

REDUCCIÓN DE LA CONVERSIÓN DE NICOTINA A NORNICOTINA EN PLANTAS

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención describe las secuencias de polinucleótidos de una nueva variante de nicotina N-desmetilasa (*NND3*) del género *Nicotiana* y variantes, homólogos y fragmentos de estas. Se describen además las secuencias de polipéptidos y variantes, homólogos y fragmentos de estas. Se describe además la modificación de la expresión de este gen o la actividad de la proteína codificada de esta manera para modular los niveles de una o más nitrosaminas específicas del tabaco (TSNA) en una célula vegetal o una planta.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las nitrosaminas específicas del tabaco (TSNA) se forman principalmente durante el curado y procesamiento de las hojas de tabaco. El curado del tabaco es un proceso de cambios físicos y bioquímicos que ponen de manifiesto el aroma y sabor de cada variedad de tabaco. Se considera que la cantidad de TSNA en la hoja de tabaco curada depende de la acumulación de nitritos, los que se acumulan durante la muerte de la célula vegetal y se forman durante el curado mediante la reducción de nitratos bajo condiciones que se acercan a un ambiente anaeróbico (deficiente de oxígeno). Se considera que la reducción de nitratos a nitritos se produce por la acción de bacterias en la superficie de la hoja bajo condiciones anaeróbicas, y esta reducción es particularmente pronunciada bajo ciertas condiciones. Una vez que se forman los nitritos, se considera que estos compuestos se combinan con varios alcaloides del tabaco, que incluyen compuestos que contienen piridinas, para formar nitrosaminas.

Las cuatro TSNA principales, es decir, las que típicamente están presentes en las concentraciones más altas, son N-nitrosonicotina (NNN), 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK), N-nitrosoanabasina (NAB) y N-nitrosoanatabina (NAT). Los compuestos menores, es decir, los que se encuentran típicamente en niveles significativamente menores

que las TSNA principales, incluyen 4-(metilnitrosamino) 4-(3-piridil) butanal (NNA), 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanol (NNAL), 4-(metilnitrosamino)4-(3-piridil)-1-butanol (iso-NNAL), y ácido 4-(metilnitrosamino)-4-(3-piridil)-1-butírico (iso-NNAC). Se ha informado que al menos la NNN y la NNK son carcinogénicas cuando se aplican a animales en estudios de laboratorio.

El mecanismo bioquímico principal de la formación de la NNN es la N-nitrosación de nornicotina, un alcaloide producido por la N-desmetilación de la nicotina por la enzima nicotina N-desmetilasa. Aunque la nornicotina representa típicamente <5 % del contenido total de alcaloides en el tabaco cultivado, los niveles de nornicotina pueden aumentar drásticamente por un mecanismo denominado “conversión” en donde las plantas que acumulan nicotina como su principal alcaloide dan lugar a una progenie que metaboliza una gran porción (tan alta como 95 %) de la nicotina de la hoja a nornicotina. En los individuos que se han convertido genéticamente (denominados “convertidores”), la N-desmetilación de nicotina a nornicotina se produce principalmente durante la senescencia y el curado. El mantenimiento de niveles bajos de nornicotina es ventajoso debido a su papel bien caracterizado como el precursor de NNN y además porque la nornicotina *per se* puede ser responsable de efectos no deseados sobre la salud. Dickerson y Janda (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 15084-15088 demostraron que la nornicotina puede inducir una glicación aberrante de proteínas y mostraron un aumento de la acumulación de proteínas modificadas en el plasma sanguíneo de fumadores. Además, el mismo informe proporcionó evidencia de que la nornicotina puede reaccionar covalentemente con fármacos esteroides usados comúnmente, tales como la prednisona, lo que altera potencialmente la eficacia y la toxicidad de estos fármacos. El documento WO98/58555 describe el tratamiento de hojas de tabaco antes o durante el curado al humo mediante un procesamiento por microondas para reducir las TSNA. El documento US 5,810,020 describe un proceso para eliminar las TSNA del tabaco al poner en contacto el material de tabaco con un drenaje de atrapado, en donde el drenaje de atrapado comprende un complejo de un metal de

transición seleccionado el cual se nitrosa fácilmente para formar un complejo nitrosilo con poco impedimento cinético o termodinámico. El documento US 6,202,649 describe un método para evitar sustancialmente la formación de TSNA mediante, entre otras cosas, el curado del tabaco en un ambiente controlado que tiene un flujo de aire suficiente para evitar sustancialmente una condición anaeróbica en las cercanías de la hoja de tabaco. El ambiente controlado se proporciona al controlar uno o más parámetros del curado, tales como flujo de aire, humedad, y temperatura. Sin embargo, métodos tales como éstos pueden adicionar un costo y tiempo considerable a la producción de tabaco y por lo tanto es menos probable que sean aceptados por la industria del tabaco. Así, permanece una necesidad de un método efectivo y relativamente barato para reducir las TSNA.

Los métodos con bases moleculares para reducir los niveles de TSNA en plantas son muy deseados ya que no requieren métodos costosos, y frecuentemente complejos, para lograr la disminución de los niveles de TSNA. Un enfoque de base molecular de este tipo se describe en el documento WO2011/088180. En el documento WO2011/088180 se describen composiciones y métodos para inhibir la expresión o función de un polipéptido de la nicotina desmetilasa específica de la raíz (CYP82E10) que está involucrada en la conversión metabólica de nicotina a nornicotina en las raíces de plantas de tabaco. La nicotina desmetilasa pertenece a la familia de las monooxigenasas del citocromo P450 (CYP). Se han descrito otros genes de nicotina desmetilasa que incluyen *CYP82E4* y *CYP82E5* que participan en la conversión de nicotina a nornicotina y se describen en los documentos WO2006091194, WO2008070274 y WO2009064771. La desactivación de *CYP82E4*, *CYP82E5* y *CYP82E10* es capaz de reducir la conversión de nicotina a nornicotina de 3.2 % a 1.1 % en tabaco Burley (ver el documento WO 2011088180 A1).

Existe una necesidad continua en la técnica de reducir aún más los niveles de nornicotina en las plantas de tabaco para reducir más aún los niveles de metabolitos de nornicotina (por

ejemplo, TSNA – tal como NNN) que se forman durante el curado. La presente invención busca dirigirse a esta necesidad.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

5 Los inventores han identificado un gen adicional que pertenece a la familia de la nicotina N-desmetilasa (NND) en *Nicotiana tabacum*, que en la presente descripción se denomina como *NND3*. Aunque la secuencia polipeptídica de NND3 muestra 94 % de identidad de secuencia con la secuencia polipeptídica conocida de CYP82E4 y 91 % de identidad de secuencia con la secuencia polipeptídica conocida de CYP82E5 y CYP82E10, el perfil de expresión de NND3 en

10 *N. tabacum* es sorprendentemente diferente en comparación con CYP82E4, CYP82E5 y CYP82E10. Como se muestra en la Figura 1, mientras CYP82E4, CYP82E5, CYP82E10 y NND3 cada una muestran expresión en flores y raíces, la NND3 no se expresa en niveles detectables en las hojas mientras que CYP82E4 muestra expresión exclusivamente en las hojas senescentes y CYP82E5 y CYP82E10 muestran expresión en todos los tipos de hojas

15 analizadas. La secuencia codificante del polinucleótido de NND3 codifica una nicotina N-desmetilasa funcional. El gen se expone en la sec. con núm. de ident.: 1 y la secuencia codificante del polinucleótido se expone en la sec. con núm. de ident.: 2. La secuencia polipeptídica se expone en la sec. con núm. de ident.: 3. Al reducir la expresión de este gen en las plantas de tabaco puede observarse una reducción de la conversión de nicotina a

20 nornicotina. Esto puede resultar en niveles reducidos de nornicotina y metabolitos de nornicotina - tal como NNN - que se forman durante el curado. Esto puede resultar en niveles reducidos de NNN en el humo del material de tabaco curado. Por lo tanto la presente invención es útil para modular (*por ejemplo* reducir) los niveles de nornicotina y/o los niveles de TSNA en plantas – tal como al menos NNN. En particular, la presente invención puede ser

25 particularmente útil cuando se combina con otros métodos que son capaces de reducir los niveles de nornicotina y/o TSNA - tal como NNN. Por lo tanto, puede ser ventajoso, por

ejemplo, en ciertas modalidades, reducir la expresión de la NND3 junto con uno o más de otros genes de nicotina desmetilasa en una planta de tabaco. Se espera que esta combinación reduzca adicionalmente la conversión de nicotina a nor nicotina, lo que reducirá más aún los niveles de metabolitos formados en el tabaco durante el curado y cuando se fuma el material curado. Los productos de tabaco derivados de las plantas de tabaco descritas en la presente descripción pueden encontrar uso en métodos para reducir el potencial carcinogénico de los productos de tabaco, y reducir la exposición de los seres humanos a las nitrosaminas carcinogénicas. Se contemplan una o más mutaciones en un gen que codifica la NND3, en donde las mutaciones dan como resultado una reducción de la expresión o función de la NND3.

10 Las plantas de tabaco pueden comprender además una o más mutaciones en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E4 y/o una o más mutaciones en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E5 y/o una o más mutaciones en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E4 en donde las mutaciones dentro de estos genes da como resultado una reducción de la expresión o función de la nicotina desmetilasa CYP82E4 y/o

15 CYP82E5 y/o CYP82E10.

Aspectos y modalidades de la invención

Los aspectos y modalidades de la presente invención se exponen en las reivindicaciones adjuntas.

20 En un primer aspecto, se describe una célula vegetal de tabaco mutante, de origen no natural o transgénica que comprende: (i) un polinucleótido que comprende, que consiste o que consiste esencialmente en una secuencia que codifica una nicotina N-desmetilasa funcional y que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la sec. con núm. de ident.:3; (ii) un polipéptido codificado por el polinucleótido que se expone en (i); (iii) un polipéptido que comprende, que

25 consiste o que consiste esencialmente en una secuencia que codifica una nicotina N-desmetilasa y que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la sec. con núm. de

ident.:3; o (iv) un constructo, vector o vector de expresión que comprende el polinucleótido aislado que se expone en (i), y en donde la expresión o actividad de dicha nicotina desmetilasa se reduce en comparación con una célula vegetal de tabaco control en donde la expresión o actividad de dicha nicotina desmetilasa no se ha reducido.

- 5 En una modalidad, la célula vegetal de tabaco comprende una o más mutaciones que reducen la expresión o actividad de dicha nicotina desmetilasa.

En una modalidad, la célula vegetal de tabaco mutante, de origen no natural o transgénica comprende además una o más mutaciones en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E4, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función

10 de dicha nicotina desmetilasa CYP82E4, preferentemente, en donde dicha nicotina desmetilasa CYP82E4 se selecciona del grupo que consiste en las secs. con núms. de ident.: 12 a 16 o una combinación de dos o más de estas, preferentemente, en donde dicha mutación da como resultado una modificación de dicha nicotina desmetilasa CYP82E4 y se produce en una posición seleccionada del grupo que consiste en los residuos de aminoácidos 329, 364, 376,

15 382, y 458 de la sec. con núm. de ident.: 5 o una combinación de dos o más de estos, preferentemente, en donde dicha mutación se selecciona del grupo que consiste en: a) una sustitución del codón de parada por el residuo de triptófano en la posición 329 de la sec. con núm. de ident.: 5; b) una sustitución de asparagina por el residuo de lisina en la posición 364 de la sec. con núm. de ident.: 5; c) una sustitución de metionina por el residuo de valina en la

20 posición 376 de la sec. con núm. de ident.: 5; d) una sustitución de serina por el residuo de prolina en la posición 382 de la sec. con núm. de ident.: 5; d) una sustitución de serina por el residuo de prolina en la posición 458 de la sec. con núm. de ident.: 5; y e) cualquier combinación de dos o más de estas.

En una modalidad, la célula vegetal de tabaco mutante, de origen no natural o transgénica

25 comprende además una o más mutaciones en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E5, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función

- de dicha nicotina desmetilasa CYP82E5, preferentemente, en donde dicha nicotina desmetilasa CYP82E5 se selecciona de la sec. con núm. de ident.: 24 o 25 o una combinación de estas, preferentemente, en donde dicha mutación da como resultado una modificación de dicha nicotina desmetilasa CYP82E5 y se produce en los residuos de aminoácidos 422 o 449 de la
- 5 sec. con núm. de ident.: 17 o una combinación de estos, preferentemente, en donde dicha mutación se selecciona del grupo que consiste en: a) un codón de parada sustituido por el residuo de triptófano en la posición 422 de la sec. con núm. de ident.: 17; b) una leucina sustituida por el residuo de prolina en la posición 449 de la sec. con núm. de ident.: 17; y c) una combinación de estas.
- 10 En una modalidad, la célula vegetal de tabaco mutante, de origen no natural o transgénica comprende además una o más mutaciones en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E10, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E10, preferentemente, en donde dicha nicotina desmetilasa CYP82E10 se selecciona del grupo que consiste en las secs. con núms. de ident.:
- 15 32 a 35 o una combinación de dos o más de estas, preferentemente, en donde dicha mutación da como resultado una modificación de dicha nicotina desmetilasa CYP82E10 y se produce en una posición seleccionada del grupo que consiste en los residuos de aminoácidos 79, 107, 382, 419 de la sec. con núm. de ident.: 26 o una combinación de dos o más de estos, preferentemente, en donde dicha mutación se selecciona del grupo que consiste en: a) una
- 20 sustitución de serina por el residuo de glicina en la posición 79 de la sec. con núm. de ident.: 26; b) una sustitución de serina por el residuo de prolina en la posición 107 de la sec. con núm. de ident.: 26; c) una sustitución de serina por el residuo de prolina en la posición 382 de la sec. con núm. de ident.: 26; d) una sustitución de serina por el residuo de prolina en la posición 419 de la sec. con núm. de ident.: 26; y e) cualquier combinación de estas.
- 25 En una modalidad, la célula vegetal de tabaco mutante, de origen no natural o transgénica comprende además: (i) una o más mutaciones en un gen que codifica una nicotina desmetilasa

CYP82E4, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E4, preferentemente, en donde dicha nicotina desmetilasa CYP82E4 se selecciona del grupo que consiste en las secs. con núms. de ident.: 12 a 16 o una combinación de dos o más de estas, preferentemente, en donde dicha mutación da como

5 resultado una modificación de dicha nicotina desmetilasa CYP82E4 y se produce en una posición seleccionada del grupo que consiste en los residuos de aminoácidos 329, 364, 376, 382, y 458 de la sec. con núm. de ident.: 5 o una combinación de dos o más de estos, preferentemente, en donde dicha mutación se selecciona del grupo que consiste en: a) una

10 sustitución del codón de parada por el residuo de triptófano en la posición 329 de la sec. con núm. de ident.: 5; b) una sustitución de asparagina por el residuo de lisina en la posición 364 de la sec. con núm. de ident.: 5; c) una sustitución de metionina por el residuo de valina en la posición 376 de la sec. con núm. de ident.: 5; d) una sustitución de serina por el residuo de prolina en la posición 382 de la sec. con núm. de ident.: 5; d) una sustitución de serina por el residuo de prolina en la posición 458 de la sec. con núm. de ident.: 5; y e) cualquier

15 combinación de dos o más de estas; y (ii) una o más mutaciones en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E5, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o la función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E5, preferentemente, en donde dicha nicotina desmetilasa CYP82E5 se selecciona de la sec. con núm. de ident.: 24 o 25 o una combinación de estas, preferentemente, en donde dicha mutación da como resultado una

20 modificación de dicha nicotina desmetilasa CYP82E5 y se produce en los residuos de aminoácidos 422 o 449 de la sec. con núm. de ident.: 17 o una combinación de estos, preferentemente, en donde dicha mutación se selecciona del grupo que consiste en: a) un codón de parada sustituido por el residuo de triptófano en la posición 422 de la sec. con núm. de ident.: 17; b) una leucina sustituida por el residuo de prolina en la posición 449 de la sec. con núm. de ident.: 17; y c) una combinación de estas; y (iii) una o más mutaciones en un gen

25 que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E10, en donde dicha mutación da como resultado

una reducción de la expresión o la función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E10, preferentemente, en donde dicha nicotina desmetilasa CYP82E10 se selecciona del grupo que consiste en las secs. con núms. de ident.: 32 a 35 o una combinación de dos o más de estas, preferentemente, en donde dicha mutación da como resultado una modificación de dicha nicotina desmetilasa CYP82E10 y se produce en una posición seleccionada del grupo que consiste en los residuos de aminoácidos 79, 107, 382, 419 de la sec. con núm. de ident.: 26 o una combinación de dos o más de estos, preferentemente, en donde dicha mutación se selecciona del grupo que consiste en: a) una sustitución de serina por el residuo de glicina en la posición 79 de la sec. con núm. de ident.: 26; b) una sustitución de serina por el residuo de prolina en la posición 107 de la sec. con núm. de ident.: 26; c) una sustitución de serina por el residuo de prolina en la posición 382 de la sec. con núm. de ident.: 26; d) una sustitución de serina por el residuo de prolina en la posición 419 de la sec. con núm. de ident.: 26; y e) cualquier combinación de estas.

En una modalidad, la célula vegetal de tabaco mutante, de origen no natural o transgénica comprende además (i) una o más mutaciones en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E4, una o más mutaciones en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E5 y una o más mutaciones en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E10, en donde dicha nicotina desmetilasa CYP82E4 comprende la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 13 (W329Stop), dicha nicotina desmetilasa CYP82E5 comprende la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 24 (W422Stop), y dicha nicotina desmetilasa CYP82E10 comprende la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 33 (G79S); o (ii) una o más mutaciones en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E4, una o más mutaciones en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E5 y una o más mutaciones en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E10, en donde dicha nicotina desmetilasa CYP82E4 comprende la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 13 (W329Stop), dicha nicotina desmetilasa CYP82E5 comprende la secuencia que se

expone en la sec. con núm. de ident.: 24 (W422Stop), y dicha nicotina desmetilasa CYP82E10 comprende la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 34 (P107S); o (iii) una o más mutaciones en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E4, una o más mutaciones en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E5 y una o más mutaciones en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E10, en donde dicha nicotina desmetilasa CYP82E4 comprende la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 13 (W329Stop), dicha nicotina desmetilasa CYP82E5 comprende la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 24 (W422Stop), y dichas nicotina desmetilasas CYP82E10 comprenden la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 35 (P382S); o (iv) una o más mutaciones en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E4, una o más mutaciones en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E5 y una o más mutaciones en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E10, en donde dicha nicotina desmetilasa CYP82E4 comprende la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 13 (W329Stop), dicha nicotina desmetilasa CYP82E5 comprende la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 24 (W422Stop), y dicha nicotina desmetilasa CYP82E10 comprende la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 32 (P419S).

En una modalidad, dicha(s) mutación(es) es una mutación homocigota.

En una modalidad, dicha célula vegetal o planta que comprende dicha célula vegetal tiene menos de aproximadamente 1.0 %, menos de aproximadamente 0.9 %, menos de aproximadamente 0.8 %, menos de aproximadamente 0.7 %, menos de aproximadamente 0.6 %, menos de aproximadamente 0.5 %, menos de aproximadamente 0.4 %, menos de aproximadamente 0.3 %, menos de aproximadamente 0.2 % o menos de aproximadamente 0.1 % de conversión de nicotina a nornicotina. El % de conversión se calcula con el uso de la ecuación $[\% \text{ de nornicotina} / (\% \text{ de nornicotina} + \% \text{ de nicotina})] \times 100$.

En una modalidad, dicha célula vegetal o planta que comprende dicha célula vegetal tiene menos de aproximadamente 0.04 %, menos de aproximadamente 0.03 %, menos de

aproximadamente 0.02 % o menos de aproximadamente 0.01 % de nornicotina, calculado sobre una base de peso seco.

En un aspecto adicional, se describe una planta mutante, de origen no natural o transgénica, que comprende la célula vegetal descrita en la presente descripción.

- 5 En un aspecto adicional, se describe un material vegetal que incluye biomasa, semilla, tallo u hojas a partir de la planta descrita en la presente descripción. De manera adecuada, la NND3 se expresa en las flores (por ejemplo, flor inmadura, flor madura, cápsula inmadura, cápsula seca) y las raíces del material vegetal. De manera adecuada, la NND3 se expresa exclusivamente o específicamente en las flores (por ejemplo, flor inmadura, flor madura, cápsula inmadura, cápsula seca) y las raíces del material vegetal.

En un aspecto adicional, se describe un producto de tabaco que comprende la célula vegetal, la planta o el material vegetal descritos en la presente descripción.

- En un aspecto adicional se describe un método para preparar una planta de tabaco con niveles reducidos de nornicotina y/o NNN, dicho método comprende las etapas de: (a) proporcionar una planta que comprende (i) un polinucleótido que comprende, que consiste o que consiste esencialmente en una secuencia que codifica una nicotina N-desmetilasa (funcional) y que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la sec. con núm. de ident.:2; (b) insertar una o más mutaciones en dicho polinucleótido de dicha planta de tabaco para crear una planta de tabaco mutante; (c) opcionalmente curar el material vegetal de tabaco; y (d) medir el nivel de nornicotina y/o NNN en la planta de tabaco mutante, en donde una disminución en el nivel de nornicotina y/o NNN en la planta de tabaco mutante en comparación con una planta de tabaco control es indicativo de que los niveles de nornicotina y/o NNN en dicha planta de tabaco mutante se han reducido. Se contempla además el uso de fragmentos de las secuencias descritas en la presente descripción. Por ejemplo, los fragmentos pueden usarse como constructos de ARNi para modular la expresión.

En una modalidad, la planta de tabaco en la etapa (b) es una planta de tabaco mutante, preferentemente, en donde dicha planta de tabaco mutante comprende una o más mutaciones en uno o más genes adicionales de nicotina N-desmetilasa.

En una modalidad, dicha planta de tabaco mutante tiene una o más mutaciones adicionales en
5 los genes que consisten en el grupo de CYP82E4, CYP82E5 o CYP82E10 o una combinación de dos o más de estos.

En una modalidad, la planta de tabaco en la etapa (b) es una planta de tabaco mutante que tiene niveles reducidos de nor nicotina en comparación con una planta de tabaco control.

En una modalidad, dicha planta de tabaco tiene una o más mutaciones en CYP82E4, CYP82E5
10 o CYP82E10 o una combinación de dos o más de estos.

En un aspecto adicional se describe un método para identificar una o más mutaciones en una planta de tabaco que se correlaciona con niveles bajos de nor nicotina y/o NNN, dicho método comprende las etapas de: (a) identificar una planta de tabaco con niveles bajos de nor nicotina y/o NNN en comparación con una planta de tabaco control; (b) proporcionar una muestra de
15 ácido nucleico de la planta de tabaco identificada en la etapa (a); (c) analizar la muestra de ácido nucleico de la etapa (b) para determinar la presencia de una o más mutaciones en la secuencia de sec. con núm. de ident.: 2 que no están presentes en la planta control; (d) opcionalmente comparar la una o más mutaciones identificadas en la etapa (c) con mutaciones conocidas que reducen los niveles de nor nicotina y/o NNN en una planta de tabaco; y (e)
20 identificar las una o más mutaciones que se correlacionan con niveles bajos de nor nicotina y/o NNN.

En un aspecto adicional, se describe un método para producir material vegetal curado, preferentemente hojas curadas, con niveles reducidos de nor nicotina y/o al menos NNN en él que comprende las etapas de: (a) proporcionar al menos parte de una planta o material vegetal
25 como se describe en la presente descripción; (b) opcionalmente cosechar el material vegetal a

partir de ahí; y (c) curar el material vegetal durante un período de tiempo suficiente para reducir los niveles de nor nicotina y/o al menos NNN en él.

En un aspecto adicional se describe una planta de tabaco que comprende una o más mutaciones en un gen que codifica una nicotina desmetilasa NND3, una o más mutaciones en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E10, una o más mutaciones en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E4, y una o más mutaciones en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E5, opcionalmente en donde dicha nicotina desmetilasa CYP82E10 comprende una mutación en la posición 382 de la sec. con núm. de ident.: Sec. con núm. de ident.: 26, dicha nicotina desmetilasa CYP82E4 comprende una mutación en la posición 329 de la sec. con núm. de ident.: 5, y dicha nicotina desmetilasa CYP82E5 comprende una mutación en la posición 422 de la sec. con núm. de ident.: 17, preferentemente, en donde cada una de dichas mutaciones es una mutación homocigota.

En un aspecto adicional se describe una planta de tabaco que comprende una o más mutaciones en un gen de NND3 que inhibe la actividad de nicotina desmetilasa en las flores (por ejemplo, flor inmadura, flor madura, cápsula inmadura, cápsula seca) y las raíces, una o más mutaciones en un gen de CYP82E10 que inhibe la actividad de nicotina desmetilasa en las raíces y/o las hojas, una o más mutaciones en un gen de CYP82E4v2 que inhibe la actividad de nicotina desmetilasa en las hojas senescentes, y una o más mutaciones en un gen de CYP83E5v2 que inhibe la actividad de nicotina desmetilasa en las raíces y/o las hojas.

En un aspecto adicional se describe una secuencia polinucleotídica aislada que comprende, que consiste o que consiste esencialmente en una secuencia que codifica una nicotina N-desmetilasa NND3 y que tiene la secuencia de sec. con núm. de ident.:2, o al menos 95 % de identidad de secuencia con la sec. con núm. de ident.:2, preferentemente en donde dicho polinucleótido aislado es un polinucleótido sintético o ADNc.

En un aspecto adicional, se describe un polipéptido aislado codificado por el polinucleótido descrito en la presente descripción.

En un aspecto adicional se describe un polipéptido aislado que comprende, que consiste o que consiste esencialmente en una secuencia que codifica una nicotina N-desmetilasa NND3 y que tiene la secuencia de sec. con núm. de ident.:3, o al menos 95 % de identidad de secuencia con la sec. con núm. de ident.:3, preferentemente en donde dicho polipéptido aislado es un polipéptido sintético. Se contemplan además fragmentos del polipéptido como se describe en la presente descripción.

En un aspecto adicional, se describe un constructo, vector o vector de expresión que comprende el polinucleótido aislado descrito en la presente descripción.

En un aspecto adicional se describe una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa NND3, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa NND3.

En un aspecto adicional, se describe un método para reducir el nivel de nornicotina, o reducir la velocidad de conversión de nicotina a nornicotina, o reducir el nivel de al menos NNN en una célula vegetal de tabaco que comprende las etapas de: (a) reducir la expresión o actividad de:

(i) un polinucleótido que comprende, que consiste o que consiste esencialmente en una secuencia que codifica una nicotina N-desmetilasa y que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la sec. con núm. de ident.:2; (ii) un polipéptido codificado por el polinucleótido que se expone en (i); (iii) un polipéptido que comprende, que consiste o que consiste esencialmente en una secuencia que codifica una nicotina N-desmetilasa y que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la sec. con núm. de ident.:3; (b) medir al menos el contenido de nornicotina y/o NNN en la célula vegetal obtenida en la etapa (a); y (c) identificar una célula vegetal en donde al menos el contenido de nornicotina y/o NNN en ella ha cambiado en comparación con una planta control en la que la expresión o actividad del polinucleótido o polipéptido que se expone en (a) no se ha modulado.

En un aspecto adicional, se proporciona un método para reducir un potencial carcinogénico de un producto de tabaco, dicho método comprende preparar dicho producto de tabaco a partir de una planta de tabaco, o progenie de esta como se describe en la presente descripción.

En un aspecto adicional, se proporciona un método para reducir el nivel de nor nicotina, o reducir la velocidad de conversión de nicotina a nor nicotina, o reducir el nivel de al menos NNN en una planta de tabaco, dicho método comprende introducir en el genoma de dicha planta una o más mutaciones dentro de al menos un alelo del gen de nicotina desmetilasa NND3, en donde dicha mutación reduce la expresión de dicho gen de nicotina desmetilasa.

En una modalidad, la NND3 se expresa en las flores (por ejemplo, flor inmadura, flor madura, cápsula inmadura, cápsula seca) y las raíces.

En una modalidad, la NND3 se expresa exclusivamente o específicamente en las flores (por ejemplo, flor inmadura, flor madura, cápsula inmadura, cápsula seca) y las raíces.

Cada una de las modalidades discutidas anteriormente se describe como modalidades de cada uno de los aspectos de la invención. Se contemplan además combinaciones de una o más de las modalidades.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra los niveles de expresión relativa de *NND3* y los genes de *CYP82E* funcionales relacionados en diferentes tejidos vegetales. Las barras indican la media $\pm$ SD de tres réplicas biológicas tomadas de tres plantas maduras de *N. tabacum* var. TN90 cultivadas en invernadero.

La Figura 2 muestra la expresión relativa de NND3 (A) y los niveles de conversión de nicotina a nor nicotina (B) medidos en hojas de plantas T_0 individuales maduras, transformadas con una secuencia codificante de *NND3* bajo un promotor constitutivo fuerte en el fondo *cyp82e4/cyp82e5/cyp82e10* de TN90 convertidor ultra bajo.

La Figura 3 muestra los niveles de expresión relativa de *NND3* y los genes de *CYP82E* funcionales relacionados en hojas de *N. tabacum* var. Stella en diferentes puntos de tiempo de curado. Las muestras se toman a partir de mezclas de varias hojas. Se analizan dos mezclas como réplicas biológicas – (a) réplica 1 y (b) réplica 2. Las barras indican la media $\pm$ SD de tres
5 réplicas técnicas.

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
10 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
15 rango numérico dado se refieren a un valor o rango que está dentro del 20 %, dentro del 10 %, o dentro del 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 % del valor o rango 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
20 componentes de ácidos nucleicos para permitir la expresión de un ácido nucleico. Los vectores de expresión 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 expresión equivalentes funcionalmente de cualquier origen. Un vector de expresión comprende al menos un promotor ubicado aguas arriba y unido
25 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 de doble cadena, 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 contraria (o antisentido) con respecto a la orientación de un promotor ubicado 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 de 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, típicamente ubicado aguas arriba y unido operativamente a un fragmento de ADN de doble cadena. Los promotores pueden derivarse totalmente de regiones próximas a un gen de interés nativo, o pueden estar compuestos de diferentes elementos derivados de diferentes promotores nativos 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 compatibles, 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 con el uso de un programa informático tal como - ClustalW, BLAST, FASTA o Smith-Waterman.

Una "variante" significa una secuencia esencialmente similar. Una variante puede tener una función similar o una función esencialmente similar a la de la secuencia de tipo silvestre. Para

5 una nicotina desmetilasa, una función similar es al menos aproximadamente 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % de la función de la enzima de tipo silvestre de convertir nicotina a nor nicotina en las mismas condiciones. Para una nicotina desmetilasa, una función sustancialmente similar es al menos aproximadamente 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de la función de la enzima de tipo silvestre de convertir nicotina a nor nicotina en las mismas condiciones. Por ejemplo, la

10 secuencia codificante de NND3 de tipo silvestre se expone en la sec. con núm. de ident.: 2.

Las variantes pueden tener una o más mutaciones favorables que dan como resultado que la enzima tenga un nivel reducido de la actividad de nicotina desmetilasa en comparación con el polipéptido de tipo silvestre. Las variantes pueden tener una o más mutaciones favorables que dan como resultado la desactivación de su actividad de nicotina desmetilasa (*es decir* 100 % de

15 inhibición y, por lo tanto, un polipéptido no funcional). Las variantes ilustrativas de CYP82E10 de tipo silvestre incluyen CYP82E10 P419S que tiene una mutación favorable que da como resultado la enzima que solo tiene aproximadamente 25 % de la actividad de nicotina desmetilasa del polipéptido CYP82E10 de tipo silvestre. Las variantes CYP82E10 G79S, CYP82E10 P107S y CYP82E10 P382S tienen mutaciones favorables que dan como resultado

20 la desactivación de su actividad de nicotina desmetilasa (*es decir* 100 % de inhibición y, por lo tanto, un polipéptido no funcional). Las variantes ilustrativas de CYP82E4 de tipo silvestre incluyen CYP82E4 V376M que tiene una mutación favorable que da como resultado la enzima

que solo tiene aproximadamente 50 % de la actividad de nicotina desmetilasa del polipéptido CYP82E4 de tipo silvestre. Las variantes CYP82E4 W329Stop, CYP82E4 K364N, CYP82E4

25 P382S y CYP82E4 P458S tienen mutaciones favorables que resultan en la desactivación de su actividad de nicotina desmetilasa (*es decir* 100 % de inhibición y, por lo tanto, un polipéptido no

funcional). Las variantes ilustrativas de CYP82E5 de tipo silvestre incluyen CYP82E5 P449L que tiene una mutación favorable que da como resultado la inhibición de su actividad de nicotina desmetilasa, y la variante CYP82E5 W22Stop tiene una mutación favorable que da como resultado la desactivación de su actividad de nicotina desmetilasa (es decir, 100 % de inhibición, y por lo tanto un polipéptido no funcional). Las combinaciones de estas variantes se describen en la presente descripción.

El término "planta" se refiere a cualquier planta o parte de una planta en cualquier etapa de su ciclo de vida o desarrollo, y su progenie. En una modalidad, la planta es una "planta de tabaco", la cual se refiere a una planta que pertenece al género *Nicotiana*. Las especies preferidas de plantas de tabaco se describen en la presente descripción.

"Partes de la planta" incluye células vegetales, protoplastos vegetales, cultivos de tejido de células vegetales a partir de las cuales puede regenerarse una planta completa, callos de plantas, aglomerados vegetales y células vegetales que están intactas en plantas o partes de plantas tales como embriones, polen, anteras, óvulos, semillas, hojas, flores, tallos, ramas, frutos, raíces, ápices radicales y similares. Dentro del alcance de la descripción se incluye, además, la progenie, variantes y mutantes de plantas regeneradas, siempre y cuando comprendan los polinucleótidos introducidos descritos 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 organizada, tal como pero no se limitan a, un tejido vegetal, un órgano de una planta, o una planta completa.

El término "material vegetal" se refiere a cualquier composición sólida, líquida o gaseosa, o sus combinaciones, obtenible a partir de una planta, que incluye biomasa, hojas, tallos, raíces, flores o partes de una flor, frutos, polen, óvulos, cigotos, semillas, esquejes, secreciones, extractos, cultivos de células o tejidos, o cualquiera de otras partes o productos de una planta.

En una modalidad, el material vegetal comprende o consiste en biomasa, tallo, semilla u hojas.

En otra modalidad, el material vegetal comprende o consiste en las 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. A la vez que poseen uno o

5 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

10 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 "modular" puede referirse a reducir, inhibir, aumentar o afectar de cualquier otra manera la expresión o la actividad de un polipéptido. El término puede referirse además a reducir, inhibir, aumentar o afectar de cualquier otra manera la actividad de un gen que codifica

15 un polipéptido, lo cual puede incluir, pero no se limitan 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

20 98 %, al menos 99 %, o al menos 100 % o más de una cantidad o una actividad, tal como pero no se limitan a la actividad de un polipéptido, la actividad transcripcional y la expresión de proteínas.

El término "inhibir" o "inhibido" como se usa en la presente descripción, se refiere a una reducción desde aproximadamente 98 % hasta aproximadamente 100 %, o una reducción de al

25 menos 98 %, al menos 99 %, pero particularmente de 100 %, de una cantidad o una actividad,

tal como pero no se limitan a la actividad de un polipéptido, la actividad transcripcional y la expresión de proteínas.

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

10 El término "control" en el contexto de una planta control significa una planta o célula vegetal en la que la expresión o actividad de una enzima no se ha modificado (por ejemplo, aumentado o reducido) y así puede proporcionar una comparación con una planta en la que la expresión o actividad de la enzima se ha modificado. La planta control puede comprender un vector vacío. La planta o célula vegetal control puede corresponder a una planta de tipo silvestre o célula
15 vegetal de tipo silvestre. Por ejemplo, la planta o célula vegetal control puede tener el mismo genotipo que el material de partida para la alteración genética que resultó en la planta objetivo. En todos estos casos, la planta objetivo y la planta control se cultivan y se cosechan con el uso de los mismos protocolos para propósitos comparativos. Los cambios en los niveles, relaciones, actividad, o distribución de los genes o polipéptidos descritos en la presente
20 descripción, o los cambios en el fenotipo de la planta de tabaco, particularmente la reducción de la acumulación de nornicotina y su metabolito carcinogénico, la NNN, pueden medirse mediante la comparación de una planta objetivo con la planta control, donde la planta objetivo y la planta control se han cultivado y/o cosechado con 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
25 objetivo. La medición de los cambios en el fenotipo puede medirse en cualquier momento en una planta, que incluye durante el desarrollo de la planta, la senescencia, o después del curado.

La medición de los cambios en el fenotipo puede medirse en plantas cultivadas en cualquier condición, que incluyen plantas cultivadas en cámara de crecimiento, invernadero, o en un campo. Los cambios en el fenotipo pueden medirse mediante la determinación de la velocidad de conversión de nicotina a nor nicotina. La conversión puede medirse al dividir el porcentaje de nor nicotina o un metabolito de esta (como un porcentaje del peso total del tejido) por la suma del porcentaje de nicotina y nor nicotina o un metabolito de esta (como porcentajes del peso total del tejido) y multiplicarlo por 100. Los cambios en el fenotipo pueden medirse mediante la medición del contenido de TSNA – tal como al menos el contenido de NNN con el uso de métodos que se conocen bien en la técnica.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En una modalidad, se proporciona un polinucleótido aislado que comprende, que consiste o que consiste esencialmente en una secuencia de polinucleótido que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias descritas en la presente descripción, que incluyen cualquiera de los polinucleótidos mostrados en el listado de secuencias. De manera adecuada, el polinucleótido aislado comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que tiene al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con él.

En otra modalidad, se proporciona un polinucleótido aislado que comprende, que consiste o que consiste esencialmente en una secuencia de polinucleótido que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la sec. con núm. de ident.:2. De manera adecuada, el polinucleótido aislado comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que tiene al menos aproximadamente 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 la sec. con núm. de ident.:2.

En otra modalidad, se proporciona un polinucleótido que comprende, que consiste o que consiste esencialmente en un polinucleótido con sustancial homología (es decir, similitud de secuencias) o identidad sustancial con la sec. con núm. de ident.:2.

En otra modalidad, se proporcionan variantes de polinucleótidos que tienen al menos
5 aproximadamente 95 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99.1 %, 99.2 %, 99.3 %, 99.4 %, 99.5 %, 99.6 %, 99.7 %, 99.8 % o 99.9 % de identidad de secuencia con la secuencia de sec. con núm. de ident.:2.

En otra modalidad, se proporcionan fragmentos de la sec. con núm. de ident.:2 con sustancial homología (es decir, similitud de secuencias) o identidad sustancial con ella que tienen al
10 menos aproximadamente 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 los fragmentos correspondientes de la sec. con núm. de ident.:2.

Preferentemente, los fragmentos tienen la identidad de secuencia indicada en un tramo de al menos 15 nucleótidos contiguos de la sec. con núm. de ident.:1. En modalidades, la identidad
15 de secuencia se extiende a al menos 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más nucleótidos contiguos.

En otra modalidad, se proporcionan polinucleótidos que comprenden un grado suficiente o sustancial de identidad o similitud con la sec. con núm. de ident.:2 que codifica un polipéptido que funciona como una nicotina N-desmetilasa. De manera adecuada, el o los polinucleótidos descritos en la presente descripción codifican una proteína con actividad de nicotina N-
20 desmetilasa que es al menos aproximadamente 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % o más de la actividad de la proteína que se expone en la sec. con núm. de ident.:3. Para determinar si un polipéptido es una nicotina desmetilasa funcional, su ADNc puede clonarse en un vector de expresión y transformarse en una cepa de levadura - tal como la cepa W(R). La cepa W(R) es una línea celular de levadura que se ha diseñado para
25 sobreexpresar la P450 reductasa dependiente de NADPH de levadura, una enzima que sirve como el donante directo de electrones a P450; este sistema mejora la detección de actividades

de enzimas de P450 extrañas que se expresan en levadura (Pompon y otros, (1995) *Methods Enzymol.* 272: 51-64). Los ensayos de nicotina desmetilasas pueden realizarse mediante la incubación de preparaciones de membrana microsomal de levadura con [¹⁴C]-nicotina, y la determinación de los productos por cromatografía en capa fina como se describe en Siminszky y otros. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 14919-14924.

Un polinucleótido como se describe en la presente descripción puede incluir un polímero de nucleótidos, que puede ser ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN) no modificados o modificados. En consecuencia, un polinucleótido puede ser, sin limitación, un ADN genómico, ADN complementario (ADNc), ARNm, o ARN antisentido o un fragmento(s) de estos. Además, un polinucleótido puede ser ADN de una sola cadena o de doble cadena, ADN que es una mezcla de regiones de una sola cadena y de doble cadena, una molécula híbrida que comprende ADN y ARN, o una molécula híbrida con una mezcla de regiones de una sola cadena y de doble cadena o un fragmento(s) de estas. Adicionalmente, el polinucleótido puede estar compuesto de regiones de triple cadena que comprenden ADN, ARN, o ambos o un fragmento(s) de estos. Un polinucleótido puede contener una o más bases modificadas, tales como fosfotioatos, y puede ser un ácido nucleico péptido. Generalmente, los polinucleótidos pueden ensamblarse a partir de fragmentos de ADNc, ADN genómico, oligonucleótidos aislados o clonados, o nucleótidos individuales, o una combinación de lo anterior. Aunque las secuencias de polinucleótidos descritas en la presente descripción se muestran como secuencias de ADN, las secuencias incluyen sus secuencias de ARN correspondientes, y sus secuencias de ADN o ARN complementarias (por ejemplo, completamente complementarias), que incluyen los complementos inversos de estas.

Un polinucleótido como se describe en la presente descripción generalmente contendrá enlaces fosfodiéster, aunque en algunos casos se incluyen análogos de polinucleótidos que pueden tener cadenas principales alternas, que comprenden, por ejemplo, fosforamidato, fosforotioato, fosforoditioato, o enlaces O-metilfosforoamidita; y cadenas principales y enlaces de

polinucleótidos péptidos. Otros polinucleótidos análogos 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; alternatively, pueden obtenerse mezclas de diferentes análogos de polinucleótidos, y mezclas de polinucleótidos y análogos de origen natural.

Se conoce una variedad de análogos de polinucleótidos, que incluyen, por ejemplo, enlaces fosforamidato, fosforotioato, fosforoditioato, O-metilfosforoamidita y cadenas principales y enlaces de polinucleótidos péptidos. Otros polinucleótidos análogos 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 carboxílicos.

Otros análogos incluyen polinucleótidos péptidos que son análogos de polinucleótidos péptidos.

Estas cadenas principales son esencialmente no iónicas bajo condiciones neutras, a diferencia de la cadena principal de fosfodiéster altamente cargada de los polinucleótidos de origen natural. Esto puede resultar en ventajas. Primero, la cadena principal del polinucleótido péptido puede exhibir mejor cinética de hibridación. Los polinucleótidos péptidos tienen cambios más grandes en la temperatura de fusión por los pares de bases no apareadas vs. las perfectamente apareadas. El ADN y el ARN típicamente exhiben una caída de 2-4 °C en la temperatura de fusión por un no apareamiento interno. Con la cadena principal no iónica del polinucleótido péptido, la caída es cercana a 7-9 °C. Similarmente, debido a su naturaleza no iónica, la hibridación de las bases unidas a estas cadenas principales es relativamente insensible a la concentración de sales. Adicionalmente, los polinucleótidos péptidos no deben degradarse o se degradan en una menor extensión por las enzimas celulares, y así pueden ser más estables.

Entre los usos de los polinucleótidos descritos, y fragmentos de estos, está el uso de fragmentos como sondas en ensayos de hibridación de ácidos nucleicos o cebadores para el uso en ensayos de amplificación de ácidos nucleicos. Tales fragmentos generalmente comprenden al menos aproximadamente 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 o más nucleótidos contiguos de una secuencia de ADN. En otras modalidades, un fragmento de ADN comprende al menos aproximadamente 10, 15, 20, 30, 40, 50 o 60 o más nucleótidos contiguos de una secuencia de ADN. Así, en un aspecto, se proporciona además un método para detectar un polinucleótido que codifica una proteína con un miembro con actividad de nicotina N-desmetilasa o que codifica una enzima nicotina N-desmetilasa que comprende el uso de sondas o cebadores o ambos.

Los parámetros básicos que afectan la elección de las condiciones de hibridación y la guía para proyectar las condiciones adecuadas se describen por Sambrook, J., E. F. Fritsch, y T. Maniatis (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.). Con el uso del conocimiento del código genético en combinación con las secuencias de aminoácidos descritas 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. Tales genotecas incluirían pero no se limitan a genotecas de ADNc, genotecas genómicas, e incluso genotecas de ADN o etiquetas de secuencias de expresión electrónicas. Las secuencias homólogas identificadas por 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 proyectar las condiciones adecuadas se exponen en Sambrook, J., E. F. Fritsch, y T. Maniatis (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. y pueden determinarse fácilmente por los expertos en la técnica en base a, por ejemplo, la longitud o la composición de bases del polinucleótido. Una manera de lograr condiciones moderadamente rigurosas implica el uso de una solución de prelavado que contiene Citrato de sodio estándar 5x, Dodecil sulfato de sodio 0,5 %, ácido etilendiaminotetraacético 1,0 mM (pH 8,0), amortiguador de hibridación de aproximadamente 50 % de formamida, 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 aproximadamente 50 % de formamida, 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 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 0,1 %. SSPE (SSPE 1 x 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 1 x es cloruro de sodio 0.15 M y citrato de sodio 15 mM) en los amortiguadores 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 al aplicar 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 además se describe más abajo (ver, por ejemplo, Sambrook, J., E. F. Fritsch, y T. Maniatis (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y). 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 al alinear las secuencias de los polinucleótidos e identificar la región o regiones de óptima complementariedad de secuencias. La temperatura de hibridación para los híbridos que se anticipa que sean menores que 50 pares de bases de longitud debe ser de 5 a 10 °C menor que la temperatura de fusión del híbrido, donde la temperatura de fusión se determina de conformidad con las siguientes ecuaciones. Para híbridos menores de 18 pares de bases de longitud, la temperatura de fusión ($^{\circ}\text{C}$) = $2(\text{número de bases A+T}) + 4(\text{número de bases G+C})$. Para híbridos por encima de 18 pares de bases de longitud, la temperatura de fusión ($^{\circ}\text{C}$) = $81.5 + 16.6(\log_{10} [\text{Na}^{+}]) + 0.41(\% \text{ G+C}) - (600/\text{N})$, donde N es el número de bases en el híbrido, y $[\text{Na}^{+}]$ es la concentración de iones de sodio en el amortiguador de hibridación ($[\text{Na}^{+}]$ para el Citrato de sodio estándar $1x = 0.165\text{M}$). 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.

Como se entenderá por el experto en la técnica, un ADN lineal tiene dos orientaciones posibles: la dirección 5' a 3' y la dirección 3' a 5'. Por ejemplo, si una secuencia de referencia se ubica en la dirección 5' a 3', y si una segunda secuencia se ubica en la dirección 5' a 3' dentro de la misma molécula/cadena de polinucleótido, entonces la secuencia de referencia y la segunda secuencia están orientadas en la misma dirección, o tienen la misma orientación. Típicamente, una secuencia promotora y un gen de interés bajo la regulación del promotor dado están ubicados en la misma orientación. Sin embargo, con respecto a la secuencia de referencia ubicada en la dirección 5' a 3', si una segunda secuencia está ubicada en la dirección 3' a 5' dentro de la misma molécula/cadena de polinucleótido, entonces la secuencia de referencia y la segunda secuencia están orientadas en la dirección antisentido, o tienen orientación

antisentido. Dos secuencias que tienen orientaciones antisentido una con respecto a la otra pueden describirse alternativamente como que tienen la misma orientación, si la secuencia de referencia (dirección 5' a 3') y la secuencia complementaria inversa de la secuencia de referencia (secuencia de referencia ubicada en 5' a 3') están ubicadas dentro de la misma molécula/cadena de polinucleótido. Las secuencias que se exponen en la presente descripción se muestran en la dirección 5' a 3'.

Los constructos recombinantes proporcionados en la presente descripción pueden usarse para transformar plantas o células vegetales con el objetivo de modular los niveles de expresión y/o actividad de proteínas. Un constructo de polinucleótido recombinante puede comprender un polinucleótido que codifica uno o más polinucleótidos como se describe en la presente descripción, unido operativamente a una región regulatoria adecuada para expresar el polipéptido. Así, un polinucleótido puede comprender una secuencia codificante que codifica el polipéptido como se describe en la presente descripción. Las plantas o células vegetales en las que se modulan los niveles de expresión o actividad de proteínas pueden incluir plantas mutantes, plantas de origen no natural, plantas transgénicas, plantas creadas por el hombre o plantas o células vegetales diseñadas por ingeniería genética. De manera adecuada, la planta o célula vegetal transgénica comprende un genoma que se ha modificado mediante la integración estable de ADN recombinante. El ADN recombinante incluye ADN que se ha diseñado por ingeniería genética y se ha construido fuera de una célula e incluye ADN que contiene ADN de origen natural o ADNc o ADN sintético. Una planta transgénica puede incluir una planta regenerada a partir de una célula vegetal transformada originalmente y plantas transgénicas de la progenie a partir de generaciones posteriores o cruces de una planta transformada. De manera adecuada, la modificación transgénica altera la expresión o actividad del polinucleótido o el polipéptido descrito en la presente en comparación con una planta control. El polipéptido codificado por un polinucleótido recombinante puede ser un polipéptido nativo, o puede ser heterólogo a la célula. En algunos casos, el constructo recombinante contiene un

polinucleótido que modula la expresión, unido operativamente a una región regulatoria. En la presente se describen ejemplos de regiones regulatorias adecuadas.

Se proporcionan, además, vectores que contienen constructos de polinucleótidos recombinantes tales como los descritos en la presente descripción. Las cadenas principales de

5 los vectores adecuados incluyen, por ejemplo, las que se usan de manera rutinaria en la técnica tales como plásmidos, virus, cromosomas artificiales, cromosomas artificiales de bacterias, cromosomas artificiales de levaduras, o cromosomas artificiales de bacteriófagos. 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
10 están disponibles comercialmente. Los vectores pueden incluir, por ejemplo, orígenes de replicación, regiones de unión de supercántigos 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, canamicina, G418, bleomicina, o higromicina), o un herbicida (por ejemplo, glifosato, clorosulfuron o
15 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
20 etiquetas pueden insertarse en cualquier lugar dentro del polipéptido, que incluye lo mismo en el carboxilo terminal como en el amino terminal.

Una planta o célula vegetal puede transformarse al tener el polinucleótido recombinante integrado en su genoma para convertirse en establemente transformada. La planta o célula vegetal descrita en la presente descripción puede transformarse de manera estable. Las
25 células transformadas de manera estable típicamente retienen el polinucleótido introducido con cada división celular. Una planta o célula vegetal puede transformarse de manera transitoria de

manera que el polinucleótido recombinante no se integra en su genoma. Las células transformadas de manera transitoria típicamente pierden 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

5 suficiente número de divisiones celulares. De manera adecuada, la NND3 se expresa en las flores (por ejemplo, flor inmadura, flor madura, cápsula inmadura, cápsula seca) y las raíces de una planta. De manera adecuada, la NND3 se expresa exclusivamente o específicamente en las flores (por ejemplo, flor inmadura, flor madura, cápsula inmadura, cápsula seca) y las raíces de una planta. Se contempla, además, el uso de edición de genomas.

10 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

15 para la ingeniería genética de plantas. Las moléculas de ADN recombinante desnudo que comprenden secuencias de ADN que corresponden a la proteína de tabaco purificada objetivo 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 de tabaco mediante técnicas con polietilenglicol o mediante técnicas

20 de electroporación, las cuales son estándar. Alternativamente, tales vectores que comprenden moléculas de ADN recombinante que codifican la proteína de tabaco purificada objetivo se introducen en células vivas de *Agrobacterium*, las que después transfieren el ADN dentro de las células vegetales de tabaco. La transformación por ADN desnudo sin secuencias acompañantes del vector de T-ADN puede llevarse a cabo mediante la fusión de protoplastos

25 de tabaco con liposomas que contienen ADN o mediante electroporación. El ADN desnudo no

acompañado por secuencias del vector de T-ADN puede usarse, además, para transformar células de tabaco mediante microproyectiles inertes, de alta velocidad.

Si se usa una célula o tejido en cultivo como el tejido recipiente para la transformación, las plantas pueden regenerarse a partir de cultivos transformados si se desea, mediante técnicas

5 conocidas por los expertos en la técnica.

La elección de incluir regiones regulatorias en un constructo recombinante depende de varios factores, que incluyen, pero no se limitan a, eficacia, selectividad, inducibilidad, nivel de expresión deseado, y expresión preferencial en células o tejidos. Para un experto en la técnica es un asunto de rutina modular la expresión de una secuencia codificante al seleccionar y

10 ubicar apropiadamente las regiones regulatorias con relación a la secuencia codificante. La transcripción de un polinucleótido puede modularse 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.

15 Los promotores adecuados incluyen promotores específicos de tejidos reconocidos 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. Los promotores adecuados incluyen promotores constitutivos que

20 pueden activarse en la mayoría de los tipos celulares sin requerir inductores específicos. Los ejemplos de promotores adecuados 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. Las personas con experiencia en la técnica son capaces de generar múltiples variaciones de promotores recombinantes.

25 Los promotores específicos de tejidos son elementos de control transcripcional que solo son activos en células o tejidos particulares en momentos específicos durante el desarrollo de la

planta, tal como en tejidos vegetativos o tejidos reproductivos. La expresión específica de tejidos puede ser ventajosa, por ejemplo, cuando se prefiere la expresión de polinucleótidos en ciertos tejidos. Los ejemplos de promotores específicos de tejidos bajo el control del desarrollo incluyen promotores que pueden iniciar la transcripción solo (o fundamentalmente solo) en
5 ciertos tejidos, tales como tejidos vegetativos, por ejemplo, raíces u hojas, o tejidos reproductivos, tales como frutos, óvulos, semillas, polen, pistilos, flores, o cualquier tejido embrionario. Los promotores específicos de tejidos reproductivos pueden ser, por ejemplo, específicos de anteras, específicos de óvulos, específicos de embriones, específicos del endospermo, específicos del tegumento, específicos de la cubierta de semillas y de semillas,
10 específicos del polen, específicos de pétalos, específicos de sépalos, o combinaciones de estos.

Los promotores específicos de hojas adecuados incluyen el promotor de piruvato, ortofosfato diquinasa (PPDK) de plantas C4 (maíz), promotor cab-m1Ca⁺² del maíz, el promotor del gen relacionado con myb de *Arabidopsis thaliana* (Atmyb5), los promotores de ribulosa bifosfato
15 carboxilasa (RBCS) (por ejemplo, los genes de tomate RBCS 1, RBCS2 y RBCS3A expresados en hojas y plántulas cultivadas a la luz, RBCS1 y RBCS2 expresados en frutos de tomate en desarrollo o el promotor de ribulosa bisfosfato carboxilasa expresado casi exclusivamente en células del mesófilo en las láminas y las vainas foliares en niveles altos).

Los promotores adecuados específicos de la senescencia incluyen un promotor de tomate
20 activo durante la maduración de los frutos, la senescencia y la abscisión de las hojas, un promotor de maíz de un gen que codifica una cisteína proteasa, el promotor de 82E4 y el promotor de los genes SAG. Pueden usarse promotores específicos de anteras adecuados. Los promotores adecuados con preferencia por la raíz conocidos por los expertos en la técnica pueden seleccionarse. Los promotores adecuados con preferencia por las semillas incluyen
25 tanto los promotores específicos de semillas (los promotores activos durante el desarrollo de la semilla tales como los promotores de proteínas de almacenamiento en semillas) y promotores

de la germinación de semillas (los promotores activos durante la germinación de semillas). Tales promotores con preferencia por las semillas incluyen, pero no se limitan a, Cim1 (mensaje inducido por citoquinina); cZ19B1 (zeína de 19 kDa de maíz); milps (mio-inositol-1-fosfato sintasa); mZE40-2, conocido además como Zm-40; nuclc; y celA (celulosa sintasa). Gama-zeína es un promotor específico del endospermo. Glob-1 es un promotor específico del embrión. Para las dicotiledóneas, los promotores específicos de semillas incluyen, pero no se limitan a, beta-faseolina de frijol, napin, β -conglucina, lectina de frijol de soya, cruciferina, y similares. Para las monocotiledóneas, los promotores específicos de semillas incluyen, pero no se limitan a, un promotor de zeína de 15 kDa de maíz, un promotor de zeína de 22 kDa, un promotor de zeína de 27 kDa, un promotor de g-zeína, un promotor de gamma-zeína de 27 kDa (tal como el promotor gzw64A, ver número de acceso al banco de genes S78780), un promotor ceroso, un promotor encogido 1, un promotor encogido 2, un promotor de globulina 1 (ver el número de acceso al banco de genes L22344), un promotor ltp2, promotor cim1, promotores de maíz end1 y end2, promotor nuc1, promotor Zm40, eep1 y eep2; promotor lec1, tioredoxina H; promotor mlip15, promotor PCNA2; y el promotor encogido-2.

Los ejemplos de promotores inducibles incluyen promotores que responden al ataque de patógenos, condiciones anaeróbicas, temperatura elevada, luz, sequía, temperatura fría, o alta concentración de sales. Los promotores inducibles por patógenos incluyen los de las proteínas relacionadas con la patogénesis (proteínas PR), las cuales se inducen después de una infección por un patógeno (por ejemplo, proteínas PR, proteínas SAR, beta-1,3-glucanasa, quitinasa).

Adicionalmente a los promotores de plantas, otros promotores adecuados pueden derivar 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 derivar de promotores virales (por ejemplo, promotores del 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 celedonia).

En otro aspecto, se proporciona un polipéptido aislado que comprende, que consiste o que consiste esencialmente en una secuencia de polipéptido que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de polipéptidos descritas en la presente descripción, que incluyen cualquiera de los polipéptidos mostrados en el listado de secuencias.

De manera adecuada, 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 ellas. En

una modalidad, se proporciona un polipéptido codificado por la sec. con núm. de ident.: 3.

En otra modalidad, se proporciona un polipéptido aislado que comprende, que consiste o que 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 la sec. con núm. de ident.: 3.

En otra modalidad, se proporciona una variante de polipéptido que comprende, que consiste o que consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos codificada por una variante de polinucleótido con al menos aproximadamente 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99.1 %, 99.2 %, 99.3 %, 99.4 %, 99.5 %, 99.6 %, 99.7 %, 99.8 % o 99.9 % de identidad de secuencia con la sec. con núm. de ident.: 3.

En otra modalidad, se proporcionan fragmentos del polipéptido de la sec. con núm. de ident.: 3 o fragmentos de la sec. con núm. de ident.: 3 que tienen al menos aproximadamente 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 los fragmentos correspondientes de la sec. con núm. de ident.: 3.

Los fragmentos de la sec. con núm. de ident.:3 son, por ejemplo, de al menos 15 aminoácidos de longitud, que comprenden 15 aminoácidos contiguos de la sec. con núm. de ident.:3. Por

otra parte, los fragmentos pueden ser de 20, 25, 30, 35, 40 o más aminoácidos de longitud, hasta toda la longitud de aminoácidos de 517, y comprenden el número correspondiente de aminoácidos contiguos de la sec. con núm. de ident.:3.

Los fragmentos preferidos incluyen fragmentos que abarcan los aminoácidos 1-15, 330-345,
5 420-450 y 480-510 de la sec. con núm. de ident.:3.

El polipéptido puede incluir secuencias que comprenden un grado de identidad o similitud suficiente o sustancial con la sec. con núm. de ident.: 3 para funcionar como nicotina N-desmetilasa. Los fragmentos del (de los) polipéptido(s) típicamente retienen alguna o toda la actividad de la secuencia en toda su extensión.

- 10 Como se analiza en la presente descripción, los polipéptidos incluyen, además, mutantes producidos 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 replegamiento o isomerizaciones, estructuras tridimensionales, o estados de autoasociación), que pueden diseñarse intencionalmente o aislarse de su origen natural
- 15 siempre y cuando tengan aún alguna o toda su función o actividad como una nicotina N-desmetilasa. De manera adecuada, la función o actividad como una nicotina N-desmetilasa se modula, se reduce o se inhibe. De manera adecuada, la función o actividad como una nicotina N-desmetilasa se inhibe de manera que la actividad de nicotina N-desmetilasa no es detectable. Se describe además un polipéptido codificado por la sec. con núm. de ident.: 3 que tiene 100
- 20 % de identidad de secuencia con ella o se describe, además, un polipéptido que comprende, que consiste o que consiste esencialmente en la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 3 que tiene 100 % de identidad de secuencia con ella.

Los polipéptidos incluyen variantes producidas al introducir cualquier tipo de alteraciones (por ejemplo, inserciones, deleciones, o sustituciones de aminoácidos; cambios en estados de

25 glicosilación; cambios que afectan el replegamiento o isomerizaciones, estructuras tridimensionales, o estados de autoasociación), las que pueden diseñarse deliberadamente o

aislarse de manera natural. La variante puede tener alteraciones que producen un cambio silente y resultan en una proteína funcionalmente equivalente. Las sustituciones de aminoácidos deliberadas pueden producirse sobre la base de la similitud en polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad y la naturaleza anfipática de los residuos mientras 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 preferentemente en la misma línea en la tercera columna pueden sustituirse entre sí:

ALIFÁTICO	No polar	Gli Ala Pro Ile Leu Val
	Polar - no cargado	Cis Ser Tre Met Asn Gli
	Polar - cargado	Asp Glu Lis Arg
AROMÁTICO		His Fen Trp Tir

El polipéptido puede ser una proteína madura o una proteína inmadura o una proteína derivada de una proteína inmadura. Los polipéptidos pueden estar en forma lineal o cíclica con el uso de métodos conocidos. Típicamente los polipéptidos comprenden al menos 10, al menos 20, al menos 30, o al menos 40 aminoácidos contiguos.

Se describe una planta o célula vegetal de tabaco que comprende una mutación en un gen que codifica la *NND3* como se describe en la presente descripción, en donde dicha mutación da

como resultado la expresión reducida o la función reducida de dicha NND3. La expresión o la función del (de los) mutante(s) de NND3 puede inhibirse. La expresión o la función del (de los) mutante(s) de NND3 puede no ser detectable. Aparte de la una o más mutaciones en NND3, las plantas o células vegetales mutantes pueden tener una o más mutaciones adicionales en uno o más de otros genes o polipéptidos. En ciertas modalidades, aparte de la una o más mutaciones en NND3, los mutantes pueden tener una o más mutaciones adicionales en uno o más de otros genes o polipéptidos – tales como uno o más de otros genes o polipéptidos de nicotina desmetilasas. De manera adecuada, la NND3 se expresa en las flores (por ejemplo, flor inmadura, flor madura, cápsula inmadura, cápsula seca) y las raíces de la planta mutante.

De manera adecuada, la NND3 se expresa exclusivamente o específicamente en las flores (por ejemplo, flor inmadura, flor madura, cápsula inmadura, cápsula seca) y las raíces de la planta mutante.

De manera adecuada, la planta o célula vegetal de tabaco mutante para la NND3 comprende además una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa *CYP82E4*, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa *CYP82E4*. De manera adecuada, dicha nicotina desmetilasa *CYP82E4* se selecciona de la secuencia que se expone en las secs. con núms. de ident.: 6 a 16 o una combinación de dos o más de estas. De manera adecuada, dicha mutación da como resultado una modificación de dicha nicotina desmetilasa *CYP82E4* que se produce en una posición seleccionada del grupo que consiste en los residuos de aminoácidos 38, 171, 201, 169, 459, 427, 329, 364, 376, 382, y 458 de la sec. con núm. de ident.: 5 o una combinación de dos o más de estos. De manera adecuada, dicha mutación se selecciona del grupo que consiste en:

a) una sustitución de leucina por el residuo de prolina en la posición 38 de la sec. con núm. de ident.: 5; b) una sustitución de asparagina por el residuo de ácido aspártico en la posición 171 de la sec. con núm. de ident.: 5; c) una sustitución de lisina por el residuo de ácido glutámico en la posición 201 de la sec. con núm. de ident.: 5; d) una sustitución de glutamina por el

residuo de arginina en la posición 169 de la sec. con núm. de ident.: 5; e) una sustitución de arginina por el residuo de glicina en la posición 459 de la sec. con núm. de ident.: 5; f) una sustitución de isoleucina por el residuo de treonina en la posición 427 de la sec. con núm. de ident.: 5; g) una sustitución de metionina por el residuo de valina en la posición 376 de la sec. con núm. de ident.: 5; h) un codón de parada por el residuo de triptófano en la posición 329 de la sec. con núm. de ident.: 5; i) una sustitución de asparagina por el residuo de lisina en la posición 364 de la sec. con núm. de ident.: 5; j) una sustitución de serina por el residuo de prolina en la posición 382 de la sec. con núm. de ident.: 5; k) una sustitución de serina por el residuo de prolina en la posición 458 de la sec. con núm. de ident.: 5; o l) una combinación de dos o más de estas.

De manera adecuada, la planta o célula vegetal de tabaco mutante para la NND3 comprende además una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa *CYP82E5*, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa *CYP82E5*. De manera adecuada, dicha nicotina desmetilasa *CYP82E5* se selecciona de las secuencias que se exponen en las secs. con núms. de ident.: 18 a 25 o una combinación de dos o más de estas. De manera adecuada, dicha mutación da como resultado una modificación de dicha nicotina desmetilasa *CYP82E5* que se produce en una posición seleccionada del grupo que consiste en los residuos de aminoácidos 72, 143, 174, 224, 235, 410, 422 o 449 de la sec. con núm. de ident.: 17 o una combinación de dos o más de estos.

De manera adecuada, dicha mutación se selecciona del grupo que consiste en: a) una sustitución de leucina por el residuo de prolina en la posición 72 de la sec. con núm. de ident.: 17; b) una sustitución de fenilalanina por el residuo de leucina en la posición 143 de la sec. con núm. de ident.: 17; c) una sustitución de leucina por el residuo de serina en la posición 174 de la sec. con núm. de ident.: 17; d) una sustitución de isoleucina por el residuo de metionina en la posición 224 de la sec. con núm. de ident.: 17; e) una sustitución de serina por el residuo de prolina en la posición 235 de la sec. con núm. de ident.: 17; f) una sustitución de isoleucina por

el residuo de treonina en la posición 427 de la sec. con núm. de ident.: 17; g) una sustitución de metionina por el residuo de valina en la posición 376 de la sec. con núm. de ident.: 17; h) un codón de parada por el residuo de triptófano en la posición 329 de la sec. con núm. de ident.: 17; i) una sustitución de valina por el residuo de alanina en la posición 410 de la sec. con núm. de ident.: 17; j) un codón de parada por el residuo de triptófano en la posición 422 de la sec. con núm. de ident.: 17; k) una sustitución de leucina por el residuo de prolina en la posición 449 de la sec. con núm. de ident.: 17; o l) una combinación de dos o más de estas.

De manera adecuada, la planta o célula vegetal de tabaco mutante para la NND3 comprende además una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa *CYP82E10*, en donde

dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa *CYP82E10*. De manera adecuada, dicha nicotina desmetilasa *CYP82E4* se selecciona de la secuencia que se expone en las secs. con núms. de ident.: 27 a 35 o una combinación de dos o más de estas. De manera adecuada, dicha mutación da como resultado una modificación de dicha nicotina desmetilasa *CYP82E10* que se produce en una posición seleccionada del grupo que consiste en los residuos de aminoácidos 148, 172, 344, 410, 417, 419, 79, 107 o 382 de la sec. con núm. de ident.: 26 o una combinación de dos o más de estos. De manera adecuada, dicha mutación se selecciona del grupo que consiste en: a) una sustitución de fenilalanina por el residuo de leucina en la posición 148 de la sec. con núm. de ident.: 26; b) una sustitución de arginina por el residuo de glicina en la posición 172 de la sec. con núm. de ident.: 26; c) una sustitución de treonina por el residuo de alanina en la posición 344 de la sec. con núm. de ident.: 26; d) una sustitución de treonina por el residuo de alanina en la posición 410 de la sec. con núm. de ident.: 26; e) una sustitución de histidina por el residuo de arginina en la posición 417 de la sec. con núm. de ident.: 26; f) una sustitución de serina por el residuo de prolina en la posición 419 de la sec. con núm. de ident.: 26; g) una sustitución de serina por el residuo de glicina en la posición 79 de la sec. con núm. de ident.: 26; h) un codón de serina por el residuo de prolina en la posición 107 de la sec. con núm. de

ident.: 26; i) una sustitución de serina por el residuo de prolina en la posición 382 de la sec. con
núm. de ident.: 26; o j) una combinación de dos o más de estas.

De manera adecuada, la planta o célula vegetal de tabaco mutante para la NND3 comprende
además una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa *CYP82E4*, en donde

5 dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina
desmetilasa *CYP82E4*. De manera adecuada, dicha nicotina desmetilasa *CYP82E4* se
selecciona de la secuencia que se expone en las secs. con núms. de ident.: 13 a 16 o una
combinación de dos o más de estas. De manera adecuada, dicha mutación da como resultado

una modificación de dicha nicotina desmetilasa *CYP82E4* que se produce en una posición
10 seleccionada del grupo que consiste en los residuos de aminoácidos 329, 365, 382 o 458 de la
sec. con núm. de ident.: 5 o una combinación de dos o más de estos. De manera adecuada,

dicha mutación se selecciona del grupo que consiste en: a) una sustitución del codón de parada
por el residuo de triptófano en la posición 329; b) una sustitución de asparagina por el residuo
de lisina en la posición 364; c) una sustitución de metionina por el residuo de valina en la

15 posición 376; d) una sustitución de serina por el residuo de prolina en la posición 382; e) una
sustitución de serina por el residuo de prolina en la posición 458; y f) cualquier combinación de
estas. De manera adecuada, la planta o célula vegetal de tabaco comprende además una

mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa *CYP82E4*, en donde dicha mutación
da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa

20 *CYP82E4*. De manera adecuada, dicha nicotina desmetilasa *CYP82E4* comprende la
secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 13 (W329Stop). De manera
adecuada, dicha mutación da como resultado una modificación de dicha nicotina desmetilasa
CYP82E4 que se produce en el residuo de aminoácido 329 de la sec. con núm. de ident.: 5.

De manera adecuada, dicha mutación es una sustitución del codón de parada por el residuo de
25 triptófano en la posición 329.

De manera adecuada, la planta o célula vegetal de tabaco mutante para NND3 comprende además una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E5, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E5. De manera adecuada, dicha nicotina desmetilasa CYP82E5 comprende

5 la secuencia que se expone en las secs. con núms. de ident.: 24 o 25 o una combinación de dos o más de estas. De manera adecuada, dicha mutación da como resultado una modificación de dicha nicotina desmetilasa CYP82E5 que se produce en una posición seleccionada del grupo que consiste en los residuos de aminoácidos 422 y 449, en donde dicha numeración está de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 12. De manera adecuada, dicha mutación se
10 selecciona del grupo que consiste en: a) un codón de parada sustituido por el residuo de triptófano en la posición 422; b) una leucina sustituida por el residuo de prolina en la posición 449; y c) cualquier combinación de estas.

De manera adecuada, la planta o célula vegetal de tabaco mutante para NND3 comprende además una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E5, en donde
15 dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E5. De manera adecuada, dicha nicotina desmetilasa CYP82E5 comprende la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 24 (W422Stop). De manera adecuada, dicha mutación da como resultado una modificación de dicha nicotina desmetilasa CYP82E5 que se produce en el residuo de aminoácido 422, en donde dicha numeración está
20 de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 17. De manera adecuada, dicha mutación es un codón de parada sustituido por el residuo de triptófano en la posición 422.

De manera adecuada, la planta o célula vegetal de tabaco mutante para la NND3 comprende además una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E10, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E10. De manera adecuada, dicha nicotina desmetilasa CYP82E10 se
25 selecciona del grupo que consiste en las secs. con núms. de ident.: 32-35 o una combinación

de dos o más de estas. De manera adecuada, dicha mutación da como resultado una modificación de dicha nicotina desmetilasa CYP82E10 que se produce en una posición seleccionada del grupo que consiste en los residuos de aminoácidos 79, 107, 382, 419 y cualquier combinación de estos, en donde dicha numeración está de acuerdo con la sec. con
5 núm. de ident.:26. De manera adecuada, dicha mutación se selecciona del grupo que consiste en: a) una sustitución de serina por el residuo de glicina en la posición 79; b) una sustitución de serina por el residuo de prolina en la posición 107; c) una sustitución de serina por el residuo de prolina en la posición 382; d) una sustitución de serina por el residuo de prolina en la posición 419; y e) cualquier combinación de estas.

- 10 De manera adecuada, la planta o célula vegetal de tabaco mutante para la NND3 comprende además una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E10, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E10. De manera adecuada, dicha nicotina desmetilasa CYP82E10 se selecciona del grupo que consiste en las secs. con núms. de ident.: 32-34 o una combinación
15 de dos o más de estas. De manera adecuada, dicha mutación da como resultado una modificación de dicha nicotina desmetilasa CYP82E10 que se produce en una posición seleccionada del grupo que consiste en los residuos de aminoácidos 79, 107, 382 y cualquier combinación de estos, en donde dicha numeración está de acuerdo con la sec. con núm. de ident.:26. De manera adecuada, dicha mutación se selecciona del grupo que consiste en: a)
20 una sustitución de serina por el residuo de glicina en la posición 79; b) una sustitución de serina por el residuo de prolina en la posición 107; c) una sustitución de serina por el residuo de prolina en la posición 382; y d) cualquier combinación de estas.

De manera adecuada la planta o célula vegetal de tabaco mutante para NND3 comprende además una o más mutaciones como se describió anteriormente en un gen de nicotina desmetilasa CYP82E4 y en un gen de nicotina desmetilasa CYP82E5. De manera adecuada
25 dicha planta o célula vegetal de tabaco comprende además una o más mutaciones como se

describió anteriormente en un gen de nicotina desmetilasa CYP82E4 y un gen de nicotina desmetilasa CYP82E10. De manera adecuada dicha planta o célula vegetal de tabaco comprende además una o más mutaciones como se describió anteriormente en un gen de nicotina desmetilasa CYP82E5 y un gen de nicotina desmetilasa CYP82E10. De manera

5 adecuada dicha planta o célula vegetal de tabaco comprende además una o más mutaciones como se describió anteriormente en un gen de nicotina desmetilasa CYP82E4 y un gen de nicotina desmetilasa CYP82E5 y un gen de nicotina desmetilasa CYP82E10.

De manera adecuada, dicha nicotina desmetilasa CYP82E4 comprende la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 13 (W329Stop), dicha nicotina desmetilasa CYP82E5

10 comprende la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 24 (W422Stop), y dicha nicotina desmetilasa CYP82E10 comprende la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 33 (G79S).

De manera adecuada, dicha nicotina desmetilasa CYP82E4 comprende la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 13 (W329Stop), dicha nicotina desmetilasa CYP82E5

15 comprende la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 24 (W422Stop), y dicha nicotina desmetilasa CYP82E10 comprende la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 34 (P107S).

De manera adecuada, dicha nicotina desmetilasa CYP82E4 comprende la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 13 (W329Stop), dicha nicotina desmetilasa CYP82E5

20 comprende la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 24 (W422Stop), y dicha nicotina desmetilasa CYP82E10 comprende la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 35 (P382S).

De manera adecuada, dicha nicotina desmetilasa CYP82E4 comprende la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 13 (W329Stop), dicha nicotina desmetilasa CYP82E5

25 comprende la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 24 (W422Stop), y dicha

nicotina desmetilasa CYP82E10 comprende la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 32 (P419S).

De manera adecuada, la planta o célula vegetal de tabaco mutante para la NND3 comprende además una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E4, en donde
5 dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E4 y se produce en el residuo de aminoácido 329 de la sec. con núm. de ident.:25, y comprende una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E5, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E5 y se produce en el residuo de aminoácido 422 de la
10 sec. con núm. de ident.:17, y comprende una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E10, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E10 y se produce en el residuo de aminoácido 419 de la sec. con núm. de ident.:26.

De manera adecuada, la planta o célula vegetal de tabaco mutante para la NND3 comprende
15 además una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E4, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E4 y se produce en el residuo de aminoácido 329 de la sec. con núm. de ident.:25, y comprende una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E5, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función
20 de dicha nicotina desmetilasa CYP82E5 y se produce en el residuo de aminoácido 422 de la sec. con núm. de ident.:17, y comprende una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E10, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E10 y se produce en el residuo de aminoácido 79 de la sec. con núm. de ident.:26.

25 De manera adecuada, la planta o célula vegetal de tabaco mutante para la NND3 comprende además una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E4, en donde

dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E4 y se produce en el residuo de aminoácido 329 de la sec. con núm. de ident.:25, y comprende una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E5, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E5 y se produce en el residuo de aminoácido 422 de la sec. con núm. de ident.:17, y comprende una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E10, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E10 y se produce en el residuo de aminoácido 107 de la sec. con núm. de ident.:26.

- 10 De manera adecuada, la planta o célula vegetal de tabaco mutante para la NND3 comprende además una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E4, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E4 y se produce en el residuo de aminoácido 329 de la sec. con núm. de ident.:25, y comprende una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E5, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E5 y se produce en el residuo de aminoácido 422 de la sec. con núm. de ident.:17, y comprende una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E10, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E10 y se produce en el residuo de aminoácido 382 de la sec. con núm. de ident.:26.

De manera adecuada, la planta o célula vegetal de tabaco mutante para la NND3 comprende además una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E4, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E4 y es una sustitución del codón de parada por el residuo de triptófano en la posición 329 de la sec. con núm. de ident.:5, y comprende una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E5, en donde dicha mutación da como resultado una

reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E5 y es un codón de parada sustituido por el residuo de triptófano en la posición 422 de la sec. con núm. de ident.: 17, y comprende una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E10, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E10 y es una sustitución de serina por el residuo de glicina en la posición 79 de la sec. con núm. de ident.:26.

De manera adecuada, la planta o célula vegetal de tabaco mutante para la NND3 comprende además una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E4, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E4 y es una sustitución del codón de parada por el residuo de triptófano en la posición 329 de la sec. con núm. de ident.:5, y comprende una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E5, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E5 y es un codón de parada sustituido por el residuo de triptófano en la posición 422 de la sec. con núm. de ident.: 17, y comprende una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E10, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E10 y es una sustitución de serina por el residuo de prolina en la posición 107 de la sec. con núm. de ident.:26.

De manera adecuada, la planta o célula vegetal de tabaco mutante para la NND3 comprende además una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E4, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E4 y es una sustitución del codón de parada por el residuo de triptófano en la posición 329 de la sec. con núm. de ident.:5, y comprende una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E5, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E5 y es un codón de parada sustituido por el residuo de triptófano en la posición 422 de la sec. con núm. de ident.:

17, y comprende una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E10, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E10 y es una sustitución de serina por el residuo de prolina en la posición 382 de la sec. con núm. de ident.:26.

- 5 De manera adecuada, la planta o célula vegetal de tabaco mutante para la NND3 comprende además una mutación homocigota en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E4, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E4 y se produce en el residuo de aminoácido 329 de la sec. con núm. de ident.:25, y comprende una mutación homocigota en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E5, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E5 y se produce en el residuo de aminoácido 422 de la sec. con núm. de ident.:17, y comprende una mutación homocigota en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E10, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E10 y se produce en el residuo de aminoácido 419 de la sec. con núm. de ident.:26.

- De manera adecuada, la planta o célula vegetal de tabaco mutante para la NND3 comprende además una mutación homocigota en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E4, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E4 y es una sustitución del codón de parada por el residuo de triptófano en la posición 329 de la sec. con núm. de ident.:5, y comprende una mutación homocigota en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E5, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E5 y es un codón de parada sustituido por el residuo de triptófano en la posición 422 de la sec. con núm. de ident.: 17, y comprende una mutación homocigota en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E10, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E10 y

es una sustitución de serina por el residuo de prolina en la posición 382 de la sec. con núm. de ident.:26.

De manera adecuada, la planta o célula vegetal de tabaco mutante para la NND3 comprende además una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa *CYP82E4*, en donde

5 dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa *CYP82E4*. De manera adecuada, dicha nicotina desmetilasa *CYP82E4* se selecciona de la secuencia que se expone en las secs. con núms. de ident.: 12 a 16 o una combinación de dos o más de estas. De manera adecuada, dicha mutación da como resultado una modificación de dicha nicotina desmetilasa *CYP82E4* que se produce en una posición

10 seleccionada del grupo que consiste en los residuos de aminoácidos 329, 364, 376, 382, y 458 de la sec. con núm. de ident.: 5. De manera adecuada, dicha mutación se selecciona del grupo que consiste en: a) una sustitución del codón de parada por el residuo de triptófano en la posición 329; b) una sustitución de asparagina por el residuo de lisina en la posición 364; c) una sustitución de metionina por el residuo de valina en la posición 376; d) una sustitución de serina
15 por el residuo de prolina en la posición 382; e) una sustitución de serina por el residuo de prolina en la posición 458; y f) cualquier combinación de estas. De manera adecuada, la planta o célula vegetal de tabaco mutante para la NND3 comprende además una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa *CYP82E4*, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa *CYP82E4*. De manera

20 adecuada, dicha nicotina desmetilasa *CYP82E4* comprende la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 13 (W329Stop). De manera adecuada, dicha mutación da como resultado una modificación de dicha nicotina desmetilasa *CYP82E4* que se produce en el residuo de aminoácido 329 de la sec. con núm. de ident.: 5. De manera adecuada, dicha mutación es una sustitución del codón de parada por el residuo de triptófano en la posición 329.

25 De manera adecuada, la planta o célula vegetal de tabaco mutante para NND3 comprende además una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa *CYP82E5*, en donde

dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E5. De manera adecuada, dicha nicotina desmetilasa CYP82E5 comprende la secuencia que se expone en las secs. con núms. de ident.: 24 o 25 o una combinación de dos o más de estas. De manera adecuada, dicha mutación da como resultado una modificación de dicha nicotina desmetilasa CYP82E5 que se produce en una posición seleccionada del grupo que consiste en los residuos de aminoácidos 422 y 449, en donde dicha numeración está de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 12. De manera adecuada, dicha mutación se selecciona del grupo que consiste en: a) un codón de parada sustituido por el residuo de triptófano en la posición 422; b) una leucina sustituida por el residuo de prolina en la posición 449; y c) cualquier combinación de estas.

De manera adecuada, la planta o célula vegetal de tabaco mutante para NND3 comprende además una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E5, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E5. De manera adecuada, dicha nicotina desmetilasa CYP82E5 comprende la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 24 (W422Stop). De manera adecuada, dicha mutación da como resultado una modificación de dicha nicotina desmetilasa CYP82E5 que se produce en el residuo de aminoácido 422, en donde dicha numeración está de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 17. De manera adecuada, dicha mutación es un codón de parada sustituido por el residuo de triptófano en la posición 422.

De manera adecuada, la planta o célula vegetal de tabaco mutante para NND3 comprende una mutación adicional en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E10, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E10. De manera adecuada, dicha nicotina desmetilasa CYP82E10 se selecciona del grupo que consiste en las secs. con núms. de ident.: 32-35 o una combinación de dos o más de estas. De manera adecuada, dicha mutación da como resultado una modificación de dicha nicotina desmetilasa CYP82E10 que se produce en una posición

seleccionada del grupo que consiste en los residuos de aminoácidos 79, 107, 382, 419 y cualquier combinación de estos, en donde dicha numeración está de acuerdo con la sec. con núm. de ident.:26. De manera adecuada, dicha mutación se selecciona del grupo que consiste en: a) una sustitución de serina por el residuo de glicina en la posición 79; b) una sustitución de serina por el residuo de prolina en la posición 107; c) una sustitución de serina por el residuo de prolina en la posición 382; d) una sustitución de serina por el residuo de prolina en la posición 419; y e) cualquier combinación de estas.

De manera adecuada, la planta o célula vegetal de tabaco mutante para NND3 comprende una mutación adicional en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E10, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E10. De manera adecuada, dicha nicotina desmetilasa CYP82E10 se selecciona del grupo que consiste en las secs. con núms. de ident.: 32-34 o una combinación de dos o más de estas. De manera adecuada, dicha mutación da como resultado una modificación de dicha nicotina desmetilasa CYP82E10 que se produce en una posición seleccionada del grupo que consiste en los residuos de aminoácidos 79, 107, 382 y cualquier combinación de estos, en donde dicha numeración está de acuerdo con la sec. con núm. de ident.:26. De manera adecuada, dicha mutación se selecciona del grupo que consiste en: a) una sustitución de serina por el residuo de glicina en la posición 79; b) una sustitución de serina por el residuo de prolina en la posición 107; c) una sustitución de serina por el residuo de prolina en la posición 382; y d) cualquier combinación de estas.

De manera adecuada, la planta o célula vegetal de tabaco mutante para NND3 comprende además una o más mutaciones como se describió anteriormente en un gen de nicotina desmetilasa CYP82E4 y un gen de nicotina desmetilasa CYP82E5. De manera adecuada dicha planta o célula vegetal de tabaco comprende además una o más mutaciones como se describió anteriormente en un gen de nicotina desmetilasa CYP82E4 y un gen de nicotina desmetilasa CYP82E10. De manera adecuada dicha planta o célula vegetal de tabaco comprende además

una o más mutaciones como se describió anteriormente en un gen de nicotina desmetilasa CYP82E5 y un gen de nicotina desmetilasa CYP82E10. De manera adecuada dicha planta o célula vegetal de tabaco comprende además una o más mutaciones como se describió anteriormente en un gen de nicotina desmetilasa CYP82E4 y un gen de nicotina desmetilasa CYP82E5 y un gen de nicotina desmetilasa CYP82E10.

De manera adecuada, dicha nicotina desmetilasa CYP82E4 comprende la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 13 (W329Stop), dicha nicotina desmetilasa CYP82E5 comprende la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 24 (W422Stop), y dicha nicotina desmetilasa CYP82E10 comprende la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 33 (G79S).

De manera adecuada, dicha nicotina desmetilasa CYP82E4 comprende la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 13 (W329Stop), dicha nicotina desmetilasa CYP82E5 comprende la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 24 (W422Stop), y dicha nicotina desmetilasa CYP82E10 comprende la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 34 (P107S).

De manera adecuada, dicha nicotina desmetilasa CYP82E4 comprende la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 13 (W329Stop), dicha nicotina desmetilasa CYP82E5 comprende la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 24 (W422Stop), y dicha nicotina desmetilasa CYP82E10 comprende la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 35 (P382S).

De manera adecuada, dicha nicotina desmetilasa CYP82E4 comprende la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 13 (W329Stop), dicha nicotina desmetilasa CYP82E5 comprende la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 24 (W422Stop), y dicha nicotina desmetilasa CYP82E10 comprende la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 32 (P419S).

De manera adecuada, la planta o célula vegetal de tabaco mutante para la NND3 comprende además una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E4, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E4 y se produce en el residuo de aminoácido 329 de la sec. con núm. de
5 ident.:25, y comprende una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E5, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E5 y se produce en el residuo de aminoácido 422 de la sec. con núm. de ident.:17, y comprende una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E10, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la
10 expresión o función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E10 y se produce en el residuo de aminoácido 419 de la sec. con núm. de ident.:26.

De manera adecuada, la planta o célula vegetal de tabaco mutante para la NND3 comprende además una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E4, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina
15 desmetilasa CYP82E4 y se produce en el residuo de aminoácido 329 de la sec. con núm. de ident.:25, y comprende una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E5, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E5 y se produce en el residuo de aminoácido 422 de la sec. con núm. de ident.:17, y comprende una mutación en un gen que codifica una nicotina
20 desmetilasa CYP82E10, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E10 y se produce en el residuo de aminoácido 79 de la sec. con núm. de ident.:26.

De manera adecuada, la planta o célula vegetal de tabaco mutante para la NND3 comprende además una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E4, en donde
25 dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E4 y se produce en el residuo de aminoácido 329 de la sec. con núm. de

ident.:25, y comprende una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E5, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E5 y se produce en el residuo de aminoácido 422 de la sec. con núm. de ident.:17, y comprende una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E10, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E10 y se produce en el residuo de aminoácido 107 de la sec. con núm. de ident.:26.

De manera adecuada, la planta o célula vegetal de tabaco mutante para la NND3 comprende además una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E4, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E4 y se produce en el residuo de aminoácido 329 de la sec. con núm. de ident.:25, y comprende una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E5, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E5 y se produce en el residuo de aminoácido 422 de la sec. con núm. de ident.:17, y comprende una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E10, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E10 y se produce en el residuo de aminoácido 382 de la sec. con núm. de ident.:26.

De manera adecuada, la planta o célula vegetal de tabaco mutante para la NND3 comprende además una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E4, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E4 y es una sustitución del codón de parada por el residuo de triptófano en la posición 329 de la sec. con núm. de ident.:5, y comprende una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E5, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E5 y es un codón de parada sustituido por el residuo de triptófano en la posición 422 de la sec. con núm. de ident.:

17, y comprende una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E10, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E10 y es una sustitución de serina por el residuo de glicina en la posición 79 de la sec. con núm. de ident.:26.

- 5 De manera adecuada, la planta o célula vegetal de tabaco mutante para la NND3 comprende además una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E4, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E4 y es una sustitución del codón de parada por el residuo de triptófano en la posición 329 de la sec. con núm. de ident.:5, y comprende una mutación en un gen que
- 10 codifica una nicotina desmetilasa CYP82E5, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E5 y es un codón de parada sustituido por el residuo de triptófano en la posición 422 de la sec. con núm. de ident.:17, y comprende una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E10, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha
- 15 nicotina desmetilasa CYP82E10 y es una sustitución de serina por el residuo de prolina en la posición 107 de la sec. con núm. de ident.:26.

- De manera adecuada, la planta o célula vegetal de tabaco mutante para la NND3 comprende además una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E4, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina
- 20 desmetilasa CYP82E4 y es una sustitución del codón de parada por el residuo de triptófano en la posición 329 de la sec. con núm. de ident.:5, y comprende una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E5, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E5 y es un codón de parada sustituido por el residuo de triptófano en la posición 422 de la sec. con núm. de ident.:17, y comprende una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E10, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha
- 25

nicotina desmetilasa CYP82E10 y es una sustitución de serina por el residuo de prolina en la posición 382 de la sec. con núm. de ident.:26.

De manera adecuada, la planta o célula vegetal de tabaco mutante para la NND3 comprende además una mutación homocigota en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E4,

5 en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E4 y se produce en el residuo de aminoácido 329 de la sec. con núm. de ident.:25, y comprende una mutación homocigota en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E5, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la

expresión o función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E5 y se produce en el residuo de aminoácido 422 de la sec. con núm. de ident.:17, y comprende una mutación homocigota en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E10, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E10 y se produce en el residuo de aminoácido 419 de la sec. con núm. de ident.:26.

De manera adecuada, la planta o célula vegetal de tabaco mutante para la NND3 comprende

15 además una mutación homocigota en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E4, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E4 y es una sustitución del codón de parada por el residuo de triptófano en la posición 329 de la sec. con núm. de ident.:5, y comprende una mutación

homocigota en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E5, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E5 y es un codón de parada sustituido por el residuo de triptófano en la posición 422 de la sec. con núm. de ident.: 17, y comprende una mutación homocigota en un

20 gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E10, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E10 y es una sustitución de serina por el residuo de prolina en la posición 382 de la sec. con núm. de ident.:26.

De manera adecuada, la planta, la célula vegetal, el material vegetal o el producto de tabaco (curado) y similares que se obtienen o pueden obtenerse de acuerdo con la presente descripción tienen menos de aproximadamente 1.0 %, menos de aproximadamente 0.9 %, menos de aproximadamente 0.8 %, menos de aproximadamente 0.7 %, menos de aproximadamente 0.6 %, menos de aproximadamente 0.5 %, menos de aproximadamente 0.4 %, menos de aproximadamente 0.3 %, menos de aproximadamente 0.2 % o menos de aproximadamente 0.1 % de conversión de nicotina a nornicotina. El % de conversión se calcula con el uso de la ecuación $[\% \text{ de nornicotina} / (\% \text{ de nornicotina} + \% \text{ de nicotina})] \times 100$.

De manera adecuada, la planta, la célula vegetal, el material vegetal o el producto de tabaco (curado) y similares que se obtienen o pueden obtenerse de acuerdo con la presente descripción tienen menos de aproximadamente 0.04 %, menos de aproximadamente 0.03 %, menos de aproximadamente 0.02 % o menos de aproximadamente 0.01 % de nornicotina, calculado sobre una base de peso seco.

Dicha planta o célula vegetal de tabaco mutante para la NND3 puede ser heterocigota u homocigota para la(s) mutación(es). Dicha planta o célula vegetal de tabaco mutante para la NND3 puede ser heterocigota para al menos una mutación y homocigota para al menos una mutación diferente.

Se proporciona además un método para reducir el nivel de nornicotina, o reducir la velocidad de conversión de nicotina a nornicotina o reducir el nivel de al menos NNN en una planta de tabaco (curada) o en un material vegetal de tabaco (curado); dicho método comprende introducir en el genoma de dicha planta una o más mutaciones que reducen la expresión de al menos un gen de nicotina desmetilasa, en donde dicho al menos un gen de nicotina desmetilasa codifica NND3. De manera adecuada, además de la o las mutaciones en NND3, pueden introducirse, además, una o más mutaciones en al menos un alelo de al menos uno, dos o tres o más genes adicionales de nicotina desmetilasas, en donde dichos genes se seleccionan del grupo que

consiste en CYP82E4, CYP82E5 y CYP82E10 o una combinación de dos o más de estos como se analizó anteriormente.

- Se proporciona además un método para identificar una planta de tabaco con niveles bajos de nornicotina o niveles bajos de al menos NNN, dicho método comprende analizar una muestra
- 5 de ácido nucleico de una planta de tabaco de interés para determinar la presencia de una o más mutaciones en la sec. con núm. de ident.:1 o 2, y opcionalmente correlacionar la o las mutaciones identificadas con la o las mutaciones que se conocen por modular los niveles de nornicotina o al menos NNN. De manera adecuada, dicho método comprende además analizar dicha muestra de ácido nucleico, u otra muestra de ácido nucleico de dicha planta de tabaco de
- 10 interés, para determinar la presencia de una mutación en la sec. con núm. de ident.: 5, la presencia de una mutación en la sec. con núm. de ident.:12, o la presencia de una mutación en la sec. con núm. de ident.: 19, y opcionalmente correlacionar la o las mutaciones identificadas con la o las mutaciones que se conocen por modular los niveles de nornicotina o al menos NNN.
- 15 Se describe además una planta o célula vegetal de tabaco que es heterocigota u homocigota para mutaciones en un gen que codifica NND3, un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E10, un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E4, y un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E5, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de las nicotina desmetilasas NND3, CYP82E10, CYP82E4, y CYP82E5.
- 20 Se describe además una planta de tabaco o célula vegetal que comprende, que consiste o que consiste esencialmente en una o más mutaciones heterocigotas u homocigotas en un gen o polipéptido de NND3, como se describe en la presente descripción, que reduce la actividad de nicotina desmetilasa en las flores (por ejemplo, flor inmadura, flor madura, cápsula inmadura, cápsula seca) y las raíces, una o más mutaciones heterocigotas u homocigotas en un gen o
- 25 polipéptido de CYP82E10 que reduce la actividad de nicotina desmetilasa en las raíces, una o más mutaciones heterocigotas u homocigotas en un gen o polipéptido de CYP82E4 que reduce

la actividad de nicotina desmetilasa en las hojas senescentes, y una o más mutaciones en un gen o polipéptido de CYP83E5 que reduce la actividad de nicotina desmetilasa en las hojas verdes.

Puede usarse una serie de enfoques para combinar las mutaciones en una planta, que incluye

5 el cruzamiento sexual. Una planta que tiene una o más mutaciones heterocigotas u homocigotas favorables en NND3 que reducen la nicotina desmetilasa puede cruzarse con una planta que tiene una o más mutaciones heterocigotas u homocigotas favorables en uno o más de CYP82E4, CYP82E5 y CYP82E10 que reducen la actividad de nicotina desmetilasa. En una modalidad, los cruces se realizan para introducir una o más mutaciones heterocigotas u
10 homocigotas favorables dentro de la NND3 y CYP82E10 o NND3 y CYP82E4 o NND3 y CYP82E5 dentro de la misma planta. De esta manera, una planta que tiene una o más mutaciones heterocigotas u homocigotas favorables en NND3 que reducen la actividad de nicotina desmetilasa en las flores (por ejemplo, flor inmadura, flor madura, cápsula inmadura, cápsula seca) y las raíces, se cruza con una planta que tiene una o más mutaciones
15 heterocigotas u homocigotas favorables en CYP82E10 que reducen la actividad de nicotina desmetilasa en las raíces, o se cruza con una planta que tiene una o más mutaciones heterocigotas u homocigotas favorables en CYP82E4 que reducen la actividad de nicotina desmetilasa en las hojas senescentes, o se cruza con una planta que tiene una o más mutaciones heterocigotas u homocigotas favorables en el gen de *CYP83E5* que reducen la
20 actividad de nicotina desmetilasa en las hojas verdes. En otra modalidad, los cruces se realizan para introducir una o más mutaciones heterocigotas u homocigotas favorables dentro de NND3, CYP82E10 y CYP82E4 dentro de la misma planta. De esta manera, una planta que tiene una o más mutaciones heterocigotas u homocigotas favorables en NND3 que reducen la actividad de nicotina desmetilasa en las flores (por ejemplo, flor inmadura, flor madura, cápsula inmadura, cápsula seca) y las raíces, se cruza con una planta que tiene una o más mutaciones
25 heterocigotas u homocigotas favorables en CYP82E10 que reducen la actividad de nicotina

desmetilasa en las raíces, y se cruza con una planta que tiene una o más mutaciones heterocigotas u homocigotas favorables en CYP82E4 que reducen la actividad de nicotina desmetilasa en las hojas senescentes. En otra modalidad, los cruces se realizan para introducir una o más mutaciones heterocigotas u homocigotas favorables dentro de la NND3, CYP82E10 y CYP82E5 dentro de la misma planta. De esta manera, una planta que tiene una o más mutaciones heterocigotas u homocigotas favorables en *NND3* que reducen la actividad de nicotina desmetilasa en las flores (por ejemplo, flor inmadura, flor madura, cápsula inmadura, cápsula seca) y las raíces, se cruza con una planta que tiene una o más mutaciones heterocigotas u homocigotas favorables en CYP82E10 que reducen la actividad de nicotina desmetilasa en las raíces, y se cruza con una planta que tiene una o más mutaciones heterocigotas u homocigotas favorables en CYP83E5 que reducen la actividad de nicotina desmetilasa en las hojas verdes. En otra modalidad, los cruces se realizan para introducir una o más mutaciones heterocigotas u homocigotas favorables dentro de la NND3, CYP82E4 y CYP82E5 dentro de la misma planta. De esta manera, una planta que tiene una o más mutaciones heterocigotas u homocigotas favorables en la NND3 que reducen la actividad de nicotina desmetilasa en las flores (por ejemplo, flor inmadura, flor madura, cápsula inmadura, cápsula seca) y las raíces, se cruza con una planta que tiene una o más mutaciones heterocigotas u homocigotas favorables en CYP82E4 que reducen la actividad de nicotina desmetilasa en las hojas senescentes, y se cruza con una planta que tiene una o más mutaciones heterocigotas u homocigotas favorables en CYP83E5 que reducen la actividad de nicotina desmetilasa en las hojas verdes. En otra modalidad, los cruces se realizan para introducir una o más mutaciones heterocigotas u homocigotas favorables dentro de la NND3, CYP82E4, CYP82E5 y CYP82E10 dentro de la misma planta. De esta manera, una planta que tiene una o más mutaciones heterocigotas u homocigotas favorables en la NND3 que reducen la actividad de nicotina desmetilasa en las flores (por ejemplo, flor inmadura, flor madura, cápsula inmadura, cápsula seca) y las raíces, se cruza con una planta que tiene una o más

mutaciones heterocigotas u homocigotas favorables en CYP82E10 que reducen la actividad de nicotina desmetilasa en las raíces, una o más mutaciones heterocigotas u homocigotas favorables en CYP82E4 que reducen la actividad de nicotina desmetilasa en las hojas senescentes, y una o más mutaciones heterocigotas u homocigotas favorables en CYP83E5 que reducen la actividad de nicotina desmetilasa en las hojas verdes. Al introducir una o más mutaciones favorables en el o los genes de nicotina desmetilasas – tales como las mutaciones favorables que se describen en la presente descripción - es posible producir una planta que tiene una conversión reducida o insignificante o no detectable de nicotina a nornicotina o un metabolito de esta, o una planta que tiene un contenido de NNN reducido o insignificante o no detectable.

La actividad de uno o más polipéptidos de nicotina desmetilasas en la conversión de nicotina a nornicotina o un metabolito de esta en una planta de tabaco se reduce o se inhibe de conformidad con la presente descripción si la actividad de conversión es estadísticamente menor que la actividad de conversión del (de los) mismo(s) polipéptido(s) de nicotina desmetilasa en una planta de tabaco que no se ha modificado para inhibir la actividad de conversión de ese polipéptido de nicotina desmetilasa y que se ha cultivado y cosechado con el uso de los mismos protocolos. La actividad del polipéptido de nicotina desmetilasa en la conversión de nicotina a nornicotina en una planta de tabaco se considera eliminada cuando no es detectable mediante los métodos de ensayo descritos en la presente descripción. Los métodos para determinar la actividad de un polipéptido de nicotina desmetilasa en la conversión de nicotina a nornicotina en una planta de tabaco se describen en la presente descripción.

En algunas modalidades, la o las mutaciones favorables se introducen en una planta o célula vegetal de tabaco con el uso de un método de mutagénesis, y la mutación introducida se identifica o se selecciona con el uso de métodos conocidos por los expertos en la técnica - tales como análisis de Southern, secuenciación de ADN, análisis por PCR, o análisis fenotípico. Las mutaciones que afectan la expresión génica o que interfieren con la función de la proteína

codificada pueden determinarse con el uso de métodos que son muy conocidos en la técnica. Las mutaciones por inserción en exones de genes resultan usualmente en mutantes nulos. Las mutaciones en residuos conservados pueden ser particularmente eficaces en la inhibición de la función metabólica de la proteína codificada.

5 Se describen, además, métodos para obtener polinucleótidos y polipéptidos mutantes. Cualquier planta de interés, que incluye una célula vegetal o material vegetal puede modificarse genéticamente por varios métodos conocidos por inducir mutagénesis, que incluyen mutagénesis dirigida a un sitio, mutagénesis dirigida a oligonucleótido, mutagénesis dirigida químicamente, mutagénesis dirigida por radiación, mutagénesis que utiliza bases modificadas, 10 mutagénesis que utiliza ADN híbrido con brechas, mutagénesis por ruptura de la doble cadena, mutagénesis que utiliza cepas huéspedes deficientes en la reparación, mutagénesis por síntesis génica total, barajado de ADN y otros métodos equivalentes.

Se describen además fragmentos de polinucleótidos y polipéptidos de NND3 codificados de esta manera. Los fragmentos de un polinucleótido pueden codificar fragmentos proteicos que 15 retienen la actividad biológica de la proteína natural y por lo tanto están involucrados en la conversión metabólica de nicotina a nor nicotina. Alternativamente, los fragmentos de un polinucleótido que son útiles como sondas de hibridación o cebadores de PCR generalmente no codifican fragmentos de proteína que retienen la actividad biológica. Además, los fragmentos de la secuencia de nucleótidos descrita incluyen aquellos que pueden ensamblarse dentro de 20 constructos recombinantes como se discute en la presente descripción. Los fragmentos de una secuencia de polinucleótido pueden estar en el intervalo de al menos aproximadamente 25 nucleótidos, aproximadamente 50 nucleótidos, aproximadamente 75 nucleótidos, aproximadamente 100 nucleótidos, aproximadamente 150 nucleótidos, aproximadamente 200 nucleótidos, aproximadamente 250 nucleótidos, aproximadamente 300 nucleótidos, 25 aproximadamente 400 nucleótidos, aproximadamente 500 nucleótidos, aproximadamente 600 nucleótidos, aproximadamente 700 nucleótidos, aproximadamente 800 nucleótidos,

aproximadamente 900 nucleótidos, aproximadamente 1,000 nucleótidos, aproximadamente 1,100 nucleótidos, aproximadamente 1,200 nucleótidos, aproximadamente 1,300 nucleótidos o aproximadamente 1,400 nucleótidos y hasta el polinucleótido en toda su extensión que codifica los polipéptidos descritos en la presente descripción. Los fragmentos de una secuencia de polipéptido 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, y hasta el polipéptido en toda su extensión descrito en la presente descripción.

Las variantes de polipéptidos mutantes pueden usarse para crear plantas mutantes, de origen no natural o transgénicas (por ejemplo, plantas mutantes, de origen no natural, transgénicas, creadas por el hombre o diseñadas por ingeniería genética) o células vegetales que comprenden una o más variantes de polipéptidos mutantes. De manera adecuada, las variantes de polipéptidos mutantes retienen la actividad del polipéptido no mutado. La actividad de la variante de polipéptido mutante puede ser mayor, menor o aproximadamente la misma que la del polipéptido no mutado.

Las mutaciones en las secuencias de nucleótidos y los polipéptidos descritos en la presente descripción pueden incluir mutaciones creadas por el hombre o mutaciones sintéticas o mutaciones diseñadas por ingeniería genética. Las mutaciones en las secuencias de nucleótidos y los polipéptidos descritos 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 los polipéptidos descritos en la presente descripción pueden ser mutaciones que se obtienen o pueden obtenerse mediante un proceso que incluye la intervención del hombre. A manera de ejemplo, el proceso puede incluir mutagénesis con el uso de sustancias químicas adicionadas de manera exógena - tales

como compuestos orgánicos mutagénicos, teratogénicos, o carcinogénicos, por ejemplo metanosulfonato de etilo (EMS), que producen mutaciones aleatorias en el material genético. A manera 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 manera de un ejemplo adicional, el proceso puede incluir una o más etapas de cruzamiento de plantas.

Un polipéptido puede prepararse al cultivar células huéspedes transformadas o recombinantes bajo condiciones de cultivo adecuadas para expresar un polipéptido. El polipéptido expresado resultante puede purificarse después a partir de tal cultivo con el uso de procesos de purificación conocidos. La purificación del polipéptido puede incluir una columna de afinidad que contiene agentes que unirán al polipéptido; una o más etapas de columna sobre tales resinas de afinidad; una o más etapas que implican cromatografía con interacciones hidrofóbicas; o cromatografía de inmuoafinidad. Alternativamente, el polipéptido puede expresarse, además, en una forma que facilitará la purificación. Por ejemplo, puede expresarse como un polipéptido de fusión, tal como los del polipéptido de unión a maltosa, glutatión-5-transferasa, etiqueta de histidinas o tioredoxina. Los kits para la expresión y purificación de polipéptidos de fusión están disponibles comercialmente. El polipéptido puede etiquetarse con un epítipo y posteriormente purificarse mediante el uso de un anticuerpo específico dirigido a tal epítipo. Una o más etapas de cromatografía líquida – tal como cromatografía líquida de alto rendimiento en fase reversa pueden emplearse para purificar más aún el polipéptido. Algunas o todas las etapas de purificación anteriores, en varias combinaciones, pueden emplearse para proporcionar un polipéptido recombinante esencialmente homogéneo. El polipéptido así purificado puede estar esencialmente libre de otros polipéptidos y en la presente descripción se define como un "polipéptido esencialmente purificado"; tales polipéptidos purificados incluyen polipéptidos, fragmentos, variantes, y similares. La expresión, aislamiento, y purificación de los

polipéptidos y fragmentos pueden llevarse a cabo mediante cualquier técnica adecuada, que incluye pero no se limitan a los métodos descritos en la presente descripción.

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

5 polipéptidos pueden retirarse de una columna de afinidad con el uso de técnicas convencionales, por ejemplo, en un amortiguador de elución con alto contenido de sales y después separar mediante diálisis en un amortiguador con bajo contenido de sales para el uso o al cambiar el pH u otros componentes en dependencia de la matriz de afinidad utilizada, o retirarse de manera competitiva con el uso del sustrato de origen natural del motivo de afinidad.

10 Se describen composiciones de polinucleótidos o proteínas aislados o esencialmente purificados. Un polinucleótido o proteína, o porción biológicamente activa de estos, "aislado" o "purificado" está esencialmente o esencialmente libre de componentes que normalmente acompañan o interactúan con el polinucleótido o proteína como se encuentra en su ambiente natural. Así, un polinucleótido o proteína aislado o purificado está esencialmente libre de otro

15 material celular o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas recombinantes, o esencialmente libre de precursores químicos u otras sustancias químicas cuando se sintetiza químicamente. De manera óptima, un polinucleótido "aislado" está libre de secuencias (de manera óptima secuencias codificantes de proteínas) que flanquean naturalmente al polinucleótido (por ejemplo, secuencias localizadas en los extremos 5' y 3' del polinucleótido) en

20 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 al polinucleótido en el ADN genómico de la célula de la cual se deriva el polinucleótido. Una proteína que está esencialmente libre de material celular incluye preparaciones de proteína que

25 tienen menos de aproximadamente 30 %, 20 %, 10 %, 5 %, o 1 % (en peso seco) de proteína contaminante.

Un polipéptido puede producirse, además, mediante síntesis química convencional conocida. Los métodos para construir los polipéptidos o fragmentos de estos mediante medios sintéticos se conocen por los expertos en la técnica. Las secuencias de polipéptidos construidas sintéticamente, en virtud de compartir características conformacionales o estructurales primarias, secundarias o terciarias con los polipéptidos nativos pueden poseer propiedades biológicas en común con esas, que incluyen la actividad biológica.

El término 'de origen no natural' como se usa en la presente describe una entidad (por ejemplo, un polinucleótido, una mutación genética, un polipéptido, una planta, una célula vegetal y material vegetal) que no se forma naturalmente o que no existe en la naturaleza. Tales entidades de origen no natural o entidades artificiales pueden obtenerse, sintetizarse, iniciarse, modificarse, intervenir, o manipularse mediante métodos descritos en la presente descripción o que se conocen en la técnica. Tales entidades de origen no natural o entidades artificiales pueden obtenerse, sintetizarse, iniciarse, modificarse, intervenir, o manipularse por el hombre. Así, a manera de ejemplo, una planta de origen no natural, una célula vegetal de origen no natural o material vegetal de origen no natural puede producirse con el uso de técnicas tradicionales de mejoramiento de plantas - tales como retrocruzamiento - o mediante tecnologías de manipulación genética - tales como ARN antisentido, ARN de interferencia, meganucleasa y similares. A manera 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. Así, 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 al modificar 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. En ciertas modalidades, una mutación no es una mutación de origen natural que existe naturalmente en una secuencia de nucleótidos o un polipéptido – tal como un gen o una proteína.

Las diferencias en el fondo genético pueden detectarse mediante diferencias fenotípicas o mediante técnicas de biología molecular conocidas en la técnica - tales como secuenciación de ácidos nucleicos, presencia o ausencia de marcadores genéticos (por ejemplo, marcadores de ARN de microsátélites).

Se proporcionan además los anticuerpos que son inmunorreactivos con los polipéptidos descritos en la presente descripción. Los polipéptidos, fragmentos, variantes, polipéptidos de fusión, y similares, como que se expone en la presente descripción, pueden emplearse como "inmunógenos" en la producción de anticuerpos inmunorreactivos con ellos. Tales anticuerpos pueden unirse específicamente al polipéptido mediante los sitios de unión al antígeno del anticuerpo. Los anticuerpos de unión específica son los que reconocerán específicamente y se unirán con un polipéptido, homólogos, y variantes, pero no con otras moléculas. En una modalidad, los anticuerpos son específicos para polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos como se expone en la presente descripción y no reaccionan de manera cruzada con otros polipéptidos.

Más específicamente, los polipéptidos, fragmento, variantes, polipéptidos de fusión, y similares contienen determinantes antigénicos o epítomos que producen como respuesta la formación de anticuerpos. Estos determinantes antigénicos o epítomos pueden ser lineales o conformacionales (discontinuos). Los epítomos lineales están compuestos de una sola sección de aminoácidos del polipéptido, mientras que los epítomos conformacionales o discontinuos están compuestos de secciones de aminoácidos de diferentes regiones de la cadena del

polipéptido que quedan en una proximidad cercana tras el plegamiento del polipéptido. Los epítomos pueden identificarse mediante cualquiera de los métodos conocidos en la técnica. Adicionalmente, los epítomos de los polipéptidos pueden usarse como reactivos de investigación, en ensayos, y para purificar anticuerpos de unión específica a partir de sustancias tales como sueros policlonales o sobrenadantes a partir de hibridomas cultivados. Tales epítomos o variantes de estos pueden producirse con el uso de técnicas conocidas en la técnica tales como síntesis en fase sólida, escisión química o enzimática de un polipéptido, o con el uso de la tecnología de ADN recombinante.

Tantos los anticuerpos policlonales como monoclonales para los polipéptidos pueden prepararse mediante técnicas convencionales. Las líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos monoclonales específicos para los polipéptidos también se abarcan en la presente descripción. Tales hibridomas pueden producirse e identificarse mediante técnicas convencionales. Para la producción de anticuerpos, varios animales huéspedes pueden inmunizarse mediante inyección con un polipéptido, fragmento, variante, o mutantes de estos.

Tales animales huéspedes pueden incluir, pero no se limitan a, conejos, ratones, y ratas, por nombrar algunos. Varios adyuvantes pueden usarse para aumentar la respuesta inmunológica. En dependencia de la especie huésped, tales adyuvantes incluyen, pero no se limitan a, el adyuvante de Freund (completo e incompleto), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensoactivas tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones en aceite, hemocianina de lapa californiana, dinitrofenol, y adyuvantes potencialmente útiles en humanos tales como BCG (bacilo de Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*. Los anticuerpos monoclonales pueden recuperarse mediante técnicas convencionales. Tales anticuerpos monoclonales pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina que incluye IgG, IgM, IgE, IgA, IgD, y cualquier subclase de estas.

Los anticuerpos pueden usarse, además, en ensayos para detectar la presencia de los polipéptidos o fragmentos, lo mismo *in vitro* que *in vivo*. Los anticuerpos pueden emplearse

además en la purificación de polipéptidos o fragmentos mediante cromatografía de inmutaoafinidad.

A diferencia de la mutagénesis, las composiciones que pueden modular la expresión o la actividad de uno o más de los polinucleótidos o polipéptidos seleccionados del grupo que consisten en NND3, CYP82E4, CYP82E5 o CYP82E10 o una combinación de dos, tres o cuatro de estos (por ejemplo una combinación de NND3, CYP82E4, CYP82E5 y CYP82E10) incluyen, pero no se limitan a, polinucleótidos específicos de secuencias que pueden interferir con la transcripción de uno o más genes endógenos; polinucleótidos específicos de secuencias que pueden interferir con la traducción de transcritos de ARN (por ejemplo, ARN de doble cadena, ARNip, ribozimas); polipéptidos específicos de secuencias que pueden interferir con la estabilidad de una o más proteínas; polinucleótidos específicos de secuencias que pueden interferir con la actividad enzimática de una o más proteínas o la actividad de unión de una o más proteínas con respecto a los sustratos o proteínas reguladoras; anticuerpos que exhiben especificidad por una o más proteínas; compuestos de molécula pequeña que pueden interferir con la estabilidad de una o más proteínas o la actividad enzimática de una o más proteínas o la actividad de unión de una o más proteínas; proteínas con dedos de zinc que se unen a uno o más polinucleótidos; y meganucleasas que tienen actividad hacia uno o más polinucleótidos. Las tecnologías de edición de genes, las tecnologías de edición genética y las tecnologías de edición de genomas se conocen bien en la técnica.

Un método de edición de genes implica el uso de nucleasas efectoras similares a activadores de la transcripción (TALEN) las que inducen rupturas de la doble cadena a lo que las células pueden responder con mecanismos de reparación. La unión de extremos no homólogos conecta nuevamente el ADN de cada lado de una ruptura de la doble cadena donde hay muy poco o no hay solapamiento de secuencias para la hibridación. Este mecanismo de reparación induce errores en el genoma por inserción o delección, o reordenamiento cromosómico. Cualquiera de tales errores puede volver no funcionales a los productos génicos codificados en

esa ubicación. Otro método de edición de genes implica el uso del sistema bacteriano CRISPR/Cas. Las bacterias y archaea exhiben elementos cromosómicos denominados repeticiones palindrómicas cortas interespaciadas agrupadas regularmente (CRISPR) que son parte de un sistema inmunológico adaptativo que protege contra ADN invasor viral y plasmídico.

- 5 En los sistemas CRISPR tipo II, los ARN de CRISPR (crARN) funcionan con proteínas transactivadoras crARN (tracrARN) y asociadas a CRISPR (Cas) para introducir rupturas de la doble cadena en un ADN objetivo. La escisión objetivo mediante Cas9 requiere apareamiento de bases entre los crARN y tracrARN así como apareamiento de bases entre los crARN y el ADN objetivo. El reconocimiento objetivo se facilita por la presencia de un motivo corto
- 10 denominado un motivo adyacente al protoespaciador (PAM) que conforma a la secuencia NGG. Este sistema puede implementarse para la edición de genomas. Cas9 normalmente se programa mediante un ARN dual que consiste en el crARN y tracrARN. Sin embargo, los componentes núcleos de estos ARN pueden combinarse en un solo 'ARN guía' híbrido para el direccionamiento de Cas9. El uso de un guía de ARN no codificante para dirigirse al ADN para
- 15 una escisión específica de un sitio promete ser significativamente más directo que las tecnologías existentes - tales como TALEN. Con el uso de la estrategia CRISPR/Cas, el redireccionamiento del complejo de nucleasa sólo requiere la introducción de una nueva secuencia de ARN y no hay necesidad de rediseñar la especificidad de los factores de transcripción de proteínas.
- 20 La tecnología antisentido es otro método bien conocido que puede usarse para modular la expresión de un polipéptido. Un polinucleótido del gen a reprimir se clona y se une operativamente a una región regulatoria y una secuencia de terminación de la transcripción de manera que la cadena de ARN antisentido se transcribe. El constructo recombinante se transforma después en una célula vegetal y se produce la cadena de ARN antisentido. El
- 25 polinucleótido no necesita ser la secuencia completa del gen a reprimir, pero típicamente será esencialmente complementaria a al menos una porción de la cadena sentido del gen a reprimir.

Un polinucleótido puede transcribirse en una ribozima, o ARN catalítico, que afecta la expresión de un ARNm. Las ribozimas pueden diseñarse para aparearse específicamente con virtualmente cualquier ARN objetivo y escindir la cadena principal de fosfodiéster en una ubicación específica, de esta manera inactivan funcionalmente el ARN objetivo. Los

5 polinucleótidos heterólogos pueden codificar ribozimas diseñadas para escindir transcritos de ARNm particulares, lo que impide así la expresión de un polipéptido. Las ribozimas cabeza de martillo son útiles para destruir ARNm particulares, aunque pueden usarse varias ribozimas que escinden ARNm en secuencias de reconocimiento específicas de un sitio. Las ribozimas cabeza de martillo escinden ARNm en ubicaciones determinadas por regiones flanqueantes que

10 forman pares de bases complementarios con el ARNm objetivo. El único requerimiento es que el ARN objetivo contenga una secuencia de nucleótidos 5'-UG-3'. La construcción y producción de ribozimas cabeza de martillo se conoce en la técnica. Las secuencias de ribozimas cabeza de martillo pueden incorporarse en un ARN estable tal como un ARN de transferencia (ARNt) para aumentar la eficacia de escisión *in vivo*.

15 En una modalidad, el polinucleótido específico de secuencia que puede interferir con la traducción de transcrito(s) de ARN es un ARN de interferencia. La interferencia por ARN o el silenciamiento por ARN es un proceso conservado evolutivamente mediante el cual los ARNm específicos pueden dirigirse a la degradación enzimática. Un ARN de doble cadena (ARN de

20 doble cadena) se introduce o se produce por una célula (por ejemplo, virus de ARN de doble cadena, o polinucleótidos de ARN de interferencia) para iniciar la vía del ARN de interferencia. El ARN de doble cadena puede convertirse en múltiples híbridos pequeños de ARN de interferencia pequeños de 21-24 pb de longitud por las RNasas III, que son endonucleasas específicas de ARN de doble cadena. Los ARN de interferencia pequeños posteriormente pueden ser reconocidos por complejos de silenciamiento inducidos por ARN que promueven el

25 desenrollamiento del ARN de interferencia pequeño a través de un proceso dependiente de ATP. La cadena antisentido desenrollada del ARN de interferencia pequeño guía a los

complejos de silenciamiento inducidos por ARN activados al ARNm objetivo que comprende una secuencia complementaria a la cadena antisentido del ARN de interferencia pequeño. El ARNm objetivo y la cadena antisentido pueden formar una hélice en forma A, y el surco principal de la hélice en forma A puede ser reconocido por los complejos de silenciamiento inducidos por ARN activados. El ARNm objetivo puede escindirse por los complejos de silenciamiento inducidos por ARN activados en un solo sitio definido por el sitio de unión del extremo 5' de la cadena del ARN de interferencia pequeño. Los complejos de silenciamiento inducidos por ARN activados pueden reciclarse para catalizar otro evento de escisión.

Los vectores de expresión de ARN de interferencia pueden comprender constructos de ARN de interferencia que codifican polinucleótidos de ARN de interferencia que exhiben actividad de interferencia del ARN al reducir el nivel de expresión de los ARNm, pre-ARNm, o variantes de ARN relacionadas. Los vectores de expresión pueden comprender un promotor ubicado aguas arriba y unido operativamente a un constructo de ARN de interferencia, como se describe adicionalmente en la presente descripción. Los vectores de expresión de ARN de interferencia pueden comprender un promotor núcleo mínimo adecuado, un constructo de ARN de interferencia de interés, una región regulatoria corriente arriba (5'), una región regulatoria corriente abajo (3'), que incluye señales de terminación de la transcripción y poliadenilación, y otras secuencias conocidas para las personas con experiencia en la técnica, tales como varios marcadores de selección.

Los polinucleótidos pueden producirse en varias formas, que incluyen estructuras de doble cadena (es decir, una molécula de ARN de doble cadena que comprende una cadena antisentido y una cadena sentido complementaria), estructuras de doble cadena similar a horquilla, o estructuras de una sola cadena (es decir, una molécula de ARNmc que comprende solo una cadena antisentido). Las estructuras pueden comprender un híbrido, híbrido asimétrico, horquilla o estructura secundaria de horquilla asimétrica, que tiene cadenas sentido y antisentido autocomplementarias. El ARN de interferencia de doble cadena puede convertirse

enzimáticamente a los ARN de interferencias pequeños de doble cadena. Una de las cadenas del híbrido de ARN de interferencia pequeño puede hibridar con una secuencia complementaria dentro del ARNm objetivo y variantes de ARN relacionadas. Los híbridos de ARN de interferencia pequeño/ARNm son reconocidos por complejos de silenciamiento inducidos por ARN que pueden escindir ARN en múltiples sitios de una manera dependiente de la secuencia, lo que resulta en la degradación del ARNm objetivo y variantes de ARN relacionadas.

Las moléculas de ARN de doble cadena pueden incluir moléculas de ARN de interferencia pequeño, ensambladas a partir de un solo oligonucleótido en una estructura de tallo-lazo, en donde las regiones sentido y antisentido autocomplementarias de la molécula de ARN de interferencia pequeño están unidas por medio de un conector(es) basado(s) en un polinucleótido o no basado en un polinucleótido, así como ARN circular de una sola cadena que tiene dos o más estructuras de lazo y un tallo que comprende las cadenas sentido y antisentido autocomplementarias, en donde el ARN circular puede procesarse lo mismo *in vivo* que *in vitro* para generar una molécula activa de ARN de interferencia pequeño capaz de mediar la interferencia del ARN.

Se considera, además, el uso de pequeñas moléculas de ARN en horquilla. Ellas comprenden una secuencia antisentido específica además de la secuencia complementaria (sentido) inversa, típicamente separadas por un espaciador o secuencia en lazo. La escisión del espaciador o lazo proporciona una molécula de ARN de una sola cadena y su complemento inverso, de manera que pueden hibridar para formar una molécula de ARN de doble cadena (opcionalmente con etapas de procesamiento adicionales que pueden resultar en la adición o eliminación de uno, dos, tres o más nucleótidos a partir del extremo 3' o el extremo 5' de cualquiera de las cadenas o ambas). El espaciador puede ser de una longitud suficiente para permitir que las secuencias antisentido y sentido hibriden y formen una estructura de doble cadena (o tallo) antes de la escisión del espaciador (y, opcionalmente, etapas de procesamiento posteriores que pueden resultar en la adición o eliminación de uno, dos, tres, cuatro, o más

nucleótidos a partir del extremo 3' o el extremo 5' de cualquiera de las cadenas o de ambas).

La secuencia del espaciador típicamente es una secuencia de nucleótidos no relacionada que se sitúa entre dos regiones complementarias de secuencias de nucleótidos las cuales, cuando hibridan en un polinucleótido de doble cadena, comprenden un pequeño ARN en horquilla. La

5 secuencia del espaciador generalmente comprende entre aproximadamente 3 y aproximadamente 100 nucleótidos.

Cualquier polinucleótido de ARN de interés puede producirse al seleccionar una adecuada composición de secuencias, tamaño del lazo, y longitud del tallo para producir el híbrido en horquilla. Un rango adecuado para diseñar las longitudes del tallo de un híbrido en horquilla,

10 incluye las longitudes del tallo de al menos aproximadamente 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleótidos – tal como aproximadamente 14-30 nucleótidos, aproximadamente 30-50 nucleótidos, aproximadamente 50-100 nucleótidos, aproximadamente 100-150 nucleótidos, aproximadamente 150-200 nucleótidos, aproximadamente 200-300 nucleótidos, aproximadamente 300-400 nucleótidos, aproximadamente 400-500 nucleótidos, 15 aproximadamente 500-600 nucleótidos, y aproximadamente 600-700 nucleótidos. Un rango

adecuado para diseñar las longitudes del lazo de un híbrido en horquilla, incluye las longitudes del lazo de aproximadamente 4-25 nucleótidos, aproximadamente 25-50 nucleótidos, o más largas si la longitud del tallo del híbrido en horquilla es sustancial. En ciertas modalidades, una molécula de ARN de doble cadena o de ARNmc es de entre aproximadamente 15 y

20 aproximadamente 40 nucleótidos en longitud. En otra modalidad, la molécula de ARN de interferencia pequeño es una molécula de ARN de doble cadena o un ARNmc entre aproximadamente 15 y aproximadamente 35 nucleótidos en longitud. En otra modalidad, la molécula de ARN de interferencia pequeño es una molécula de ARN de doble cadena o un ARNmc entre aproximadamente 17 y aproximadamente 30 nucleótidos en longitud. En otra 25 modalidad, la molécula de ARN de interferencia pequeño es una molécula de ARN de doble cadena o un ARNmc entre aproximadamente 19 y aproximadamente 25 nucleótidos en longitud.

En otra modalidad, la molécula de ARN de interferencia pequeño es una molécula de ARN de doble cadena o ARNmc entre aproximadamente 21 a aproximadamente 24 nucleótidos en longitud. En ciertas modalidades, las estructuras de horquillas con regiones híbridas más largas que 21 nucleótidos pueden promover un efectivo silenciamiento dirigido por el ARN de interferencia pequeño, independientemente de la secuencia y la longitud del lazo. Una secuencia ilustrativa para la interferencia de ARN se expone en la sec. con núm. de ident.: 4.

La secuencia del ARNm objetivo típicamente está entre aproximadamente 14 a aproximadamente 50 nucleótidos en longitud. El ARNm objetivo puede, por lo tanto, examinarse por regiones entre aproximadamente 14 y aproximadamente 50 nucleótidos en longitud que cumplen preferentemente con uno o más de los siguientes criterios para una secuencia objetivo: una relación A+T/G+C de entre aproximadamente 2:1 y aproximadamente 1:2; un dinucleótido AA o un dinucleótido CA en el extremo 5' de la secuencia objetivo; una secuencia de al menos 10 nucleótidos consecutivos única para el ARNm objetivo (es decir, la secuencia no está presente en otras secuencias de ARNm de la misma planta); y no hay "corridas" de más de tres nucleótidos consecutivos de guanina (G) o más de tres nucleótidos consecutivos de citosina (C). Estos criterios pueden evaluarse con el uso de varias técnicas conocidas en la materia, por ejemplo, pueden usarse programas informáticos tales como BLAST para buscar bases de datos disponibles públicamente para determinar si la secuencia objetivo seleccionada es única para el ARNm objetivo. Alternativamente, puede seleccionarse una secuencia objetivo (y diseñarse una secuencia de ARN de interferencia pequeño) con el uso de programas informáticos disponibles comercialmente (por ejemplo, OligoEngine, Target Finder y la Herramienta de Diseño de ARN de interferencia pequeño, los que están disponibles comercialmente).

En una modalidad, se selecciona que las secuencias de ARNm objetivo sean entre aproximadamente 14 y aproximadamente 30 nucleótidos en longitud que cumplan uno o más de los criterios anteriores. En otra modalidad, se selecciona que las secuencias objetivos sean

entre aproximadamente 16 y aproximadamente 30 nucleótidos en longitud que cumplan con uno o más de los criterios anteriores. En una modalidad adicional, se selecciona que las secuencias objetivos sean entre aproximadamente 19 y aproximadamente 30 nucleótidos en longitud que cumplan con uno o más de los criterios anteriores. En otra modalidad, se selecciona que las secuencias objetivos sean entre aproximadamente 19 y aproximadamente 25 nucleótidos en longitud que cumplan uno o más de los criterios anteriores.

En una modalidad ilustrativa, la molécula de ARN de interferencia pequeño comprende una secuencia antisentido específica que es complementaria a al menos 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, o más nucleótidos contiguos de cualquiera de las secuencias de polinucleótidos descritas en la presente descripción.

La secuencia antisentido específica comprendida por la molécula de ARN de interferencia pequeño puede ser idéntica o esencialmente idéntica al complemento de la secuencia objetivo. En una modalidad, la secuencia antisentido específica comprendida por la molécula de ARN de interferencia pequeño es al menos aproximadamente 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica al complemento de la secuencia de ARNm objetivo. Los métodos para determinar la identidad de secuencia se conocen en la técnica y puede determinarse, por ejemplo, mediante el uso del programa BLASTN del programa informático del Grupo de Computación de la Universidad de Wisconsin (GCG) o proporcionarse en el sitio de internet del NCBI.

La secuencia antisentido específica de la molécula de ARN de interferencia pequeño puede exhibir variabilidad al diferir (por ejemplo, por sustitución de nucleótidos, que incluye transición o transversión) en uno, dos, tres, cuatro o más nucleótidos de la secuencia del ARNm objetivo. Cuando tales sustituciones de nucleótidos están presentes en la cadena antisentido de una molécula de ARN de doble cadena, el nucleótido complementario en la cadena sentido con el cual el nucleótido sustituto típicamente formaría apareamiento de bases por enlace de hidrógeno puede o no estar sustituido de manera correspondiente. Se consideran además las

moléculas de ARN de doble cadena en las que se producen una o más sustituciones de nucleótidos en la secuencia sentido, pero no en la cadena antisentido. Cuando la secuencia antisentido de una molécula de ARN de interferencia pequeño comprende uno o más errores de apareamiento entre la secuencia de nucleótidos del ARN de interferencia pequeño y la
5 secuencia de nucleótidos objetivo, como se describe anteriormente, los errores de apareamiento pueden encontrarse en el extremo 3' terminal, el extremo 5' terminal o en la porción central de la secuencia antisentido.

En otra modalidad, la molécula de ARN de interferencia pequeño comprende una secuencia antisentido específica que es capaz de hibridar selectivamente en condiciones rigurosas a una
10 porción de un gen objetivo de origen natural o ARNm objetivo. Como se conoce por los expertos en la técnica, las variaciones en la rigurosidad de las condiciones de hibridación pueden lograrse al alterar el tiempo, temperatura o concentración de las soluciones usadas para las etapas de hibridación y lavado. Además, las condiciones adecuadas pueden depender en parte en las secuencias de nucleótidos particulares usadas, por ejemplo la secuencia del
15 ARNm o gen objetivos.

Un método para inducir el silenciamiento por ARN de doble cadena en plantas es la transformación con un constructo génico que produce ARN en horquilla (ver Smith y *otros*. (2000) *Nature*, 407, 319-320). Tales constructos comprenden regiones invertidas de la secuencia del gen objetivo, separadas por un espaciador apropiado. La inserción de una región
20 de intrón funcional de planta como un fragmento espaciador aumenta adicionalmente la eficacia de la inducción del silenciamiento génico, debido a la generación de un ARN en horquilla empalmado por intrones (Wesley y *otros*. (2001) *Plant J.*, 27, 581-590). De manera adecuada, la longitud del tallo es de aproximadamente 50 nucleótidos a aproximadamente 1 kilobases en longitud. Los métodos para producir ARN en horquilla empalmado con intrones están bien
25 descritos en la técnica (ver por ejemplo, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* (2008) 72, 2, 615-617).

Las moléculas de ARN de interferencia que tienen una estructura híbrida o de doble cadena, por ejemplo ARN de doble cadena o pequeños ARN en horquilla, pueden tener extremos romos, o pueden tener salientes en 3' o 5'. Como se usa en la presente descripción, "saliente" se refiere al nucleótido o nucleótidos no pareados que se proyectan a partir de una estructura híbrida cuando un extremo 3' terminal de una cadena de ARN se extiende más allá del extremo 5'-terminal de la otra cadena (saliente en 3'), o viceversa (saliente en 5'). Los nucleótidos que comprenden el saliente pueden ser ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos o versiones modificadas de estos. En una modalidad, al menos una cadena de la molécula de ARN de interferencia tiene un saliente en 3' de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 nucleótidos en longitud. En otras modalidades, el saliente en 3' es de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 nucleótidos, de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 nucleótidos y de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 nucleótidos en longitud.

Cuando la molécula de ARN de interferencia comprende un saliente en 3' en un extremo de la molécula, el otro extremo puede ser un extremo romo o tener también un saliente (5' o 3'). Cuando la molécula de ARN de interferencia comprende un saliente en ambos extremos de la molécula, la longitud de los salientes puede ser la misma o diferente. En una modalidad, la molécula de ARN de interferencia comprende salientes en 3' de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 nucleótidos en ambos extremos de la molécula. En una modalidad adicional, la molécula de ARN de interferencia es un ARN de doble cadena que tiene un saliente en 3' de 2 nucleótidos en ambos extremos de la molécula. Aún en otra modalidad, los nucleótidos que comprenden el saliente del ARN de interferencia son dinucleótidos TT o dinucleótidos UU.

Cuando se determina el porcentaje de identidad de la molécula de ARN de interferencia que comprende uno o más salientes con la secuencia de ARNm objetivo, el(los) saliente(s) puede(n) tomarse en cuenta o no. Por ejemplo, los nucleótidos de un saliente en 3' y hasta 2 nucleótidos

de los extremos 5' o 3' terminales de la doble cadena pueden estar modificados sin una pérdida significativa de la actividad de la molécula de ARN de interferencia pequeño.

Las moléculas de ARN de interferencia pueden comprender una o más estructuras de caperuza en 5' o 3'. La molécula de ARN de interferencia puede comprender una estructura de caperuza

5 en el extremo 3' de la cadena sentido, la cadena antisentido, o ambas cadenas sentido y antisentido; o en el extremo 5' de la cadena sentido, la cadena antisentido, o ambas cadenas sentido y antisentido de la molécula de ARN de interferencia. Alternativamente, la molécula de ARN de interferencia puede comprender una estructura de caperuza en ambos extremos 3' y 5' de la molécula de ARN de interferencia. El término "estructura de caperuza" se refiere a una
10 modificación química incorporada en cualquier extremo terminal de un oligonucleótido, la cual protege la molécula de la degradación de exonucleasas, y puede facilitar además el suministro o localización dentro de una célula.

Otra modificación aplicable a moléculas de ARN de interferencia es el enlace químico a la molécula de ARN de interferencia de uno o más motivos o conjugados que mejoran la actividad,
15 distribución celular, captación celular, biodisponibilidad o estabilidad de la molécula de ARN de interferencia. Los polinucleótidos pueden sintetizarse o modificarse mediante métodos bien establecidos en la técnica. Las modificaciones químicas pueden incluir, pero no se limitan a modificaciones en 2', introducción de bases no naturales, unión covalente a un ligando, y reemplazo de enlaces fosfato con enlaces tiofosfato. En esta modalidad, la integridad de la
20 estructura de híbrido se fortalece mediante al menos uno, y típicamente dos, enlaces químicos. La unión química puede lograrse mediante cualquiera de una variedad de técnicas bien conocidas, por ejemplo al introducir enlaces covalentes, iónicos o de hidrógeno; interacciones hidrofóbicas, interacciones de van der Waals o de apilamiento; por medio de una coordinación metal-ión, o a través del uso de análogos de purina.

25 Los nucleótidos en una o en ambas de las dos cadenas simples pueden modificarse para modular la activación de enzimas celulares, tales como, por ejemplo, sin limitarse a, ciertas

nucleasas. Las técnicas para reducir o inhibir la activación de enzimas celulares se conocen en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, modificaciones 2'-amino, modificaciones 2'-fluoro, modificaciones 2'-alquilo, modificaciones a la cadena principal no cargada, modificaciones morfolino, modificaciones 2'-O-metil, y fosforamidato. Así, al menos un grupo 2'-hidroxilo de los nucleótidos en un ARN de doble cadena se reemplaza por un grupo químico. Además, al menos un nucleótido puede modificarse para formar un nucleótido bloqueado. Tal nucleótido bloqueado contiene un puente de metileno o etileno que conecta el oxígeno 2' de la ribosa con el carbono 4' de la ribosa. La introducción de un nucleótido bloqueado en un oligonucleótido mejora la afinidad por secuencias complementarias y aumenta la temperatura de fusión en varios grados.

Los ligandos pueden conjugarse a una molécula de ARN de interferencia, por ejemplo, para aumentar su absorción celular. En ciertas modalidades, un ligando hidrofóbico se conjuga a la molécula para facilitar la permeación directa de la membrana celular. Estos enfoques se han usado para facilitar la permeación celular de oligonucleótidos antisentido. En ciertos casos, la conjugación de un ligando catiónico a oligonucleótidos frecuentemente resulta en una resistencia mejorada a las nucleasas. Los ejemplos representativos de ligandos catiónicos incluyen propilamonio y dimetilpropilamonio. Los oligonucleótidos antisentido pueden retener su alta afinidad de unión al ARNm cuando el ligando catiónico está disperso en todo el oligonucleótido.

Las moléculas y polinucleótidos descritos en la presente descripción puede prepararse con el uso de técnicas bien conocidas de síntesis en fase sólida. Cualquier otro medio conocido en la técnica para tal síntesis puede emplearse adicionalmente o alternativamente.

Diversas modalidades están dirigidas a vectores de expresión que comprenden uno o más de los polinucleótidos o constructos de ARN de interferencia que comprenden uno o más polinucleótidos descritos en la presente descripción. Un constructo de ARN de interferencia ilustrativo se muestra en la sec. con núm. de ident.:4.

Diversas modalidades están dirigidas a vectores de expresión que comprenden uno o más de los polinucleótidos o uno o más constructos de ARN de interferencia descritos en la presente descripción.

5 Varias modalidades están dirigidas a vectores de expresión que comprenden uno o más polinucleótidos o uno o más constructos de ARN de interferencia que codifican uno o más polinucleótidos de ARN de interferencia descritos en la presente descripción que son capaces de autohibridar para formar una estructura de horquilla, en la que el constructo comprende (a) uno o más de los polinucleótidos descritos en la presente descripción; (b) una segunda secuencia que codifica un elemento espaciador que forma un lazo de la estructura de horquilla; 10 y (c) una tercera secuencia que comprende una secuencia complementaria inversa a la primera secuencia, ubicada en la misma orientación que la primera secuencia, en donde la segunda secuencia se ubica entre la primera secuencia y la tercera secuencia, y la segunda secuencia está unida operativamente a la primera secuencia y a la tercera secuencia.

Las secuencias descritas pueden utilizarse para construir varios polinucleótidos que no forman 15 estructuras de horquilla. Por ejemplo, un ARN de doble cadena puede formarse al (1) transcribir una primera cadena del ADN al unirse operativamente a un primer promotor, y (2) transcribir la secuencia complementaria inversa de la primera cadena del fragmento de ADN al unirse operativamente a un segundo promotor. Cada cadena del polinucleótido puede transcribirse a partir del mismo vector de expresión, o a partir de vectores de expresión 20 diferentes. El ARN híbrido que tiene actividad de interferencia de ARN puede convertirse enzimáticamente a ARN de interferencia pequeños para modular los niveles de ARN.

Así, varias modalidades están dirigidas a vectores de expresión que comprenden uno o más polinucleótidos o constructos de ARN de interferencia descritos en la presente descripción que codifican polinucleótidos de ARN de interferencia capaces de autohibridar, en los que el 25 constructo comprende (a) uno o más de los polinucleótidos descritos en la presente descripción; y (b) una segunda secuencia que comprende una secuencia complementaria (por ejemplo,

complementaria inversa) a la primera secuencia, ubicada en la misma orientación que la primera secuencia.

Varias composiciones y métodos se proporcionan para modular los niveles de expresión endógena de uno o más de los polipéptidos descritos en la presente descripción (o cualquier de sus combinaciones como se describe en la presente descripción) al promover la cosupresión de la expresión génica. El fenómeno de co-supresión se produce como un resultado de introducir múltiples copias de un transgén en una célula vegetal huésped. La integración de múltiples copias de un transgén puede resultar en una expresión modulada del transgén y el gen objetivo endógeno. El grado de co-supresión depende del grado de identidad de secuencias entre el transgén y el gen objetivo endógeno. El silenciamiento de ambos el gen endógeno y el transgén puede producirse por metilación extensa de los loci silenciados (es decir, el promotor endógeno y el gen endógeno de interés) que puede impedir la transcripción. Alternativamente, en algunos casos, la co-supresión del gen endógeno y el transgén puede producirse mediante silenciamiento génico post transcripcional, en el que los transcritos pueden producirse pero el aumento de las tasas de degradación impiden la acumulación de transcritos. El mecanismo para la co-supresión mediante silenciamiento génico post-transcripcional parece asemejarse a la interferencia de ARN, en que el ARN parece ser tanto un iniciador importante como un objetivo en estos procesos, y puede estar mediado al menos en parte por la misma maquinaria molecular, posiblemente a través de la degradación de ARNm guiada por ARN.

La co-supresión de ácidos nucleicos puede lograrse al integrar múltiples copias del ácido nucleico o fragmentos de este, como transgenes, en el genoma de una planta de interés. La planta huésped puede transformarse con un vector de expresión que comprende un promotor unido operativamente al ácido nucleico o fragmentos de este. Varias modalidades están dirigidas a vectores de expresión para promover la co-supresión de genes endógenos que comprenden un promotor unido operativamente a un polinucleótido.

Diversas modalidades están dirigidas a métodos para modular el nivel de expresión de uno o más de los polinucleótidos descritos en la presente descripción (o cualquier combinación de estos como se describe en la presente descripción) mediante la integración de múltiples copias del (de los) polinucleótido(s) en un genoma de planta (de tabaco), que comprenden: transformar una célula vegetal huésped con un vector de expresión que comprende un promotor unido operativamente a un polinucleótido.

Varias composiciones y métodos se proporcionan para modular el nivel de expresión del gen endógeno al modular la traducción de ARNm. Una célula vegetal (de tabaco) huésped puede transformarse con un vector de expresión que comprende: un promotor unido operativamente a un polinucleótido, ubicado en orientación antisentido con respecto al promotor para permitir la expresión de polinucleótidos de ARN que tienen una secuencia complementaria a una porción de ARNm.

Varios vectores de expresión para modular la traducción de ARNm pueden comprender: un promotor unido operativamente a un polinucleótido en el que la secuencia se ubica en orientación antisentido con respecto al promotor. Las longitudes de los polinucleótidos de ARN antisentido pueden variar, y pueden ser de aproximadamente 15-20 nucleótidos, aproximadamente 20-30 nucleótidos, aproximadamente 30-50 nucleótidos, aproximadamente 50-75 nucleótidos, aproximadamente 75-100 nucleótidos, aproximadamente 100-150 nucleótidos, aproximadamente 150-200 nucleótidos, y aproximadamente 200-300 nucleótidos.

Los genes pueden dirigirse, además, por inactivación al introducir transposones (por ejemplo, elementos IS) en los genomas de plantas de interés. Estos elementos genéticos móviles pueden introducirse por fecundación cruzada sexual y los mutantes por inserción pueden tamizarse en busca de la pérdida en la actividad proteica. El gen interrumpido en una planta parental puede introducirse en otras plantas al cruzar la planta parental con una planta no sujeta a mutagénesis inducida por transposones mediante, por ejemplo, fecundación cruzada sexual. Puede utilizarse cualquier técnica de mejoramiento estándar conocida por los expertos

en la técnica. En una modalidad, uno o más genes pueden inactivarse mediante la inserción de uno o más transposones. Las mutaciones pueden resultar en interrupción homocigota de uno o más genes, en interrupción heterocigota de uno o más genes, o una combinación de ambas interrupciones homocigota y heterocigota si se interrumpe más de un gen. Los elementos transponibles incluyen retrotransposones, retroposones, y elementos similares a SINE. Tales métodos se conocen por los expertos en la técnica.

Alternativamente, el direccionamiento a los genes puede ser por inactivación al introducir ribozimas derivadas a partir de un número de ARN circulares pequeños que son capaces de autoescisión y replicación en plantas. Estos ARN pueden replicarse lo mismo solos (ARN viroides) o con un virus auxiliar (ARN satélites). Los ejemplos de ARN adecuados incluyen los derivados del viroide del veteado marrón rojizo del aguacate y ARN satélites derivados de virus de la mancha de anillo del tabaco, virus del veteado transitorio de la alfalfa, virus del moteado del tabaco suave, virus del moteado nodoso de flor del género *Solanum*, y virus del moteado del trébol subterráneo. Varias ribozimas específicas de ARN objetivo se conocen por los expertos en la técnica.

Como se describe en la presente descripción, la expresión de uno o más polipéptidos puede modularse por medios no transgénicos - tales como la creación de una o más mutaciones en uno o más genes, como se describe en la presente descripción. Los métodos que introducen una mutación de manera aleatoria en una secuencia génica pueden incluir mutagénesis química, mutagénesis 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, y lesiones locales inducidas por direccionamiento en genomas (TILLING), recombinación homóloga, mutagénesis dirigida por oligonucleótidos, y mutagénesis mediada por meganucleasas. En una modalidad, se usa TILLING. Esta es una tecnología de mutagénesis que puede usarse para generar y/o identificar polinucleótidos que codifican polipéptidos con expresión y/o actividad

modificadas. El método de TILLING permite, además, la selección de plantas que portan tales mutantes. El método de TILLING combina la mutagénesis de alta densidad con métodos de tamizaje de alta productividad. Los métodos para TILLING se conocen bien en la técnica (ver McCallum y otros., (2000) *Nat Biotechnol* 18: 455-457 y Stemple (2004) *Nat Rev Genet* 5(2): 145-50).

Algunos ejemplos no limitantes de mutaciones son deleciones, inserciones y mutaciones sin sentido de al menos un nucleótido, polimorfismos de un solo nucleótido y una repetición de una secuencia simple. Después de la mutación, el tamizaje puede realizarse para identificar mutaciones que crean codones de parada prematuros o genes no funcionales de cualquier otra manera. Después de la mutación, el tamizaje puede realizarse para identificar mutaciones que crean genes funcionales que son capaces de expresarse en niveles elevados. El tamizaje 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. Las mutaciones específicas en polinucleótidos pueden crearse, además, que puedan resultar en modulación de la expresión génica, modulación de la estabilidad de ARNm, o modulación de la estabilidad proteica. Tales plantas se refieren en la presente descripción como plantas "de origen no natural" o "mutantes". Típicamente, las plantas mutantes o de origen no natural incluirán al menos una porción de ácido nucleico foráneo o sintético o creado por el hombre (por ejemplo, ADN o ARN) que no estaba presente en la planta antes de manipularla. El ácido nucleico foráneo puede ser un solo nucleótido, dos o más nucleótidos, dos o más nucleótidos contiguos o dos o más nucleótidos no contiguos – tal como al menos 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1,000, 1,100, 1,200, 1,300, 1,400 o 1,500 o más nucleótidos contiguos o no contiguos.

Las plantas o células vegetales mutantes o de origen no natural pueden tener cualquier combinación de una o más mutaciones en uno o más genes lo que resulta en la modulación de los niveles de proteína. Por ejemplo, las plantas o células vegetales mutantes o de origen no natural pueden tener una sola mutación en un solo gen; múltiples mutaciones en un solo gen;

una sola mutación en dos o más o tres o más o cuatro o más genes; o múltiples mutaciones en dos o más o tres o cuatro o más genes. En la presente se describen ejemplos de tales mutaciones. A manera de ejemplo adicional, las plantas o células vegetales mutantes o de origen no natural pueden tener una o más mutaciones en una porción específica del (de los) gen(es) – tal como en una región del gen que codifica un sitio activo de la proteína o una porción de esta. A manera de ejemplo adicional, las plantas o células vegetales mutantes o de origen no natural pueden tener una o más mutaciones en una región fuera de uno o más genes – tal como en una región aguas arriba o aguas abajo del gen que regula siempre y cuando ellas modulen la actividad o expresión del (de los) gen(es). Los elementos corriente arriba pueden incluir promotores, potenciadores o factores de transcripción. Algunos elementos – tales como potenciadores – pueden ubicarse aguas arriba o aguas abajo del gen que regulan. El(los) elemento(s) no necesita(n) estar localizado(s) cerca del gen que regula ya que algunos elementos se han encontrado localizados varios cientos de miles de pares de bases aguas arriba o aguas abajo del gen que regulan. Las plantas o células vegetales mutantes o de origen no natural pueden tener una o más mutaciones localizadas dentro de los primeros 100 nucleótidos del (de los) gen(es), dentro de los primeros 200 nucleótidos del (de los) gen(es), dentro de los primeros 300 nucleótidos del (de los) gen(es), dentro de los primeros 400 nucleótidos del (de los) gen(es), dentro de los primeros 500 nucleótidos del (de los) gen(es), dentro de los primeros 600 nucleótidos del (de los) gen(es), dentro de los primeros 700 nucleótidos del (de los) gen(es), dentro de los primeros 800 nucleótidos del (de los) gen(es), dentro de los primeros 900 nucleótidos del (de los) gen(es), dentro de los primeros 1,000 nucleótidos del (de los) gen(es), dentro de los primeros 1,100 nucleótidos del (de los) gen(es), dentro de los primeros 1,200 nucleótidos del (de los) gen(es), dentro de los primeros 1,300 nucleótidos del (de los) gen(es), dentro de los primeros 1,400 nucleótidos del (de los) gen(es) o dentro de los primeros 1,500 nucleótidos del (de los) gen(es). Las plantas o células vegetales mutantes o de origen no natural pueden tener una o más mutaciones localizadas dentro del

primer, segundo, tercer, cuarto, quinto, sexto, séptimo, octavo, noveno, décimo, decimoprimer, decimosegundo, decimotercero, decimocuarto o decimoquinto conjunto de 100 nucleótidos del (de los) gen(es) o sus combinaciones. Se describen plantas o células vegetales mutantes o de origen no natural (por ejemplo, plantas o células vegetales mutantes, de origen no natural o transgénicas y similares, como se describe en la presente descripción) que comprenden las variantes de polipéptidos mutantes.

En una modalidad, se produce mutagénesis en semillas de plantas y después se cultivan para obtener plantas mutantes de la primera generación. Después, se deja que las plantas de la primera generación se autopolinicen y las semillas de la planta de la primera generación se cultivan para obtener plantas de la segunda generación, que después se analizan en busca de mutaciones en sus loci. Aunque el material vegetal con mutaciones puede analizarse en busca de mutaciones, una ventaja del análisis 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 con el objetivo de crear las plantas mutantes. Sin embargo, el tipo de material vegetal que se mutageniza 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; así estas plantas de la primera generación pueden analizarse después en busca de mutaciones en lugar de esperar hasta la segunda generación.

Los mutágenos que crean principalmente mutaciones puntuales y deleciones, inserciones, transversiones, y/o transiciones cortas, que incluyen mutágenos químicos o radiación, pueden usarse para crear las mutaciones. Los mutágenos incluyen, pero no se limitan a, metanosulfato de etilo, sulfato de metilmetano, N-etil-N-nitrosourea, trietilmelamina, N-metil-N-nitrosourea,

procarbazina, clorambucil, ciclofosfamida, sulfato de dietilo, monómero de acrilamida, melfalano, mostaza de nitrógeno, vincristina, dimetilnitrosamina, N-metil-N'-nitro-Nitrosoguanidina, nitrosoguanidina, 2-aminopurina, 7,12 dimetil-benz(a)antraceno, óxido de etileno, hexametilfosforamida, bisulfano, diepoxialcanos (diepoxioctano, diepoxibutano, y
5 similares), dihidrocloruro 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 haber sido causadas directamente por el mutágeno siempre y cuando resulten en el fenotipo deseado. Los agentes mutagénicos adecuados pueden incluir además, por ejemplo, radiación ionizante – tal
10 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 tamizaje de mutaciones.

El ácido nucleico preparado a partir de plantas individuales, células vegetales, o material vegetal opcionalmente puede mezclarse con el objetivo de un tamizaje expedito en busca de
15 mutaciones en la población de plantas que se origina del tejido, células o material vegetal mutagenizado. Pueden tamizarse 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 tamizaje usado.

Después que las muestras de ácidos nucleicos se mezclan opcionalmente, pueden someterse a
20 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 ácido nucleico mezclada opcionalmente. De manera adecuada, uno o más cebadores o sondas se diseñan para amplificar las regiones del locus donde es más
25 probable que surjan las mutaciones útiles. Con la máxima preferencia, el cebador se diseña para detectar mutaciones dentro de regiones del polinucleótido. Adicionalmente, se prefiere

que el(los) cebador(es) y sonda(s) eviten sitios polimórficos conocidos con el objetivo de facilitar el tamizaje 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 sonda(s) pueden diseñarse en base a las secuencias descritas en la presente descripción con el uso de métodos que se conocen bien en la técnica.

Para facilitar la detección de los productos de amplificación, el(los) cebador(es) o sonda(s) pueden marcarse con el uso de cualquier método de marcaje convencional. Estos pueden diseñarse en base a las secuencias descritas en la presente descripción con el uso de métodos que se conocen bien en la técnica. Los polimorfismos pueden identificarse por medios conocidos en la técnica y algunos se han descrito 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 polinucleótido funcional descrito 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 en condiciones efectivas para modular la actividad del (de los) polinucleótido(s) descrito(s) en la presente descripción. La al menos una célula vegetal mutante se propaga después en una planta mutante, donde la planta mutante tiene un nivel modulado del (de los) polipéptido(s) descrito(s) (o cualquiera de sus combinaciones como se describe en la presente descripción) 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 otra modalidad de este método, la etapa de tratamiento implica someter la al menos una célula a una fuente de radiación en condiciones efectivas para obtener al menos una célula vegetal mutante. El término "planta mutante" incluye plantas mutantes en las que el genotipo está modificado en

comparación con una planta control, adecuadamente por medios diferentes a la ingeniería genética o modificación genética.

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 conferir el rasgo a ellos. Así, 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 descritos 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 fitomejoramiento, retrocruzamiento e introgresión para producir líneas, variedades o híbridos que tienen una o más mutaciones en los genes descritos en la presente descripción. Las plantas que muestran un rasgo deseado pueden tamizarse de una mezcla de plantas mutantes. De manera adecuada, 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 tamizar en busca de un rasgo genético en comparación con un control. Tal enfoque de tamizaje puede implicar la aplicación de técnicas convencionales de amplificación y/o hibridación de ácidos nucleicos como se describe en la presente descripción. Así, un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un método para identificar una planta mutante que comprende las etapas de: (a) proporcionar una muestra que comprende ácido nucleico de una planta; y (b) determinar la secuencia de ácido nucleico del polinucleótido, en donde una diferencia en la secuencia del polinucleótido en comparación con la secuencia de polinucleótido

de una planta control es indicativo de que dicha planta es una planta mutante. En otro aspecto se proporciona un método para identificar una planta mutante que acumula niveles reducidos de nornicotina y/o al menos NNN en comparación con una planta control que comprende las etapas de: (a) proporcionar una muestra a partir de una planta a analizar; (b) determinar si
5 dicha muestra comprende una o más mutaciones en uno o más de los polinucleótidos descritos en la presente descripción; y (c) determinar al menos el contenido de nornicotina y/o NNN de dicha planta. De manera adecuada al menos el contenido de NNN se determina en las hojas verdes o en el humo.

En otro aspecto se proporciona un método para preparar una planta mutante que tiene niveles
10 reducidos de nornicotina y/o al menos NNN 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 una o más mutaciones en uno o más de los polinucleótidos descritos en la presente descripción que resultan en niveles reducidos de nornicotina y/o al menos NNN; y (c) transferir la una o más mutaciones a una segunda planta.

15 De manera adecuada al menos el contenido de NNN se determina en las hojas verdes o en el humo. La(s) mutación(es) puede(n) transferirse a la segunda planta con 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 primera planta es una planta de origen natural. En una modalidad, la segunda
20 planta tiene un fondo genético diferente a la primera planta.

En otro aspecto se proporciona un método para preparar una planta mutante que tiene niveles reducidos de nornicotina y/o al menos NNN 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 una o más mutaciones en uno o más de los
25 polinucleótidos descritos en la presente descripción que resultan en niveles reducidos de nornicotina y/o al menos NNN; y (c) introgresar la una o más mutaciones de la primera planta a

una segunda planta. De manera adecuada al menos el contenido de NNN se determina en las hojas verdes o en el humo. En una modalidad, la etapa de introgresión comprende el mejoramiento de plantas, opcionalmente que incluye el retrocruzamiento y similares. En una modalidad, la primera planta es una planta de origen natural. En una modalidad, la segunda

5 planta tiene un fondo genético diferente a la primera planta. En una modalidad, la primera planta no es un cultivar o un cultivar élite. En una modalidad, la segunda planta es un cultivar o un cultivar élite. Un aspecto adicional se refiere a una planta mutante (que incluye un cultivar o planta mutante de cultivar élite) obtenida o que puede obtenerse mediante los métodos descritos en la presente descripción. En ciertas modalidades, las “plantas mutantes” pueden

10 tener una o más mutaciones localizadas solo en una región específica de la planta – tal como dentro de la secuencia del uno o más polinucleótidos descritos 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.

En ciertas modalidades, las plantas mutantes pueden tener una o más mutaciones localizadas

15 en más de una región de la planta – tal como dentro de la secuencia de uno o más de los polinucleótidos descritos en la presente descripción y en una o más regiones adicionales del genoma. De conformidad con esta modalidad, la secuencia genómica restante de la planta mutante no será la misma o no será esencialmente la misma que la planta antes de la mutagénesis. En ciertas modalidades, las plantas mutantes pueden no tener una o más

20 mutaciones en uno o más, dos o más, tres o más, cuatro o más o cinco o más exones del (de los) polinucleótido(s) descrito(s) en la presente descripción; o pueden no tener una o más mutaciones en uno o más, dos o más, tres o más, cuatro o más o cinco o más intrones del (de los) polinucleótido(s) descrito(s) en la presente descripción; o pueden no tener una o más mutaciones en un promotor del (de los) polinucleótido(s) descrito(s) en la presente descripción;

25 o pueden no tener una o más mutaciones en la región no traducida de 3’ del (de los) polinucleótido(s) descrito(s) en la presente descripción; o pueden no tener una o más

mutaciones en la región no traducida de 5' del (de los) polinucleótido(s) descrito(s) en la presente descripción; o pueden no tener una o más mutaciones en la región codificante del (de los) polinucleótido(s) descrito(s) en la presente descripción; o pueden no tener una o más mutaciones en la región no codificante del (de los) polinucleótido(s) descrito(s) en la presente descripción; o cualquier combinación de dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más; o seis o más de estas partes de estas.

En un aspecto adicional se proporciona un método para identificar una planta, una célula vegetal o material vegetal que comprende una mutación en un gen que codifica un polinucleótido descrito en la presente descripción que comprende: (a) someter una planta, una célula vegetal o material vegetal a mutagénesis; (b) obtener una muestra de ácido nucleico a partir de dicha planta, célula vegetal o material vegetal o descendientes de estos; y (c) determinar la secuencia de ácido nucleico del gen que codifica un polinucleótido descrito en la presente descripción o una variante o un fragmento de este, en donde una diferencia en dicha secuencia es indicativo de una o más mutaciones en ella.

Las proteínas con dedos de zinc pueden usarse para modular la expresión o la actividad de uno o más de los polinucleótidos descritos en la presente descripción. En varias modalidades, una secuencia de ADN genómico que comprende una parte o toda la secuencia codificante del polinucleótido se modifica por mutagénesis mediada por nucleasas con dedos de zinc. En la secuencia de ADN genómico se busca un sitio único para la unión de proteínas con dedos de zinc. Alternativamente, en la secuencia de ADN genómico se buscan dos sitios únicos para la unión de proteínas con dedos de zinc en donde ambos sitios están en cadenas opuestas y muy juntos, por ejemplo, separados en 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más pares de bases. En consecuencia, se proporcionan las proteínas con dedos de zinc que se unen a los polinucleótidos.

Una proteína con dedos de zinc puede diseñarse para que reconozca un sitio objetivo seleccionado en un gen. Una proteína con dedos de zinc puede comprender cualquier combinación de motivos derivados de dominios con dedos de zinc de unión al ADN, naturales, y

dominios con dedos de zinc de unión al ADN, no naturales, mediante truncado o expansión o un proceso de mutagénesis dirigida a un sitio acoplado con un método de selección tal como, pero no se limitan a, selección por presentación en fagos, selección de dos híbridos en bacterias o selección de un híbrido en bacterias. El término “dominio con dedos de zinc de unión al ADN, no natural” se refiere a un dominio con dedos de zinc de unión al ADN que se une a una secuencia de tres pares de bases dentro del ácido nucleico objetivo y que no se produce en la célula u organismo que comprende el ácido nucleico que se modificará. En la técnica se conocen métodos para el diseño de proteínas con dedos de zinc que se unen a secuencias de nucleótidos específicas que son únicas para un gen objetivo.

- 10 Una nucleasa con dedos de zinc puede construirse al crear una fusión de un primer polinucleótido que codifica una proteína con dedos de zinc que se une a un polinucleótido, y un segundo polinucleótido que codifica una endonucleasa inespecífica tal como, pero no se limitan a, las endonucleasas de Tipo IIS. Una proteína de fusión entre una proteína con dedos de zinc y la nucleasa puede comprender un espaciador que consiste en dos pares de bases o
- 15 alternativamente, el espaciador puede consistir en tres, cuatro, cinco, seis, siete o más pares de bases. En varias modalidades, una nucleasa con dedos de zinc introduce una ruptura de la doble cadena en una región regulatoria, una región codificante, o una región no codificante de una secuencia de ADN genómico de un polinucleótido y conduce a una reducción del nivel de expresión de un polinucleótido, o una reducción en la actividad de la proteína codificada de esta
- 20 manera. La escisión por nucleasas con dedos de zinc frecuentemente resulta en la delección de ADN en el sitio de escisión después de la reparación del ADN por la unión de extremos no homólogos.

En otras modalidades, una proteína con dedos de zinc puede seleccionarse para unirse a una secuencia regulatoria de un polinucleótido. Más específicamente, la secuencia regulatoria

25 puede comprender un sitio de iniciación de la transcripción, un codón de iniciación, una región de un exón, un límite de un exón-intrón, un terminador, o un codón de parada. En

consecuencia, la invención proporciona una planta o células vegetales mutantes, de origen no natural o transgénicas, producidas por mutagénesis mediada por nucleasas con dedos de zinc en la cercanía de uno o más polinucleótidos descritos en la presente descripción, o dentro de ellos, y métodos para obtener dicha planta o célula vegetal por mutagénesis mediada por nucleasas con dedos de zinc. Los métodos para suministrar una proteína con dedos de zinc y una nucleasa con dedos de zinc a una planta de tabaco son similares a los descritos más abajo para el suministro de meganucleasa.

En otro aspecto, se describen métodos para producir plantas mutantes, de origen no natural o transgénicas o modificadas genéticamente de cualquier otra manera con el uso de meganucleasas, tales como I-Crel. Las meganucleasas de origen natural así como las meganucleasas recombinantes pueden usarse para provocar de manera específica una ruptura de la doble cadena en un solo sitio o en relativamente pocos sitios en el ADN genómico de una planta para permitir la interrupción de uno o más polinucleótidos descritos en la presente descripción. La meganucleasa puede ser una meganucleasa diseñada genéticamente con propiedades de reconocimiento al ADN alteradas. Las proteínas meganucleasas pueden suministrarse a las células vegetales mediante una variedad de mecanismos diferentes conocidos en la técnica.

La descripción abarca el uso de meganucleasas para inactivar uno o más polinucleótidos descritos en la presente descripción (o cualquiera de sus combinaciones como se describe en la presente descripción) en una célula vegetal o planta. Particularmente, la invención proporciona un método para inactivar un polinucleótido en una planta con el uso de una meganucleasa que comprende: a) proporcionar una célula vegetal que comprende un polinucleótido como se describe en la presente descripción; (b) introducir una meganucleasa o un constructo que codifica una meganucleasa en dicha célula vegetal; y (c) permitir que la meganucleasa inactive sustancialmente el o los polinucleótidos.

Las meganucleasas pueden usarse para escindir sitios de reconocimiento de meganucleasas dentro de las regiones codificantes de un polinucleótido. Tal escisión frecuentemente resulta en la delección de ADN en el sitio de reconocimiento de la meganucleasa después de la reparación mutagénica del ADN por unión de extremos no homólogos. Tales mutaciones en la secuencia codificante de genes típicamente son suficientes para inactivar el gen. Este método para modificar una célula vegetal implica, primero, el suministro de un casete de expresión de meganucleasa a una célula vegetal con el uso de un método de transformación adecuado. Para lograr la mayor eficacia, se prefiere unir el casete de expresión de la meganucleasa a un marcador seleccionable y seleccionar las células transformadas exitosamente en la presencia de un agente de selección. Este enfoque resultará en la integración del casete de expresión de meganucleasa en el genoma, sin embargo, podría no desearse si es probable que la planta requiera aprobación regulatoria. En tales casos, el casete de expresión de meganucleasa (y el gen marcador seleccionable unido) puede segregarse en posteriores generaciones de plantas con el uso de técnicas de mejoramiento convencionales. Alternativamente, las células vegetales pueden transformarse inicialmente con un casete de expresión de meganucleasa que carece de un marcador seleccionable y pueden cultivarse en medios que carecen de un agente de selección. Bajo tales condiciones, una fracción de las células tratadas adquirirá el casete de expresión de meganucleasa y expresará la meganucleasa diseñada genéticamente de manera transitoria sin integrar el casete de expresión de meganucleasa en el genoma. Debido a que esto no explica la eficacia de transformación, este último procedimiento de transformación requiere que se examine un mayor número de células tratadas para obtener la modificación deseada del genoma. El enfoque anterior puede aplicarse, además, para modificar una célula vegetal cuando se usa una proteína con dedos de zinc o nucleasa con dedos de zinc.

Después del suministro del casete de expresión de meganucleasa, las células vegetales se cultivan, inicialmente, bajo condiciones que son típicas para el procedimiento de transformación particular que se usó. Esto puede significar cultivar las células transformadas en los medios a

temperaturas por debajo de 26°C, frecuentemente en la oscuridad. Tales condiciones estándar pueden usarse durante un período de tiempo, preferentemente 1-4 días, para permitir que la célula vegetal se recupere del proceso de transformación. En cualquier punto después de este período de recuperación inicial, puede aumentarse la temperatura de cultivo para estimular la actividad de la meganucleasa diseñada genéticamente para escindir y mutar el sitio de reconocimiento de la meganucleasa.

Para ciertas aplicaciones, puede ser deseable eliminar de manera precisa el polinucleótido del genoma de la planta. Tales aplicaciones son posibles con el uso de un par de meganucleasas diseñadas genéticamente, cada una de las cuales escinde un sitio de reconocimiento de meganucleasa a cada lado de la delección deseada. Pueden usarse, además, las nucleasas efectoras TAL (TALEN) que son capaces de reconocer y unirse a un gen e introducir una ruptura de la doble cadena en el genoma. Así, en otro aspecto, se contemplan métodos para producir plantas mutantes, de origen no natural o transgénico o modificadas genéticamente de cualquier otra manera como se describe en la presente descripción con el uso de nucleasas efectoras TAL.

Las plantas adecuadas para el uso en ingeniería genética incluyen, pero sin limitarse a, plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas y sistemas de células vegetales, que incluyen especies de una de las siguientes familias: Acanthaceae, Alliaceae, Alstroemeriaceae, Amaryllidaceae, Apocynaceae, Arecaceae, Asteraceae, Berberidaceae, Bixaceae, Brassicaceae, Bromeliaceae, Cannabaceae, Caryophyllaceae, Cephalotaxaceae, Chenopodiaceae, Colchicaceae, Cucurbitaceae, Dioscoreaceae, Ephedraceae, Erythroxylaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Lamiaceae, Linaceae, Lycopodiaceae, Malvaceae, Melanthiaceae, Musaceae, Myrtaceae, Nyssaceae, Papaveraceae, Pinaceae, Plantaginaceae, Poaceae, Rosaceae, Rubiaceae, Salicaceae, Sapindaceae, Solanaceae, Taxaceae, Theaceae, o Vitaceae.

Las especies adecuadas pueden incluir miembros de los géneros *Abelmoschus*, *Abies*, *Acer*, *Agrostis*, *Allium*, *Alstroemeria*, *Ananas*, *Andrographis*, *Andropogon*, *Artemisia*, *Arundo*, *Atropa*,

Berberis, Beta, Bixa, Brassica, Calendula, Camellia, Camptotheca, Cannabis, Capsicum, Carthamus, Catharanthus, Cephalotaxus, Chrysanthemum, Cinchona, Citrullus, Coffea, Colchicum, Coleus, Cucumis, Cucurbita, Cynodon, Datura, Dianthus, Digitalis, Dioscorea, Elaeis, Ephedra, Erianthus, Erythroxylum, Eucalyptus, Festuca, Fragaria, Galanthus, Glycine, 5 Gossypium, Helianthus, Hevea, Hordeum, Hyoscyamus, Jatropha, Lactuca, Linum, Lolium, Lupinus, Lycopersicon, Lycopodium, Manihot, Medicago, Mentha, Miscanthus, Musa, Nicotiana, Oryza, Panicum, Papaver, Parthenium, Pennisetum, Petunia, Phalaris, Phleum, Pinus, Poa, Poinsettia, Populus, Rauwolfia, Ricinus, Rosa, Saccharum, Salix, Sanguinaria, Scopolia, Secale, Solanum, Sorghum, Spartina, Spinacea, Tanacetum, Taxus, Theobroma, Triticosecale, Triticum, 10 Uniola, Veratrum, Vinca, Vitis, y Zea.

Las especies adecuadas pueden incluir Panicum spp., Sorghum spp., Miscanthus spp., Saccharum spp., Erianthus spp., Populus spp., Andropogon gerardii (tallo azul grande), Pennisetum purpureum (espadaña), Phalaris arundinacea (hierba cinta), Cynodon dactylon (grama), Festuca arundinacea (festuca alta), Spartina pectinata (hierba cuerda de las praderas), 15 Medicago sativa (alfalfa), Arundo donax (cañabrava), Secale cereale (centeno), Salix spp. (sauce), Eucalyptus spp. (eucalipto), Triticosecale (híbrido de trigo y centeno triticales), bambú, Helianthus annuus (girasol), Carthamus tinctorius (alazor), Jatropha curcas (jatrofa), Ricinus communis (castor), Elaeis guineensis (palma), Linum usitatissimum (lino), Brassica juncea, Beta vulgaris (batabel), Manihot esculenta (mandioca), Lycopersicon esculentum (tomate), Lactuca 20 sativa (lechuga), Muscicla alca (banano), Solanum tuberosum (papa), Brassica oleracea (brócoli, coliflor, col de Bruselas), Camellia sinensis (té), Fragaria ananassa (fresa), Theobroma cacao (cacao), Coffe98ycliseca (café), Vitis vinifera (uva), Ananas comosus (piña), Capsicum annum (chile), Allium cepa (cebolla), Cucumis melo (melón), Cucumis sativus (pepino), Cucurbita maxima (calabacín), Cucurbita moschata (calabacín), Spinacea oleracea (espinaca), 25 Citrullus lanatus (sandía), Abelmoschus esculentus (quimbombó), Solanum melongena (berenjena), Rosa spp. (rosa), Dianthus caryophyllus (clavel), Petunia spp. (petunia), Poinsettia

- pulcherrima (flor de pascua), *Lupinus albus* (altramuz blanco), *Uniola paniculata* (avena),
 agróstide (*Agrostis* spp.), *Populus tremuloides* (álamo temblón), *Pinus* spp. (pino), *Abies* spp.
 (abeto), *Acer* spp. (arce), *Hordeum vulgare* (cebada), *Poa pratensis* (hierba verdiazul), *Lolium*
 spp. (césped inglés) y *Phleum pratense* (Timothy), *Panicum virgatum* (pasto varilla),
 5 *Sorghu99yclise99o* (sorgo, hierba del sudán), *Miscanthus giganteus* (miscanthus), *Saccharum*
 sp. (caña energética), *Populus balsamifera* (álamo), *Zea mays* (maíz), *Glycine max* (frijol de
 soya), *Brassica napus* (canola), *Triticum aestivum* (trigo), *Gossypium hirsutum* (algodón), *Oryza*
sativa (arroz), *Helianthus annuus* (girasol), *Medicago sativa* (alfalfa), *Beta vulgaris* (batabel), o
Pennisetum glaucum (mijo perlado).
- 10 Diversas modalidades están dirigidas a plantas o células vegetales de tabaco mutante, de
 tabaco de origen no natural o de tabaco transgénico, que se modifican para modular los niveles
 de expresión génica lo que produce de esta manera una planta o célula vegetal – tal como una
 planta o célula vegetal de tabaco – en la que el nivel de expresión de un polipéptido se modula
 dentro de los tejidos de interés en comparación con un control. Las composiciones y los
 15 métodos descritos pueden aplicarse a cualquier especie del género *Nicotiana*, que incluye *N.*
rustica y *N. tabacum* (por ejemplo, LA B21, LN KY171, TI 1406, Basma, Galpao, Perique,
 Beinhart 1,000-1, y Petico). Otra especies incluyen *N. acaulis*, *N. acuminata*, *N. africana*, *N.*
alata, *N. ameghinoi*, *N. amplexicaulis*, *N. arentsii*, *N. attenuata*, *N. azambujae*, *N.*
benavidesii, *N. benthamiana*, *N. bigelovii*, *N. bonariensis*, *N. cavicola*, *N. clevelandii*, *N.*
 20 *cordifolia*, *N. corymbosa*, *N. debneyi*, *N. excelsior*, *N. forgetiana*, *N. fragrans*, *N. glauca*, *N.*
glutinosa, *N. goodspeedii*, *N. gossei*, *N. hybrid*, *N. ingulba*, *N. kawakamii*, *N. knightiana*, *N.*
langsдорffii, *N. linearis*, *N. longiflora*, *N. maritima*, *N. megalosiphon*, *N. miersii*, *N. noctiflora*,
N. nudicaulis, *N. obtusifolia*, *N. occidentalis*, *N. occidentalis subsp. hesperis*, *N. otophora*, *N.*
paniculata, *N. pauciflora*, *N. petunioides*, *N. plumbaginifolia*, *N. quadrivalvis*, *N. raimondii*, *N.*
 25 *repanda*, *N. rosulata*, *N. rosulata subsp. ingulba*, *N. rotundifolia*, *N. setchellii*, *N. simulans*, *N.*
solanifolia, *N. spegazzinii*, *N. stocktonii*, *N. suaveolens*, *N. sylvestris*, *N. thyrsiflora*, *N.*

tomentosa, *N. tomentosiformis*, *N. trigonophylla*, *N. umbratica*, *N. undulata*, *N. velutina*, *N. wigandioides*, y *N. x sanderae*.

El uso de cultivares de tabaco y cultivares de tabaco élite se contemplan, además, en la presente descripción. La planta transgénica, de origen no natural o 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 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 al humo, y tipo Oriental. Los ejemplos no limitantes de variedades o cultivares son: BD 64, CC 101, CC 200, CC 27, CC 301, CC 400, CC 500, CC 600, CC 700, CC 800, CC 900, Coker 176, Coker 319, Coker 371 Gold, Coker 48, CD 263, DF911, DT 538 LC Galpao tobacco, 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, Little Crittenden, McNair 373, McNair 944, msKY 14xL8, Narrow Leaf Madole, Narrow Leaf 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 de 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, KY 8959, KY9, MD 609, PG01, PG04, PO1, PO2, PO3, RG11, RG8, 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 Comum, HB04P, Hicks Broadleaf, Kabakulak Ellassona, Kutsage E1, LA BU 21, NC 2326, NC 297, PVH 2110, Red Russian, Samsun, Saplak, Simmaba, Talgar 28, Wislica, Yayaldag, Prilep HC-72, Prilep P23, Prilep PB 156/1, Prilep P12-2/1, Yaka JK-48, Yaka JB 125/3, TI-1068, KDH-960, TI-1070, TW136, Basma, TKF 4028, L8, TKF 2002, GR141, Basma xanthi, GR149, GR153, Petit Havana.

10 Se contemplan, además, subvariedades de baja conversión de lo anterior, incluso si no se identifican específicamente en la presente descripción.

Las modalidades están dirigidas, además, a composiciones y métodos para producir plantas mutantes, plantas de origen no natural, plantas híbridas, o plantas transgénicas que se han modificado para modular la expresión o la actividad de un(os) polinucleótido(s) descrito(s) en la presente descripción (o cualquiera de sus combinaciones como se describe en la presente descripción). Ventajosamente, las plantas mutantes, plantas de origen no natural, plantas híbridas, o plantas transgénicas que se obtienen pueden ser similares o esencialmente las mismas en su apariencia global que las plantas controles. 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 internudos, y relación lámina-nervio central pueden evaluarse mediante observaciones de campo.

Un aspecto se refiere a una semilla de una planta mutante, una planta de origen no natural, una planta híbrida o una planta transgénica descritas en la presente descripción. Preferentemente, la semilla es una semilla de tabaco. Un aspecto adicional se refiere al polen o un óvulo de una planta mutante, una planta de origen no natural, una planta híbrida o una planta transgénica que se describe en la presente descripción. Adicionalmente, se proporciona una planta

mutante, una planta de origen no natural, una planta híbrida o una planta transgénica como se describe en la presente descripción, las que además comprenden un ácido nucleico que confiere esterilidad masculina.

Se proporciona además un cultivo de tejidos de células regenerables de la planta mutante,
5 planta de origen no natural, planta híbrida, o planta transgénica o una parte de estas como se describe en la presente descripción, cuyo cultivo regenera plantas capaces de expresar todas las características morfológicas y fisiológicas del parental. Las células regenerables incluyen pero no se limitan a células de hojas, polen, embriones, cotiledones, hipocótilos, raíces, extremos de raíces, anteras, flores y una parte de estas, óvulos, brotes, tallos, rabillos, médula y
10 cápsulas o callos o protoplastos derivados de ahí.

Aún un aspecto adicional, se refiere a un material vegetal curado – tal como hoja curada o tabaco curado - derivado o derivable de una planta o célula mutante, de origen no natural o transgénica, en donde la expresión de uno o más de los polinucleótidos descritos en la presente descripción o la actividad de la proteína codificada de esta manera se reduce y en donde la
15 conversión de nicotina a nor nicotina se reduce, lo que resulta en niveles reducidos de NNN.

De manera adecuada la apariencia visual de dicha planta (por ejemplo, de hojas) es esencialmente la misma que la de la planta control. De manera adecuada, la planta es una planta de tabaco.

Las modalidades se dirigen, además, a composiciones y métodos para producir plantas o
20 células vegetales mutantes, de origen no natural o transgénicas que se han modificado para modular la expresión o la actividad del uno o más de los polinucleótidos o polipéptidos descritos en la presente descripción lo que puede resultar en plantas o componentes de plantas (por ejemplo, hojas – tales como hojas verdes u hojas curadas - o tabaco) o células vegetales con modulación de los niveles de nor nicotina y/o al menos NNN.

25 Las plantas mutantes, de origen no natural o transgénicas que se obtienen de conformidad con los métodos descritos en la presente descripción pueden ser similares o esencialmente iguales

en cuanto a apariencia visual respecto a las plantas controles. En una modalidad, el peso de las hojas de la planta mutante, de origen no natural o transgénica es esencialmente el mismo que la planta control. En una modalidad, el número de hojas de la planta mutante, de origen no natural o transgénica 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, de origen no natural o transgénica son esencialmente los mismos que la planta control. En una modalidad, la altura del tallo de las plantas mutantes, de origen no natural o transgénicas es esencialmente la misma que la de las plantas controles a, por ejemplo, uno, dos o tres o más meses después del trasplante al campo o 10, 20, 30 o 36 o más días después del desmoche. Por ejemplo, la altura del rabillo de las plantas mutantes, de origen no natural o transgénicas no es menor que la altura del rabillo de las plantas controles. En otra modalidad, el contenido de clorofila de las plantas mutantes, de origen no natural o transgénicas es esencialmente el mismo que las plantas controles. En otra modalidad, la altura del rabillo de las plantas mutantes, de origen no natural o transgénicas es esencialmente la misma que las plantas controles y el contenido de clorofila de las plantas mutantes, de origen no natural o transgénicas es esencialmente el mismo que las plantas controles. En otras modalidades, el tamaño o forma o número o coloración de las hojas de las plantas mutantes, de origen no natural o transgénicas son esencialmente los mismos que las plantas controles. De manera adecuada, la planta es una planta de tabaco.

En otro aspecto, se proporciona un método para modular (*por ejemplo* reducir) la cantidad de nornicotina y/o NNN en al menos una parte de una planta (por ejemplo, las hojas – tales como las hojas curadas – o en tabaco), que comprende las etapas de: (i) modular (*por ejemplo* reducir) la expresión o actividad de uno o más de los polipéptidos descritos en la presente descripción (o cualquier combinación de estos como se describe en la presente descripción), de manera adecuada, en donde el o los polipéptidos están codificados por la correspondiente secuencia de polinucleótido descrita en la presente descripción; (ii) medir el contenido de nornicotina y/o NNN en al menos una parte (por ejemplo, las hojas – tales como las hojas

curadas – o tabaco o en el humo) de la planta mutante, de origen no natural o transgénica obtenida en la etapa (i); e (iii) identificar una planta mutante, de origen no natural o transgénica en la que el contenido de nornicotina y/o NNN en ella se ha modulado (*por ejemplo* reducido) en comparación con una planta control. De manera adecuada, la apariencia visual de dicha planta mutante, de origen no natural o transgénica es esencialmente la misma que la planta control. De manera adecuada, la planta es una planta de tabaco.

En otro aspecto, se proporciona un método para modular (*por ejemplo* reducir) la cantidad de nornicotina y/o NNN en al menos una parte del material vegetal curado – tal como la hoja curada - que comprende las etapas de: (i) modular (*por ejemplo* reducir) la expresión o actividad de uno o más de los polipéptidos (o cualquier combinación de estos como se describe en la presente descripción), de manera adecuada, en donde el o los polipéptidos están codificados por la correspondiente secuencia de polinucleótido descrita en la presente descripción; (ii) cosechar el material vegetal – tal como una o más de las hojas - y curarlo durante un período de tiempo; (iii) medir el contenido de nornicotina y/o NNN en al menos una parte del material vegetal curado obtenido en la etapa (ii); y (iv) identificar el material vegetal curado en donde el contenido de nornicotina y/o NNN en él se ha modulado (*por ejemplo* reducido) en comparación con una planta control.

Un aumento en la expresión en comparación con el control puede ser de aproximadamente 5 % a aproximadamente 100 %, o un aumento 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 % o más – tal como 200 % o 300 % o más, lo que incluye un aumento en la actividad transcripcional o expresión del polinucleótido o expresión del polipéptido o una combinación de estos.

Un aumento en la actividad en comparación con un control puede ser de aproximadamente 5 % a aproximadamente 100 %, o un aumento 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 % o más - tal como 200 % o 300 % o más.

Una reducción de 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 %
5 %, 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 de la actividad transcripcional o la expresión del polinucleótido o la expresión del polipéptido o una de sus combinaciones.

Una reducción de la actividad en comparación con un control puede ser de aproximadamente 5
10 % 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 constructos recombinantes descritos en la presente descripción pueden usarse para modular la expresión de las enzimas descritas en la presente descripción en una
15 especie vegetal de interés, de manera adecuada en tabaco.

Una serie de métodos basados en polinucleótidos pueden usarse para aumentar la expresión génica en plantas y células vegetales. A manera de ejemplo, puede prepararse un constructo, vector o vector de expresión que sea compatible con la planta a transformar, que comprende el gen de interés junto con un promotor aguas arriba que es capaz de sobreexpresar el gen en la
20 planta o célula vegetal. En la presente se describen promotores ilustrativos. Después de la transformación y cuando se cultiva bajo condiciones adecuadas, el promotor puede dirigir la expresión con el objetivo de modular (por ejemplo, reducir) los niveles de esta enzima en la planta, o en un tejido específico de estas. En una modalidad ilustrativa, se genera un vector que porta uno o más polinucleótidos descritos en la presente descripción (o cualquiera de sus
25 combinaciones como se describe en la presente descripción) para sobreexpresar el gen en una planta o célula vegetal. El vector porta un promotor adecuado – tal como el promotor del virus

del mosaico de la coliflor CaMV 35S - aguas arriba del transgén que conduce su expresión constitutiva en todos los tejidos de la planta. El vector porta, además, un gen de resistencia a antibióticos con el objetivo de conferir la selección de los callos y líneas transformados.

Por lo tanto, diversas modalidades se dirigen a métodos para modular (por ejemplo, reducir) el
5 nivel de expresión de uno o más polinucleótidos descritos en la presente descripción (o cualquier combinación de estos como se describe en la presente descripción) al integrar múltiples copias del polinucleótido en un genoma de planta; los métodos comprenden: transformar una célula vegetal huésped con un vector de expresión que comprende un promotor unido operativamente a uno o más polinucleótidos descritos en la presente
10 descripción. El polipéptido codificado por un polinucleótido recombinante puede ser un polipéptido nativo, o puede ser heterólogo a la célula.

Una planta de tabaco que porta un alelo mutante de uno o más polinucleótidos descritos en la presente descripción (o cualquier combinación de estos como se describe en la presente descripción) puede usarse en un programa de mejoramiento de plantas para crear líneas,
15 variedades e híbridos útiles. En particular, el alelo mutante es introgresado en las variedades comercialmente importantes descritas anteriormente. Así, se proporcionan métodos para el mejoramiento de plantas, que comprenden cruzar una planta mutante, una planta de origen no natural o una planta transgénica como se describe en la presente descripción con una planta que comprende una identidad genética diferente. El método puede comprender, además,
20 cruzar la planta de la progenie con otra planta, y opcionalmente repetir el cruzamiento hasta que se obtenga una progenie con los rasgos genéticos o fondo genético deseables. Un propósito ofrecido por tales métodos de mejoramiento es introducir un rasgo genético deseable en otras variedades, líneas de mejoramiento, híbridos o cultivares, particularmente los que son de interés comercial. Otro propósito es facilitar el apilamiento de modificaciones genéticas de
25 diferentes genes en una sola variedad de planta, líneas, híbridos o cultivares. Se contemplan apareamientos intraespecíficos así como interespecíficos. Las plantas de la progenie que

surgen de tales cruces, referidas además como líneas de mejoramiento, son ejemplos de plantas de origen no natural de la invención.

En una modalidad, se proporciona un método para producir una planta de tabaco de origen no natural que comprende: (a) cruzar una planta de tabaco mutante o transgénica con una
5 segunda planta de tabaco para producir la semilla de tabaco de la progenie; (b) cultivar la semilla de tabaco de la progenie, bajo las condiciones de cultivo de la planta, para producir la planta de tabaco de origen no natural. El método puede comprender además: (c) cruzar la generación anterior de la planta de tabaco de origen no natural con ella misma o con otra planta de tabaco para producir la semilla de tabaco de la progenie; (d) cultivar la semilla de tabaco de
10 la progenie de la etapa (c) bajo las condiciones de cultivo de la planta, para producir plantas de tabaco de origen no natural adicionales; y (e) repetir las etapas de cruzamiento y cultivo de (c) y (d) múltiples veces para generar generaciones adicionales de plantas de tabaco de origen no natural. Opcionalmente el método puede comprender antes de la etapa (a), una etapa de proporcionar una planta parental que comprende una identidad genética que está caracterizada
15 y que no es idéntica a la planta mutante o transgénica. En algunas modalidades, en dependencia del programa de mejoramiento, las etapas de cruzamiento y cultivo se repiten de 0 a 2 veces, de 0 a 3 veces, de 0 a 4 veces, 0 a 5 veces, de 0 a 6 veces, de 0 a 7 veces, de 0 a 8 veces, de 0 a 9 veces o de 0 a 10 veces, con el objetivo de generar generaciones de plantas de tabaco de origen no natural. El retrocruzamiento es un ejemplo de tal método en donde una
20 progenie se cruza con uno de sus parentales u otra planta genéticamente similar a su parental, con el objetivo de obtener una planta de la progenie en la próxima generación que tiene una identidad genética que está más cerca a la de uno de sus parentales. Las técnicas de mejoramiento de plantas, particularmente el mejoramiento de plantas de tabaco, se conocen bien y pueden usarse en los métodos de la invención. La invención proporciona adicionalmente
25 plantas de tabaco de origen no natural producidas por estos métodos. Ciertas modalidades excluyen la etapa de seleccionar una planta.

En algunas modalidades de los métodos descritos en la presente descripción, las líneas que resultan del mejoramiento y tamizaje en busca de genes variantes se evalúan en el campo con el uso de procedimientos de campo estándares. Los genotipos controles que incluyen el parental original sin mutaciones se incluyen y las entradas se disponen en el campo en un
5 diseño de bloque completo aleatorizado u otro diseño de campo apropiado. Para el tabaco, se usan prácticas agronómicas estándar, por ejemplo, el tabaco se cosecha, se pesa, y se toman muestras para pruebas químicas y otras pruebas comunes antes y durante el curado. El análisis estadístico de los datos se realiza para confirmar la similitud de las líneas seleccionadas con la línea parental. El análisis citogenético de las plantas seleccionadas se
10 realiza opcionalmente para confirmar las relaciones de complemento de los cromosomas y pareado de los cromosomas.

La huella genética, el polimorfismo de nucleótido único, los marcadores microsatélites, o tecnologías similares pueden usarse en un programa de mejoramiento por selección asistida por marcadores (MAS) para transferir o cruzar alelos mutantes de un gen para otros tabacos,
15 como se describe en la presente descripción. Por ejemplo, un genetista puede crear poblaciones segregantes a partir de hibridaciones de un genotipo que contiene un alelo mutante con un genotipo agronómicamente deseable. Las plantas en las generaciones F2 o de retrocruzamiento pueden tamizarse con el uso de un marcador desarrollado a partir de una secuencia genómica o un fragmento de esta, con el uso de una de las técnicas enumeradas en
20 la presente descripción. Las plantas identificadas por poseer el alelo mutante pueden retrocruzarse o autopolinizarse para crear una segunda población a tamizar. En dependencia del patrón de herencia esperado o la tecnología MAS usada, puede ser necesario autopolinizar las plantas seleccionadas antes de cada ciclo de retrocruzamiento para ayudar en la identificación de las plantas individuales deseadas. El retrocruzamiento u otro procedimiento de
25 mejoramiento pueden repetirse hasta que se recupere el fenotipo deseado del parental recurrente.

En un programa de mejoramiento, los cruces exitosos producen plantas F1 que son fértiles. Las plantas F1 seleccionadas pueden cruzarse con uno de los parentales, y las plantas de la primera generación del retrocruzamiento se autopolinizan para producir una población que se tamiza de nuevo en busca de una expresión génica variante (por ejemplo, la versión nula del gen). El proceso de retrocruzamiento, autopolinización, y tamizaje se repite, por ejemplo, al menos 4 veces hasta que el tamizaje final produce una planta que es fértil y razonablemente similar al parental recurrente. Esta planta, si se desea, se autopoliniza y la progenie se tamiza de nuevo posteriormente para confirmar que la planta exhibe una expresión génica variante. En algunas modalidades, una población de plantas en la generación F2 se tamiza para detectar expresión génica variante, por ejemplo, se identifica una planta que falla en expresar un polipéptido debido a la ausencia del gen de conformidad con métodos estándar, por ejemplo, mediante el uso de un método de PCR con cebadores basados en la información de la(s) secuencia(s) de nucleótido(s) para el(los) polinucleótido(s) descrito(s) en la presente descripción (o cualquiera de sus combinaciones como se describe en la presente descripción).

Las variedades de tabaco híbridas pueden producirse al evitar la autopolinización de plantas parentales femeninas (es decir, parentales de semillas) de una primera variedad, lo que permite que el polen de plantas parentales masculinas de una segunda variedad fecunden a las plantas parentales femeninas, y permite que se formen semillas híbridas F1 en las plantas femeninas. La autopolinización de plantas femeninas puede evitarse al emasculas las flores en una etapa temprana del desarrollo de las flores. Alternativamente, la formación de polen puede evitarse en las plantas parentales femeninas con el uso de una forma de esterilidad masculina. Por ejemplo, la esterilidad masculina puede producirse por esterilidad masculina citoplasmática (CMS), o esterilidad masculina transgénica en donde un transgén inhibe la microsporogénesis y/o la formación de polen, o autoincompatibilidad. Las plantas parentales femeninas que contienen CMS son particularmente útiles. En modalidades en que las plantas parentales femeninas son CMS, el polen se cosecha a partir de plantas fértiles masculinas y se aplica

manualmente a los estigmas de las plantas parentales femeninas CMS, y se cosecha la semilla F1 resultante.

Las variedades y líneas descritas en la presente pueden usarse para formar híbridos F1 de tabaco de un cruce simple. En tales modalidades, las plantas de las variedades parentales pueden cultivarse como poblaciones adyacentes esencialmente homogéneas para facilitar la polinización cruzada natural de las plantas parentales masculinas a las plantas parentales femeninas. La semilla F1 formada sobre las plantas parentales femeninas se cosecha selectivamente por medios convencionales. Además, las dos variedades de plantas parentales pueden cultivarse de manera masiva y cosecharse una mezcla de semillas híbridas F1 formadas en el parental femenino y la semilla formada en el parental masculino como el resultado de la autopolinización. Alternativamente, pueden llevarse a cabo cruces de tres vías en donde un híbrido F1 de un cruce simple se usa como un parental femenino y se cruza con un parental masculino diferente. Como otra alternativa, pueden crearse híbridos de cruces dobles en donde la progenie F1 de dos cruces simples diferentes se cruzan ellos mismos.

Una población de plantas mutantes, de origen no natural o transgénicas puede tamizarse 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 tamizarse en busca de las plantas que tienen un deseado nivel de expresión o actividad del (de los) polipéptido(s) codificados de esa 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 enzimáticos pueden usarse además para detectar la presencia o expresión o actividad de polipéptidos o polinucleótidos.

En la presente se describe que las células vegetales o plantas mutantes, de origen no natural o transgénicas comprenden uno o más polinucleótidos recombinantes, uno o más constructos de polinucleótidos, uno o más ARN de doble cadena, uno o más conjugados o uno o más vectores/vectores de expresión.

Sin limitación, las plantas descritas en la presente pueden modificarse para otros propósitos lo mismo antes que después que la expresión o actividad se ha modulado de conformidad con la presente invención. Una o más de las siguientes modificaciones genéticas pueden estar

presentes en las plantas mutantes, de origen no natural o transgénicas. En una modalidad, se modifican uno o más genes que están implicados en la conversión de intermediarios metabólicos del nitrógeno lo que resulta en plantas (tales como hojas) que cuando se curan, producen niveles menores de al menos una nitrosamina específica de tabaco en comparación con las plantas controles. Los ejemplos no limitantes de genes que pueden modificarse

incluyen, como se describe en la presente descripción, genes que codifican una nicotina desmetilasa, tales como *CYP82E4*, *CYP82E5* y *CYP82E10* las cuales participan 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 detalle. 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 controles o partes de estas sin la(s) modificación(es). Los ejemplos no limitantes incluyen genes en la familia de proteínas asociadas a la resistencia de múltiples fármacos, la familia de facilitadores de la difusión de cationes (CDF), la familia de proteínas similares a Zrt, Irt (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 casetes de unión al ATP (ABC) (por ejemplo, MRP, como se describe en el documento WO2012/028309, que participan en el transporte de metales pesados, tales como cadmio. El término metal pesado como se usa en la presente descripción incluye metales de transición. Los ejemplos de otras modificaciones incluyen la tolerancia a herbicidas, por ejemplo, el glifosato es un ingrediente activo de muchos herbicidas de amplio espectro. Las plantas transgénicas resistentes a glifosato se han desarrollado al transferir el gen *aroA* (una glifosato EPSP sintetasa de *Salmonella typhimurium* y *E. coli*). Las plantas resistentes a la sulfonilurea se han producido al transformar el gen de *ALS* (acetolactato sintetasa) mutante de *Arabidopsis*. La proteína OB del fotosistema II del híbrido *Amaranthus* mutante se ha transferido a plantas para producir plantas transgénicas resistentes a la atrazina; y se han producido plantas transgénicas resistentes a bromoxinilo al incorporar el 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 manera efectiva de retrasar la emergencia de pestes resistentes a Bt, como se ilustró recientemente en brócoli donde los genes de Bt *cry1Ac* y *cry1C* piramidales controlaron las polillas de dorso de diamante resistentes a cada proteína individual y retrasaron significativamente la evolución de insectos resistentes. Otra modificación ilustrativa resulta en plantas que son resistentes a enfermedades causadas por patógenos (por ejemplo, virus, bacterias, hongos). Se han diseñado plantas que expresan el gen *Xa21* (resistencia a tizón bacteriano) con plantas que expresan tanto un gen de fusión de Bt y un gen de quitinasa (resistencia al barrenador amarillo del tallo y tolerancia a la vaina). Otra modificación ilustrativa resulta en la capacidad reproductiva alterada, tal como la esterilidad masculina. Otra modificación ilustrativa resulta en plantas que son tolerantes a estrés abiótico (por ejemplo, sequía, temperatura, salinidad), y se han producido plantas transgénicas tolerantes al transferir la enzima de acil glicerol fosfato de *Arabidopsis*; los genes

que codifican manitol deshidrogenasa y sorbitol deshidrogenasa que están implicados en la síntesis de manitol y sorbitol mejoran la resistencia a la sequía. Otras modificaciones ilustrativas pueden resultar en plantas con mejores proteínas y aceites de almacenamiento, plantas con mejor eficacia fotosintética, plantas con prolongada durabilidad, plantas con mayor contenido de carbohidratos, y plantas resistentes a hongos; plantas que codifican una enzima implicada en la biosíntesis de alcaloides. Se contemplan, además, plantas transgénicas en las que se ha modulado 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 de tabaco mutantes, de origen no natural o transgénicas a partir de otro cultivar de tabaco o pueden transformarse directamente en ellas. La introgresión del (de los) rasgo(s) en las plantas de tabaco mutantes, de origen no natural o transgénicas de la invención puede lograrse mediante cualquier método de mejoramiento de plantas conocido en la técnica, por ejemplo, mejoramiento por genealogía, retrocruzamiento, mejoramiento por haploides dobles, y similares (ver, Wernsman, E. A, y Rufty, R. C. 1987. Capítulo Diecisiete. Tobacco. Páginas 669-698 En: *Cultivar Development. Crop Species*. Fehr (ed.), MacMillan Publishing Co, Inc., Nueva York, N.Y 761 págs.). Las técnicas basadas en biología molecular descritas 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 de tabaco que tienen al menos 90 %, preferentemente al menos 95 %, con mayor preferencia al menos 99 % de identidad genética con el parental recurrente, aún con mayor preferencia genéticamente idénticas al parental recurrente, y adicionalmente que comprenden el o los rasgos introgresados a partir del parental donante. Tal 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. Las plantas resultantes generalmente tienen esencialmente todas las características morfológicas y fisiológicas de las plantas de tabaco mutantes, de origen no natural o transgénicas de la invención, 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 pruebas 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.

Diversas modalidades proporcionan plantas mutantes, plantas de origen no natural o plantas transgénicas, así como biomasa en donde se modula el nivel de expresión de un polinucleótido (o cualquier combinación de estos como se describe en la presente descripción) para modular el contenido de nor nicotina y/o NNN en ellas.

Las partes de tales plantas, particularmente plantas de tabaco, y más particularmente la lámina y el nervio central de las hojas de plantas de tabaco, pueden incorporarse o usarse para producir 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 sin limitarse a composiciones de tabaco, tabacos, extracto de tabaco, tabaco cortado, relleno cortado, tabaco curado, tabaco expandido, tabaco homogeneizado, tabaco reconstituido, y tabacos para pipas. Los artículos de 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, puritos y cigarros. Los ejemplos de productos sin humo comprenden tabacos de mascar, y rapé. En ciertos dispositivos formadores de aerosol, en lugar de la combustión, una composición de tabaco u otro material formador de aerosol se

calienta mediante uno o más elementos de calentamiento eléctrico para producir un aerosol. 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 estar localizado dentro, cerca o aguas

5 abajo de la fuente de calor. Los productos de tabaco sin humo y los varios materiales formadores de aerosol que contienen tabaco pueden contener tabaco en cualquier forma, que incluye partículas secas, trizas, 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. Como se usa en la presente

10 descripción, el término ‘humo’ se usa para describir un tipo de aerosol que se produce por los artículos de 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, transgénicas y de origen no natural descritas en la presente descripción. Los procesos de curado de hojas verdes de tabaco se conocen por los expertos en la técnica e

15 incluyen sin limitación curado al aire, curado al fuego, curado al humo y curado al sol. El proceso de curado de hojas verdes de tabaco depende del tipo de tabaco cosechado. Por ejemplo, el tabaco Virginia de humo (brillante) se cura típicamente al humo, 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.

20 En otra modalidad, se describen productos de tabaco que incluyen materiales formadores de aerosol que contienen tabaco, que comprenden, material vegetal – tal como hojas, preferentemente hojas curadas - a partir de las plantas de tabaco mutantes, las plantas de tabaco transgénicas o las plantas de tabaco de origen no natural descritas en la presente descripción. Los productos de tabaco descritos en la presente descripción puede ser un

25 producto de tabaco mezclado que puede comprender, además, tabaco no modificado.

La cantidad de nornicotina en estos artículos fumables y productos sin humo y aerosoles de estos puede ser al menos aproximadamente 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, y 100 % menor – tal como aproximadamente 200 % o 300 % menor - cuando se compara con
5 productos consumibles derivados de las contrapartes no mutantes, de origen no natural o no transgénicas.

La cantidad de NNN en estos artículos fumables y productos sin humo y aerosoles de estos puede ser al menos aproximadamente 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, y 100
10 % menor – tal como aproximadamente 200 % o 300 % menor - cuando se compara con productos consumibles derivados de las contrapartes no mutantes, de origen no natural o no transgénicas.

La cantidad de nicotina en estos artículos fumables y productos sin humo y aerosoles de estos puede ser al menos aproximadamente 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, y 100
15 % menor – tal como aproximadamente 200 % o 300 % mayor - cuando se compara con productos consumibles derivados de las contrapartes no mutantes, de origen no natural o no transgénicas. La cantidad de nicotina en estos artículos fumables y productos sin humo y aerosoles de estos puede ser aproximadamente la misma en comparación con productos
20 consumibles derivados de contrapartes no mutantes, de origen no natural o no transgénicas.

La cantidad de TSNA totales en estos artículos fumables y productos sin humo y aerosoles de estos puede ser al menos aproximadamente 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, y 100 % menor – tal como aproximadamente 200 % o 300 % menor - cuando se compara con
25 productos consumibles derivados de contrapartes no mutantes, de origen no natural o no transgénicas.

Las plantas mutantes, de origen no natural o transgénicas pueden tener otros usos, por ejemplo, en la agricultura. Por ejemplo, las plantas mutantes, de origen no natural o transgénicas descritas en la presente descripción pueden usarse para producir alimentación animal y productos para la alimentación humana.

- 5 La invención proporciona, además, métodos para producir semillas, que comprenden cultivar la planta mutante, la planta de origen no natural, o la planta transgénica, descritas en la presente descripción, y recolectar las semillas de las plantas cultivadas. Las semillas de las plantas descritas 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
- 10 materiales de empaque tales como papel y tela se conocen bien en la técnica. Un empaque de semilla puede tener una identificación, por ejemplo, una etiqueta o marcador asegurado al material de empaque, un marcador impreso en el empaque que describe la naturaleza de las semillas en él.

- Las composiciones, métodos y kits para genotipar plantas para la identificación, selección, o
- 15 mejoramiento pueden comprender un medio para detectar la presencia de un polinucleótido (o cualquiera de sus combinaciones como se describe en la presente descripción) en una muestra de polinucleótido. En consecuencia, se describe que una composición 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
- 20 llevar a cabo la amplificación o detección.

- En consecuencia, se describen cebadores o sondas de oligonucleótidos específicos de genes que comprenden aproximadamente 10 o más polinucleótidos contiguos que corresponden al (a los) polinucleótido(s) descrito(s) en la presente descripción. Dichos cebadores o sondas pueden comprender o consistir en aproximadamente 15, 20, 25, 30, 40, 45 o 50 más
- 25 polinucleótidos contiguos que hibridan (por ejemplo, hibridan específicamente) con el o los polinucleótidos descritos en la presente descripción. En algunas modalidades, los cebadores o

sondas pueden comprender o consistir en aproximadamente 10 a 50 nucleótidos contiguos, aproximadamente 10 a 40 nucleótidos contiguos, aproximadamente 10 a 30 nucleótidos contiguos o aproximadamente 15 a 30 nucleótidos contiguos que pueden usarse en los métodos dependientes de secuencias para la identificación de genes (por ejemplo, hibridación Southern) o aislamiento (por ejemplo, hibridación *in situ* de colonias bacterianas o placas de bacteriófagos) o detección de genes (por ejemplo, como uno o más cebadores de amplificación en la amplificación o detección de ácidos nucleicos). El uno o más cebadores o sondas específicos pueden diseñarse y usarse para amplificar o detectar una parte o todo el(los) polinucleótido(s). A manera de ejemplo específico, pueden usarse dos cebadores en un protocolo de reacción en cadena de la polimerasa para amplificar un fragmento de ácido nucleico que codifica un ácido nucleico – tal como ADN o ARN. La reacción en cadena de la polimerasa puede realizarse, además, con el uso de un cebador que se deriva de una secuencia de ácido nucleico y un segundo cebador que hibrida con la secuencia aguas arriba o aguas abajo de la secuencia de ácido nucleico – tal como una secuencia promotora, el extremo 3' del ARNm precursor o una secuencia derivada de un vector. Ejemplos de técnicas térmicas e isotérmicas útiles para la amplificación de polinucleótidos *in vitro* se conocen bien en la técnica. La muestra puede ser o puede derivarse de una planta, una célula vegetal o material vegetal o un producto de tabaco fabricado o derivado de la planta, la célula vegetal o el material vegetal como se describe en la presente descripción.

En un aspecto adicional, se proporciona, además, un método para detectar un(os) polinucleótido(s) descrito(s) en la presente descripción (o cualquiera de sus combinaciones como se describe en la presente descripción) en una muestra que comprende la etapa de: (a) proporcionar una muestra que comprende, o se supone que comprende, un polinucleótido; (b) poner en contacto dicha muestra con uno de más cebadores o una o más sondas para detectar específicamente al menos una porción del (de los) polinucleótido(s); y (c) detectar la presencia de un producto de amplificación, en donde la presencia de un producto de amplificación es

indicativo de la presencia del (de los) polinucleótido(s) en la muestra. En un aspecto adicional, se proporciona además el uso de uno de más cebadores o sondas para detectar específicamente al menos una porción del (de los) polinucleótido(s). Se proporcionan, además, kits para detectar al menos una porción del (de los) polinucleótido(s), los cuales comprenden uno de más cebadores o sondas para detectar específicamente al menos una porción del (de los) polinucleótido(s). El kit puede comprender reactivos para la amplificación de polinucleótidos - tales como PCR - o reactivos para la tecnología de detección por hibridación de sondas - tales como membranas de Southern, membranas de Northern, hibridación in situ, o microarreglo. El kit puede comprender reactivos para la tecnología de detección por unión de anticuerpos tal como membrana de Western, ELISA, espectrometría de masas SELDI o tiras de pruebas. El kit puede comprender reactivos para la secuenciación de ADN. El kit puede comprender reactivos e instrucciones para determinar al menos el contenido de NNN y/o el contenido de nicotina y/o el contenido de TSNA total y/o de nornicotina. De manera adecuada, el kit comprende reactivos e instrucciones para determinar al menos el contenido de NNN y/o el contenido de nicotina y/o el contenido de TSNA total y/o el contenido de nornicotina en un material vegetal, un material vegetal curado u hojas curadas.

En algunas modalidades, un kit puede comprender instrucciones para uno o más de los métodos descritos. Los kits descritos pueden ser útiles para la determinación de la identidad genética, estudios filogenéticos, determinación del genotipo, determinación del haplotipo, análisis de la genealogía o mejoramiento de plantas particularmente con puntuación co-dominante.

La presente invención proporciona, además, un método para genotipar una planta, una célula vegetal o material vegetal que comprende un polinucleótido como se describe en la presente descripción. El genotipado proporciona un medio para distinguir homólogos de un par cromosómico y puede usarse para diferenciar segregantes en una población de plantas. Los métodos de marcadores moleculares pueden usarse para estudios filogenéticos,

caracterización de relaciones genéticas entre variedades de cultivo, identificación de cruces o híbridos somáticos, localización de segmentos cromosómicos que afectan rasgos monogénicos, clonación basada en mapas, y el estudio de herencia cuantitativa. El método específico de genotipado puede emplear cualquier número de técnicas analíticas de marcadores moleculares que incluyen polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP). Los AFLP son el producto de diferencias alélicas entre los fragmentos amplificados causadas por la variabilidad de secuencias de nucleótidos. Así, la presente invención proporciona adicionalmente un medio para seguir la segregación de uno o más genes o ácidos nucleicos así como secuencias cromosómicas genéticamente unidas a estos genes o ácidos nucleicos con el uso de tales técnicas como el análisis de AFLP.

En una modalidad, se proporciona además material vegetal curado a partir de las plantas mutantes, transgénicas y de origen no natural descritas en la presente descripción. Por ejemplo, los procesos de curado de hojas de tabaco se conocen por los expertos en el campo e incluyen sin limitarse al curado al aire, curado al fuego, curado al humo y curado al sol. El proceso de curado de hojas verdes de tabaco depende del tipo de tabaco cosechado. Por ejemplo, el tabaco Virginia de humo (brillante) se cura típicamente al humo, 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.

En otra modalidad, se describen productos de tabaco que incluyen productos de tabaco que comprenden material vegetal – tal como hojas, de manera adecuada material vegetal curado – tal como hojas curadas - a partir de las plantas mutantes, transgénicas y de origen no natural descritas en la presente descripción o que se producen mediante los métodos descritos en la presente descripción. Los productos de tabaco descritos en la presente descripción pueden comprender, además, tabaco no modificado.

En otra modalidad, se describen productos de tabaco que comprenden material vegetal, preferentemente hojas – tal como hojas curadas, a partir de plantas mutantes, transgénicas y

de origen no natural descritas en la presente descripción. Por ejemplo, el material vegetal puede añadirse al interior o exterior del producto de tabaco y así tras la quema se libera un aroma deseable. El producto de tabaco de conformidad con esta modalidad puede ser incluso un tabaco no modificado o un tabaco modificado. El producto de tabaco de conformidad con esta modalidad incluso puede derivarse de una planta mutante, transgénica o de origen no natural que tiene modificaciones en uno o más genes diferentes de los genes descritos 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, los que exponen un modo preferido contemplado actualmente para llevar a cabo la invención, tienen la intención de ilustrar y no de limitar la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Análisis de los niveles de expresión de la *NND3*

Para determinar la función de la *NND3* y su papel en la conversión de nicotina, se analiza la expresión de la *NND3*. Para este propósito, se cosechan diferentes tejidos de *N. tabacum* var. TN90 cultivada en invernadero y se analizan mediante PCR cuantitativa.

La extracción de ARN se realiza con el uso del Mini kit RNeasy (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras de ARN se diluyen en agua para obtener 1 µg de ARN en 10 µl de volumen final. Después, la digestión con DNasa se realiza con la DNasa libre de RNasa RQ1 (Promega). La reacción de la DNasa se detiene con el uso de la solución de parada de la DNasa RQ1 (Promega). Inmediatamente, la reacción de la transcriptasa inversa (RT) se realiza para convertir ARN en ADN complementario (ADNc). Para las reacciones de RT, se usó la transcriptasa inversa M-MLV, sin RNasa H, mutante puntual (Promega) en combinación con los cebadores oligo(dT)₁₅.

La PCR cuantitativa en tiempo real se realiza con el uso de Stratagene Mx3005P y el programa informático correspondiente. Para cada objetivo, diferentes pares de cebadores se diseñan de acuerdo con las directrices del manual del usuario Mx3005P. Los pares de cebadores se analizan para determinar la formación de dímeros de los cebadores y su rendimiento en una
5 corrida de qPCR. Su eficacia se analiza con el uso de una curva estándar con una dilución de cinco veces de ADNc. Los productos de PCR se secuencian para verificar que los cebadores amplifican específicamente su secuencia objetivo. Dado que los diferentes genes CYP82E tienen similitudes en la secuencia, el diseño de los cebadores es complejo y los cebadores elegidos no siempre muestran una eficacia óptima.

10 Las discrepancias en la eficacia significan que los valores de los experimentos de qPCR son específicos de los genes y no representan un valor absoluto de expresión. Por lo tanto, la comparación de los valores de expresión es válida para cada gen entre los diversos tejidos pero no entre genes. Los pares de cebadores empleados y su eficacia se enumeran en la Tabla 1. La mezcla ABsolute Blue QPCR SYBR Green low ROX (Thermo Scientific) se usa con
15 concentraciones de los cebadores de 300 nM. En una corrida de qPCR se emplea una temperatura de desnaturalización de 95 °C, inicialmente durante 15 minutos y después en cada ciclo durante 15 segundos, 15 segundos a 60 °C para la hibridación y 25 segundos a 72 °C para la elongación, durante 50 ciclos. Todas las muestras se corren por triplicado. Además, se emplean triplicados biológicos. La expresión del gen *actin9* (gen de normalización) se usa para
20 todas las muestras como normalizador.

Los resultados se muestran en la Figura 1 y confirman la expresión de CYP82E5 y CYP82E10 en las hojas verdes. Además estos genes tienen una alta expresión en todos los demás tejidos analizados. Ellos muestran un patrón de expresión muy similar. Mientras CYP82E4 y NND3 cada uno muestra expresión en las flores y las raíces, la NND3 no se expresa en niveles
25 detectables en las hojas mientras que CYP82E4 muestra expresión exclusivamente en las hojas senescentes. Para la verificación de la especificidad de los cebadores, los productos de

PCR se han purificado y secuenciado. La baja señal observada para la *NND3* en las raíces contenía productos mezclados de *NND3* y *CYP82E4* mientras que los productos a partir del material de las flores sólo contenían *NND3*.

Ejemplo 2

5 Demostración de que la *NND3* codifica para una nicotina desmetilasa funcional

Aunque la secuencia proteica predicha presenta un alto nivel de homología con las desmetilasas conocidas tales como *CYP82E4*, *CYP82E5* y *CYP82E10*, su función no puede deducirse a partir de la homología puesto que se ha mostrado en la familia del citocromo P450 que una diferencia de pocos aminoácidos es suficiente para cambiar o disminuir la especificidad
10 del sustrato.

La función de la *NND3* se confirma por la sobreexpresión en tabaco. Para este propósito, se diseñó un constructo de sobreexpresión con la secuencia codificante de *NND3* (sec. con núm. de ident.:1) para expresarse constitutivamente bajo el control del promotor de MMV en un fondo de una planta burley convertidor ultra bajo que carece de los genes *CYP82E4*, *CYP82E5* y
15 *CYP82E10*.

Se generaron veinte líneas transgénicas independientes. Los transformantes primarios (T_0) se transfirieron al suelo y las hojas de las plantas maduras se analizaron para determinar la expresión de la *NND3* con el uso de los cebadores *NND3_F6* y *NND3_R7* (Figura 2A) así como para determinar los niveles de nicotina y nornicotina (Figura 2B). Se analizaron cinco líneas de
20 control para las cuales la barra y error representan la media y la desviación estándar.

El análisis de expresión se realizó en tres réplicas técnicas. Las barras y errores indican la media y la desviación en las réplicas (calculados por el programa informático MxPro, Stratagene).

Los datos de expresión confirman que la *NND3* no se expresa en las hojas verdes de TN90 ya
25 que no se pudo detectar señal alguna. Por lo tanto los niveles de expresión de la *NND3* medidos en las diferentes plantas T_0 se expresaron con respecto a la planta *NND3#3* que se

eligió al azar. Una variación significativa se observa en la expresión de diferentes plantas. Este resultado se espera cuando se analiza la expresión del transgén en una población T_0 porque cada planta es el resultado de un evento de transformación independiente. Como consecuencia de ello los niveles de expresión pueden variar mucho de una planta a otra, en dependencia del número de copias del transgén o de la inserción adecuada del transgén.

Las mismas muestras de hojas se analizaron en una sola medición de nicotina y nornicotina.

El contenido de nicotina y nornicotina de las muestras se analizó por HILIC-UPLC-UV/MS. La nornicotina se cuantificó con detección por MS (pos. ESI; modo MRM; estándar interno: nornicotina-d4); para la nicotina se usó detección por UV a 260 nm. La conversión se calculó como $[\text{nornicotina}] / ([\text{nornicotina}] + [\text{nicotina}]) \times 100$.

Seis de las líneas transgénicas que mostraron la mayor expresión de *NND3* (#10, #3, #16, #15, #17, y #20) exhibieron una elevada conversión de nicotina. La conversión de nicotina es 0.5 % en plantas TN90 *cyp82e4/cyp82e5/cyp82e10*, y aumenta hasta cuatro veces en líneas con alta expresión de *MMV:NND3*. Consistentemente un bajo nivel de conversión indistinguible del nivel de la planta control se observa en las plantas que muestran la expresión más baja del transgén. Estos datos demuestran claramente que el gen *NND3* identificado recientemente codifica una nicotina N-desmetilasa funcional.

TABLA 1

Cebadores usados para el análisis de expresión de la *NND3* y los genes *CYP82E* funcionales relacionados.

Nombre del cebador	Gen objetivo	Secuencia (5'-3')	Eficacia (%)
NND3_F1	<i>NND3</i>	TTGATCCAGGGTTTCAATTACAGC	102.7
NND3_R2	<i>NND3</i>	AACGTACCAAATTAGAAAAACGTGTACC	
E4_F1	<i>CYP82E4</i>	TTTTCAGAATTGGTTAGAGGAACATATTAAT	80.7

E4_R1	<i>CYP82E4</i>	TGTGTCTATCTCTTCTTGCTTTTCG	
E5_F1	<i>CYP82E5</i>	AGAGATTCTTCGCTGATGATATTGACTAC	101.3
E5_R1	<i>CYP82E5</i>	CCGTAATTGTCACTTCTACAGGATTTACT	
E10_F2	<i>CYP82E10</i>	GCTGATATTGACTTTTCGTGGTCAA	87.3
E10_R2	<i>CYP82E10</i>	GCGAGGCGTAATTACCACTTCTAT	
PQ0014_F	<i>Actin9</i>	CTATTCTCCGCTTTGGACTTGGCA	
PQ0014_R	<i>Actin9</i>	AGGACCTCAGGACAACGGAAACG	
NND3_F6	<i>NND3</i>	AATTTTGGTCTCATCGTGAAGATGATA	
NND3_R7	<i>NND3</i>	TCACTCTCTTCTACCCATCTATCCTTG	

Ejemplo 3

Demostración de que el silenciamiento de la *NND3* conduce a una reducción de la conversión de nicotina

- 5 Se diseña un constructo de silenciamiento que se expresa constitutivamente bajo el control del promotor de MMV en un fondo de una planta burley convertidor ultra bajo que carece de los genes *CYP82E4*, *CYP82E5* y *CYP82E10* funcionales. Para el constructo de silenciamiento, se usa una secuencia de 100 pb en dirección directa e inversa, separada por una secuencia intrónica (sec. con núm. de ident.: 4). Los resultados indican que el silenciamiento de la *NND3*
- 10 en las flores conduce a la reducción de la conversión de nicotina lo que demuestra que la enzima *NND3* no solo es funcional, sino que además contribuye a la conversión de nicotina en la planta.

Ejemplo 4

Niveles de expresión relativa de la *NND3* en hojas de *N. tabacum* var. Stella en diferentes

15 puntos de tiempo de curado

Los niveles de expresión relativa de la *NND3* y los genes *CYP82E* funcionales relacionados en hojas de *N. tabacum* var. Stella se analizan en diferentes puntos de tiempo de curado. Las

muestras se toman en hojas “verdes” (posición superior del tallo) y en hojas “maduras” (posición inferior del tallo) en el tiempo de cosecha. Las hojas se transportan a un granero de curado al aire y se toma una muestra cuando inicia el curado (“0 h”) y otra vez después de 12 horas (“12 h”), 24 horas (“24 h”) y 48 horas (“48 h”). Las muestras se toman a partir de mezclas de varias
5 hojas. Se analizan dos mezclas como réplicas biológicas - réplica 1 (Figura 3a) y 2 (Figura 3b). Los resultados se muestran en la Figura 3. Las barras indican la media $\pm$ SD de tres réplicas técnicas. Los niveles de expresión de los diferentes genes *CYP82E* sólo pueden considerarse independientemente y no por comparación directa debido a las diferentes eficacias de la PCR. *CYP82E5* y *CYP82E10* se expresan en un grado similar en todas las muestras de hojas. La
10 expresión de *CYP82E4* se activa en las hojas senescentes y aumenta en las condiciones de curado. La *NND3* no se expresa en las hojas en todas las condiciones analizadas.

Cualquier publicación citada o descrita en la presente descripción proporciona información relevante descrita 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
15 tienen derecho a anteceder tales descripciones. Todas las publicaciones mencionadas en la especificación anterior se incorporan en la presente descripción como referencia. Diversas modificaciones y variaciones de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica sin apartarse del alcance y espíritu de la invención. Aunque la invención se ha descrito en relación con modalidades preferidas específicas, debe entenderse que la invención como se reivindica
20 no debe limitarse indebidamente a tales modalidades específicas. De hecho, diversas modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención que son obvias para los expertos en biología celular, molecular y de plantas o campos relacionados se pretende que estén dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.