa sustituido < 0,05 de la puntuación SIFT original).

Tabla 11

Ejemplos de combinaciones de mutaciones que se espera reduzcan el contenido de Cd en la hoja

Otras posibles combinaciones	Mutación en HMA4.1	Mutación en HMA4.2
Combinación 1	Q464*	W265*
Combinación 2	Q464*	L223F
Combinación 3	Q464*	D234N
Combinación 4	Q464*	G235E
Combinación 5	E296K	W265*
Combinación 6	E296K	L223F
Combinación 7	E296K	D234N
Combinación 8	E296K	G235E
Combinación 9	T402I	W265*
Combinación 10	T402I	L223F
Combinación 11	T402I	D234N
Combinación 12	T402I	G235E
Combinación 13	G251D	W265*
Combinación 14	G251D	L223F
Combinación 15	G251D	D234N
Combinación 16	G251D	G235E
Combinación 17	H438Y	Q561*
Combinación 18	H438Y	L223F
Combinación 19	H438Y	D234N
Combinación 20	H438Y	G235E

Tabla 12

Ejemplos de combinaciones de mutaciones que se espera reduzcan el contenido de Cd en la hoja

Otras posibles combinaciones	Mutación en HMA4.2	Mutación en HMA4.1
Combinación 1	Q464*	W265*
Combinación 2	Q464*	L223F
Combinación 3	Q464*	D234N
Combinación 4	Q464*	G235E
Combinación 5	E296K	W265*
Combinación 6	E296K	L223F
Combinación 7	E296K	D234N
Combinación 8	E296K	G235E
Combinación 9	T402I	W265*
Combinación 10	T402I	L223F
Combinación 11	T402I	D234N
Combinación 12	T402I	G235E
Combinación 13	G251D	W265*
Combinación 14	G251D	L223F
Combinación 15	G251D	D234N
Combinación 16	G251D	G235E
Combinación 17	H438Y	Q561*
Combinación 18	H438Y	L223F
Combinación 19	H438Y	D234N
Combinación 20	H438Y	G235E

REIVINDICACIONES

1. Una planta mutante de *Nicotiana tabacum* o parte de esta que tiene una expresión parcialmente reducida de al menos dos ATPasas de metales pesados (HMA), dichas dos HMA comprenden o consisten en polipéptidos que tienen al menos 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2 y que comprenden uno o más de los siguientes grupos de mutaciones:

una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 293 de la SEQ ID NO:1 y una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 561 de una secuencia no mutada que se expone en la SEQ ID NO:2, preferentemente, en donde las mutaciones son Q293* y Q561*, y en donde * denota un codón de parada;

una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 293 de la SEQ ID NO:1 y una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 265 de una secuencia no mutada que se expone en la SEQ ID NO:2, preferentemente, en donde las mutaciones son Q293* y W265*, en donde * denota un codón de parada;

una mutación con cambio de sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 296 de la SEQ ID NO:1 y una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 561 de una secuencia no mutada que se expone en la SEQ ID NO:2, preferentemente, en donde las mutaciones son E296K y Q561*, en donde * denota un codón de parada;

una mutación con cambio de sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 402 de la SEQ ID NO:1 y una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 561 de una secuencia no mutada que se expone en la SEQ ID NO:2, preferentemente, en donde las mutaciones son T402I y Q561*, en donde * denota un codón de parada;

una mutación con cambio de sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 251 de la SEQ ID NO:1 y una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 561 de una secuencia no mutada que se expone en la SEQ ID NO:2, preferentemente, en donde las mutaciones son G251D y Q561*, en donde * denota un codón de parada;

una mutación con cambio de sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 438 de la SEQ ID NO:1 y una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 265 de una secuencia no mutada que se expone en la SEQ ID NO:2, preferentemente, en donde las mutaciones son H438Y y W265*, en donde * denota un codón de parada;

una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 293 de la SEQ ID NO:1 y una mutación con cambio de sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 223 de una secuencia no mutada que se expone en la SEQ ID NO:2, preferentemente, en donde las mutaciones son Q293* y L223F, en donde * denota un codón de parada;

una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 293 de la SEQ ID NO:1 y una mutación con cambio de sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 234 de una secuencia no mutada que se expone en la SEQ ID NO:2, preferentemente, en donde las mutaciones son Q293* y D234N, en donde * denota un codón de parada;

una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 293 de la SEQ ID NO:1 y una mutación con cambio de sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 235 de una secuencia no mutada que se expone en la SEQ ID NO:2, preferentemente, en donde las mutaciones son Q293* y G235E, en donde * denota un codón de parada;

una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 464 de la SEQ ID NO:1 y una mutación sin sentido en una posición que corresponde a la posición del aminoácido 561 de una secuencia no mutada que se expone en la SEQ ID NO:2, preferentemente, en donde las mutaciones son Q464* y Q561*, en donde * denota un codón de parada; y

en donde la planta mutante de *Nicotiana tabacum* o parte de esta exhibe al menos una reducción del 27 %, en comparación con una planta control de *Nicotiana tabacum*, en la acumulación de cadmio en la hoja cuando la planta mutante de *Nicotiana tabacum* se cultiva en el campo en presencia de cadmio.

2. La planta mutante de *Nicotiana tabacum* o parte de esta de conformidad con la reivindicación 1, en donde la expresión de una de las HMA se reduce o se pierde parcialmente y la expresión de una de las HMA se pierde en comparación con la planta control de *Nicotiana tabacum*.

3. La planta mutante de *Nicotiana tabacum* o parte de esta de conformidad con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el fenotipo de la planta mutante de *Nicotiana tabacum* o parte de esta en el tiempo de cosecha es el mismo que la planta control de *Nicotiana tabacum* en el mismo tiempo de cosecha, preferentemente, en donde la planta mutante de *Nicotiana tabacum* o parte de esta no muestra una reducción de la biomasa (por ejemplo, peso de la hoja) en el tiempo de cosecha en comparación con la planta control de *Nicotiana tabacum* en el mismo tiempo de cosecha.

4. Material vegetal de *Nicotiana tabacum* a partir de la planta mutante de *Nicotiana tabacum* o parte de esta de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

5. Material vegetal de *Nicotiana tabacum* de conformidad con la reivindicación 4, en donde el material vegetal es material vegetal de *Nicotiana tabacum* curado o seco.

6. Un método para producir material vegetal de *Nicotiana tabacum* con acumulación reducida de cadmio en la hoja cuando se cultiva en el campo en comparación con una planta control de *Nicotiana tabacum* que se cultiva en el campo, dicho método comprende las etapas de:

(a) proporcionar una planta mutante de *Nicotiana tabacum* o parte de esta de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3;

(b) cultivar la planta de *Nicotiana tabacum* en el campo; y

(c) cosechar el material vegetal de *Nicotiana tabacum* de la planta de *Nicotiana tabacum*.

7. Un producto vegetal de tabaco que comprende al menos una parte de la planta mutante de *Nicotiana tabacum* o parte de esta de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o el material vegetal de *Nicotiana tabacum* de conformidad con la reivindicación 4 o 5.

8. Un producto de tabaco o artículo para fumar o producto consumible que comprende la planta mutante de *Nicotiana tabacum* o parte de esta de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o el material vegetal de *Nicotiana tabacum* de conformidad con la reivindicación 4 o 5 o el producto vegetal de *Nicotiana tabacum* de conformidad con la reivindicación 7.

FIGURA 1

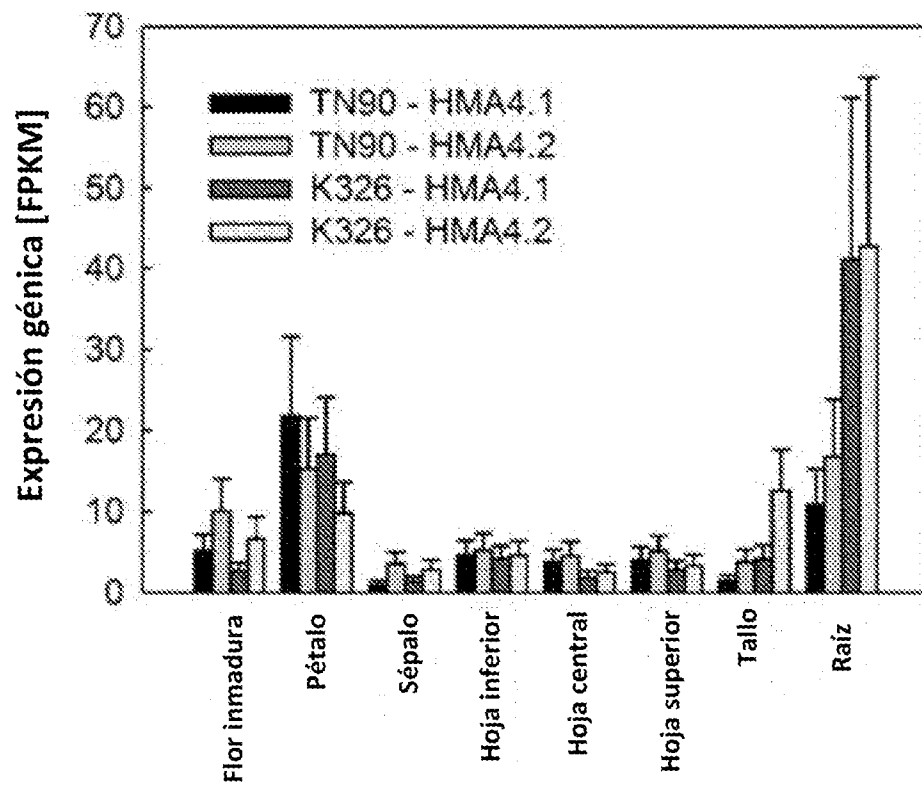


FIGURA 2

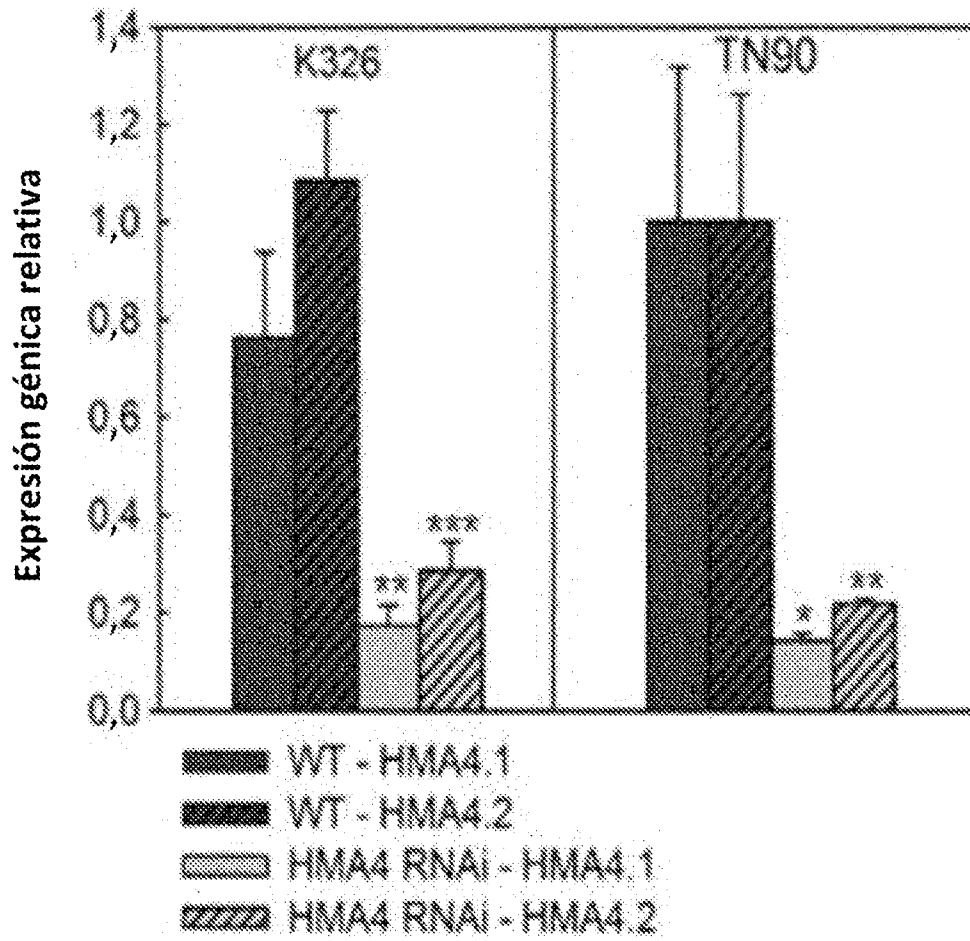


FIGURA 3

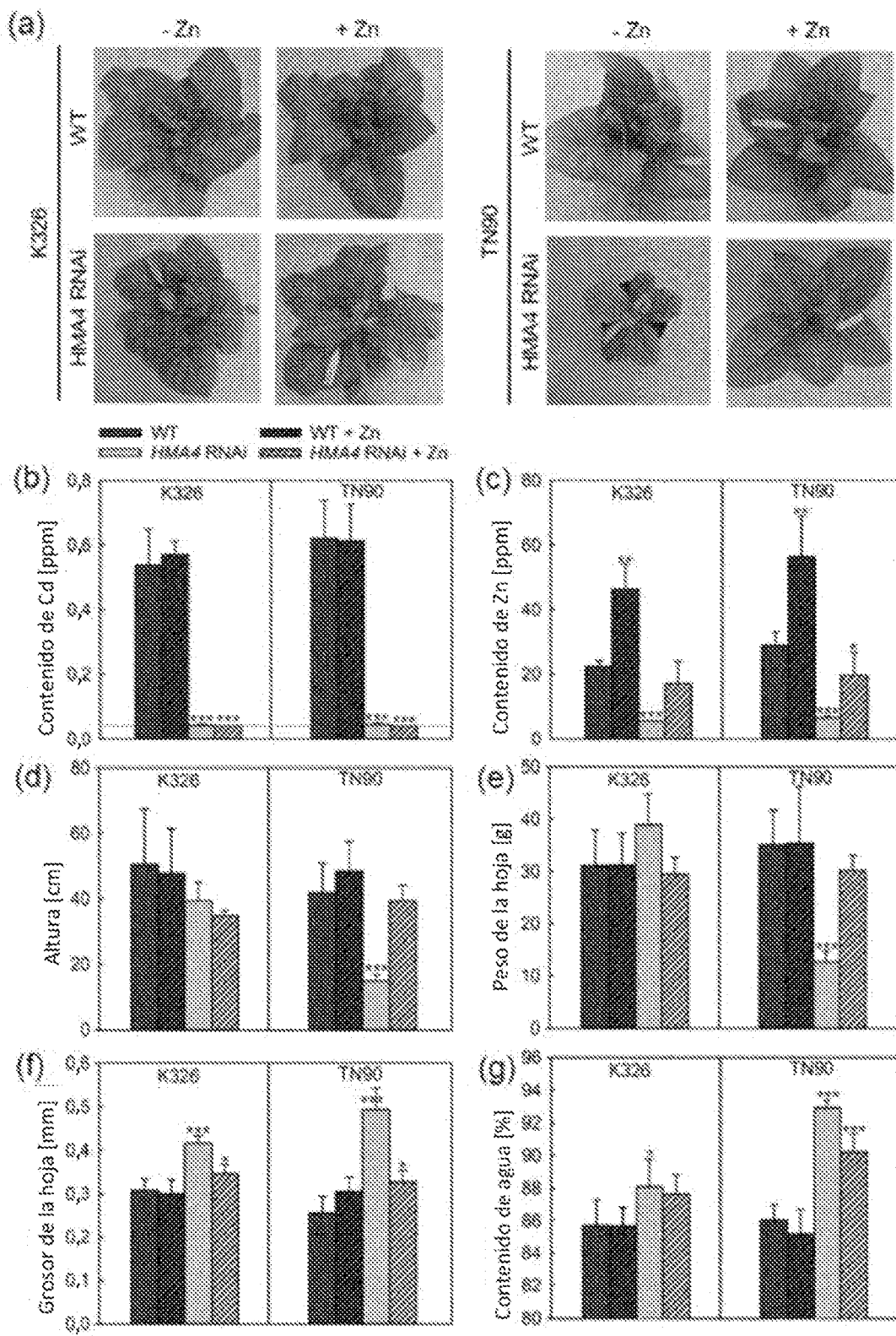


FIGURA 4

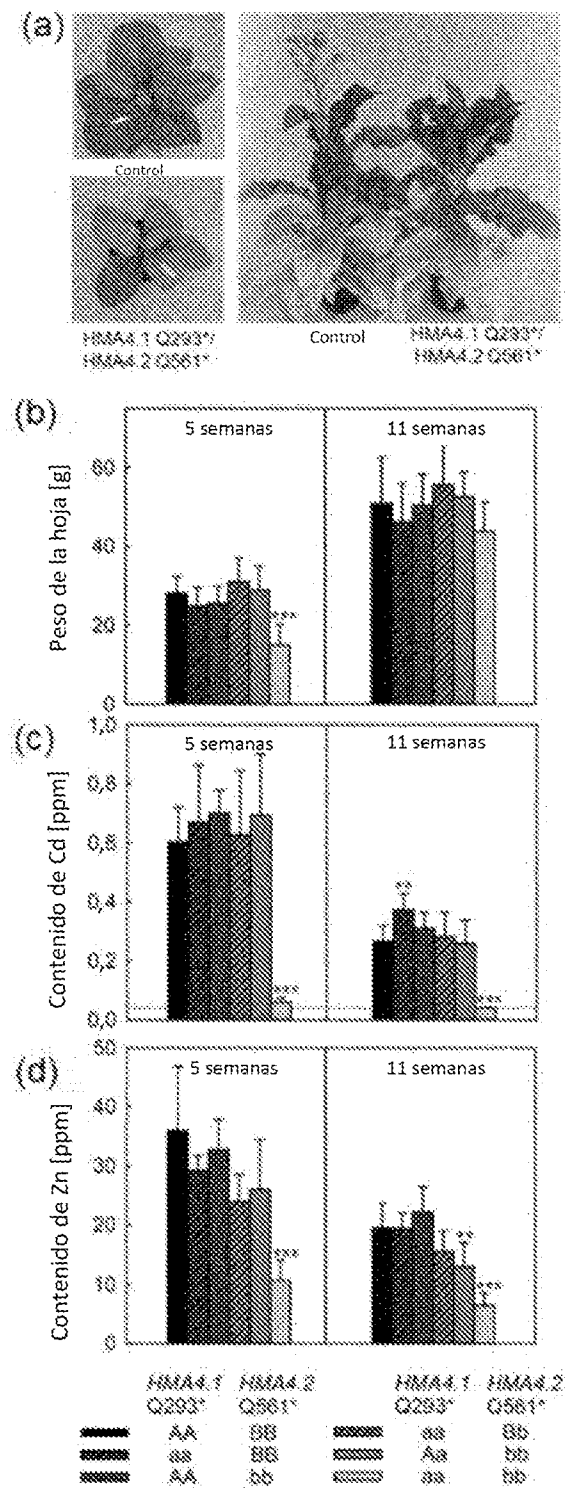


FIGURA 5

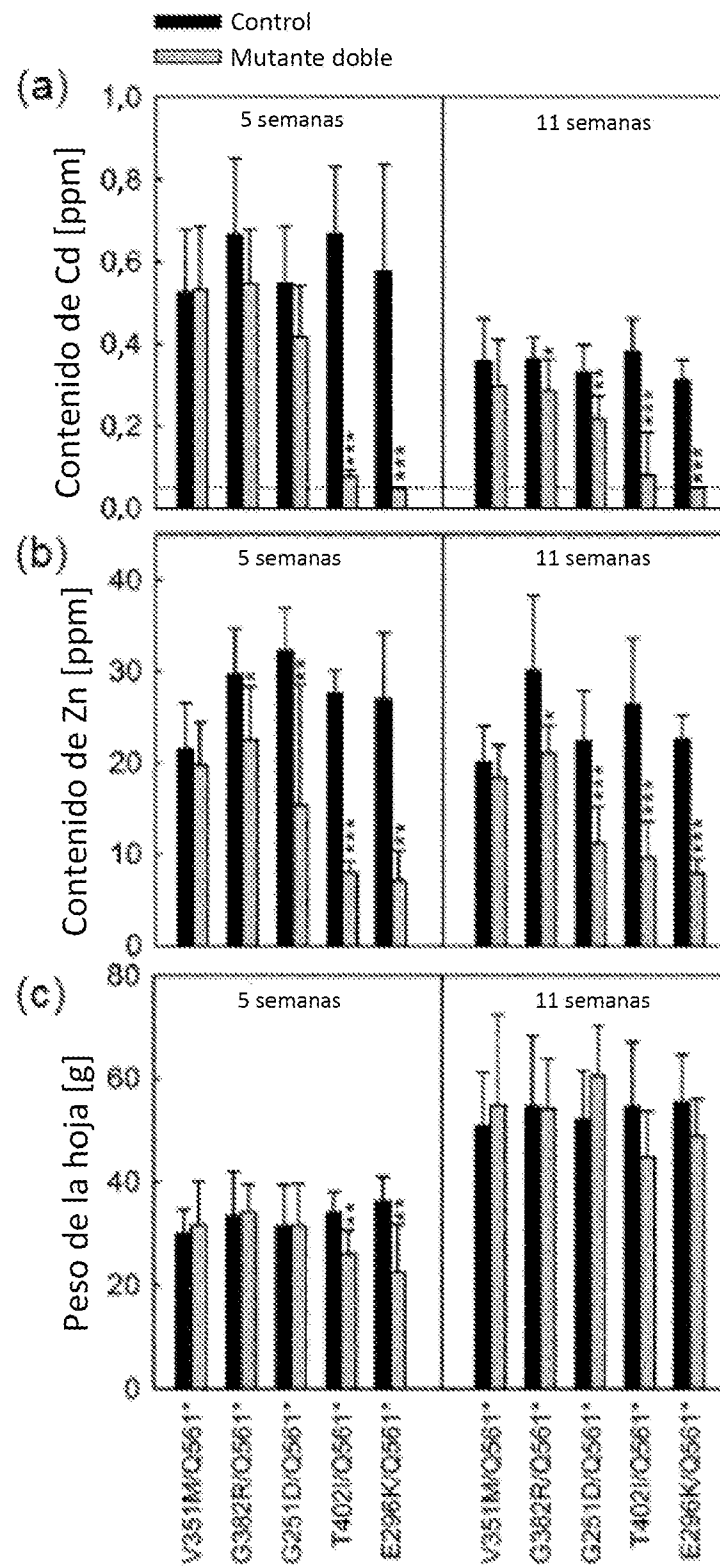


FIGURA 6

Campo 1 (región con Cd moderado)

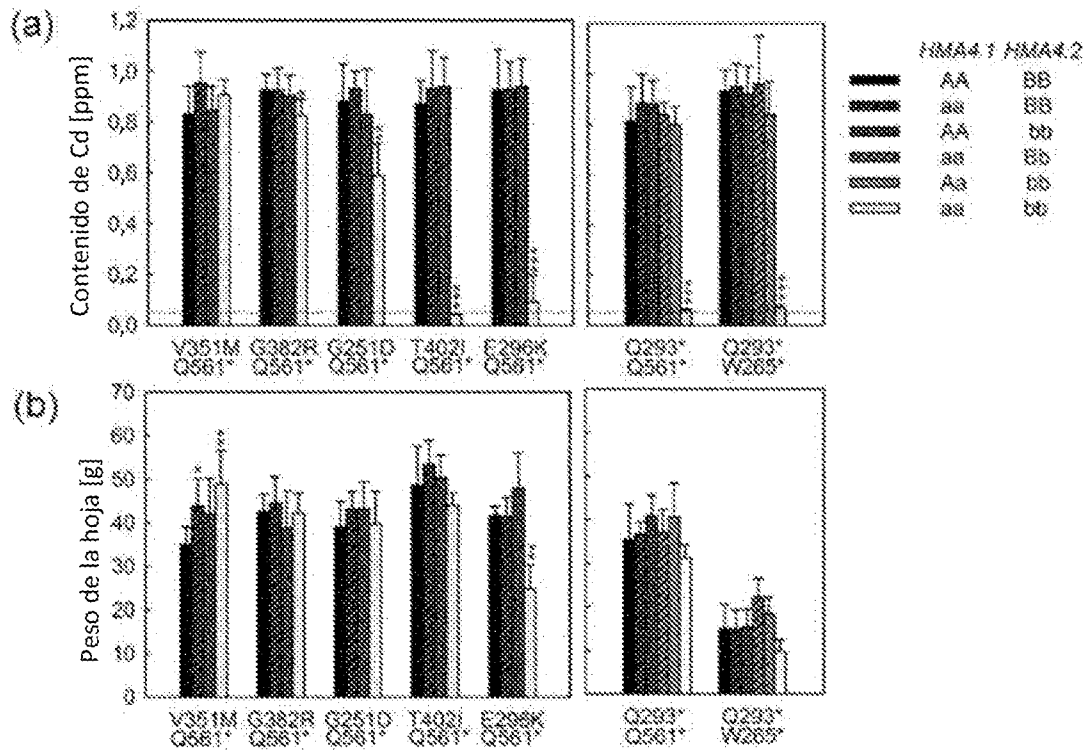


FIGURA 7

Campo 2 (región con Cd moderado)

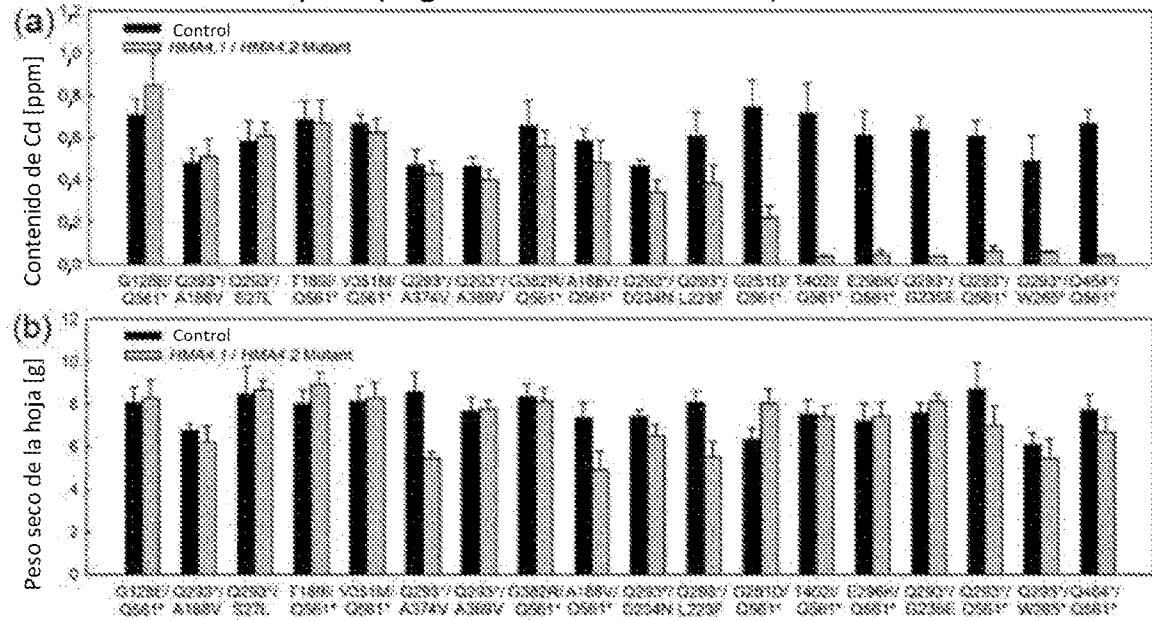


FIGURA 8

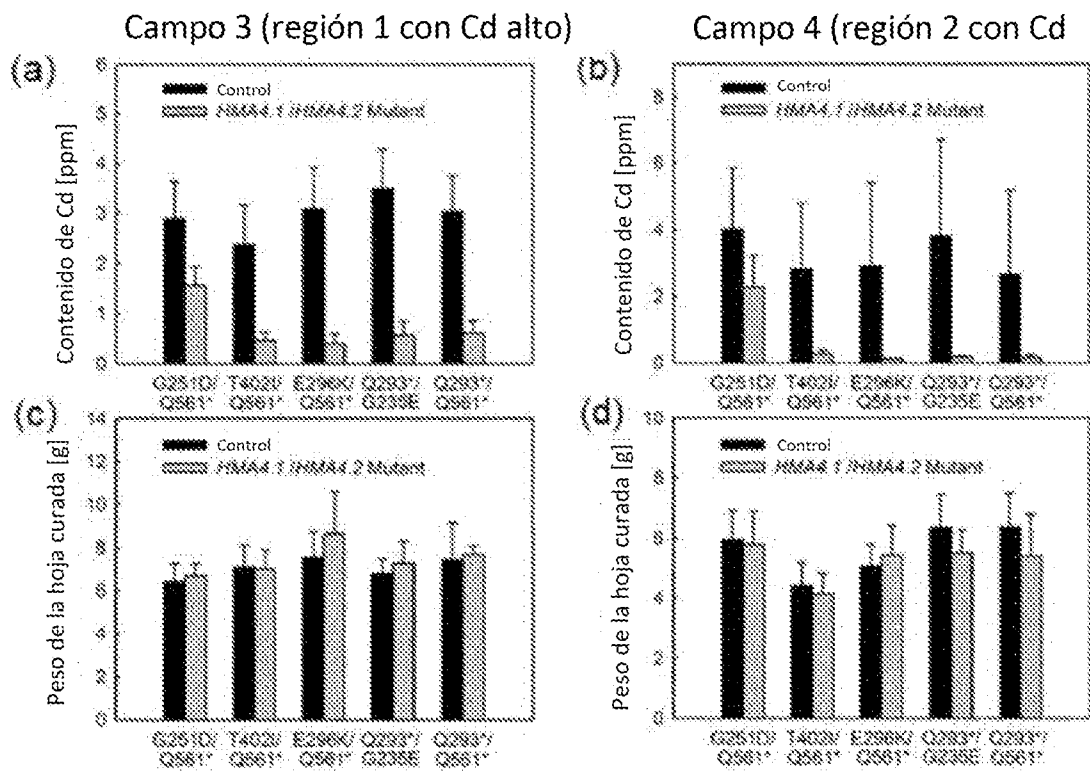


FIGURA 9

