

REDUCCIÓN DE NITROSAMINAS ESPECÍFICAS DEL TABACO MEDIANTE LA ALTERACIÓN DE LA VÍA DE ASIMILACIÓN DE NITRATO

Campo de la invención

La presente invención se refiere a plantas de tabaco modificadas con niveles reducidos de nitrato, productos de tabaco generados a partir de las plantas de tabaco modificadas con nitrosaminas específicas del tabaco (TSNA) reducidas y métodos para reducir TSNA en productos de tabaco mediante la alteración de la expresión de genes de la vía de asimilación de nitrato.

Antecedentes de la invención

Las plantas comerciales de tabaco, como tabaco Burley, acumulan altos niveles de nitrato libre en sus hojas, lo que es indeseable debido a que los altos niveles de nitrato se han asociado con la formación de compuestos carcinógenos denominados nitrosaminas específicas del tabaco (TSNA). Las TSNA son una clase de compuestos producidos predominantemente durante el curado de las hojas de tabaco, pese a que la formación adicional puede ocurrir en el posterior procesamiento y almacenamiento de la hoja y posiblemente mediante pirosíntesis durante la combustión. Dos de las TSNA que se encuentran en la hoja curada, *N*-nitrosonornicotina (NNN) y 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK), se clasifican como carcinógenos de Grupo I (la máxima designación) por la International Agency for Research on Cancer [agencia internacional de investigación sobre el cáncer]. Debido al volumen de pruebas que implican a estos compuestos con varios cánceres asociados con el tabaco, la Organización Mundial de la Salud y otros expertos en el campo han recomendado implementar mandatos para asegurar que los

futuros productos de tabaco tengan niveles reducidos de estos tóxicos. Las TSNA representan productos nitrosantes de alcaloides de tabaco. En los tabacos curados al aire hay un consenso general de que el nitrito es el agente directamente responsable de la formación de TSNA. Debido a su toxicidad celular, sin embargo, los niveles de nitrito endógeno son típicamente muy bajos en tejidos vegetales. Por el contrario, se cree que la gran mayoría del nitrito implicado en la formación de TSNA proviene de la actividad de nitrato reductasa (NR) de microbios que residen en la superficie de la hoja durante el proceso de curado de 6 - 10 semanas que convierte una porción de los grupos de nitrato de la hoja en nitrito a medida que las membranas y organelos celulares se degradan durante este período.

Las TSNA se forman principalmente durante el proceso de curado de las hojas e implica la nitrosación de alcaloides de tabaco. Las estrategias genéticas para reducir el contenido y los niveles de TSNA en la hoja curada se han enfocado en el direccionamiento de: (1) uno o más precursores de alcaloides o (2) uno o más agentes nitrosantes implicados. La mayoría de los esfuerzos por reducir TSNA a nivel de alterar la genética del tabaco ha dirigido los precursores de alcaloides a las TSNA. Estas estrategias proporcionan reducciones sustanciales en NNN a través de la reducción por disminución de la familia de genes responsable de la síntesis de su precursor de alcaloide nornicotina. Sin embargo, estas estrategias no reducen todos los niveles de TSNA encontrados en los productos de tabaco. Por consiguiente, sigue existiendo una gran necesidad de reducir todos los niveles de TSNA en un producto de tabaco.

Compendio de la invención

La presente invención se refiere, en un aspecto, a un producto de tabaco con niveles reducidos de nitrosamina específica del tabaco (TSNA) que se genera a partir de una planta

de tabaco, dicha planta de tabaco se modifica para comprender: (i) un polinucleótido que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que codifica una enzima nitrato reductasa desregulada; (ii) un polipéptido codificado por el polinucleótido establecido en (i); (iii) un polipéptido que comprende, consiste o consiste esencialmente en una enzima nitrato reductasa desregulada o (iv) una construcción, vector o vector de expresión que comprende el polinucleótido establecido en (i), donde la expresión o actividad de dicha nitrato reductasa está desregulada en comparación con una planta de tabaco no modificada de control y donde la enzima nitrato reductasa desregulada comprende (a) un polipéptido de nitrato reductasa que comprende una sustitución de aminoácidos en una posición que corresponde a la posición 523 de la sec. con núm. de ident.: 4; o (b) un polipéptido de nitrato reductasa que comprende una sustitución de aminoácidos en una posición que corresponde a la posición 523 de la sec. con núm. de ident.: 4, donde el aminoácido en la posición 523 de la sec. con núm. de ident.: 4 se sustituye por un ácido aspártico. La enzima nitrato reductasa desregulada puede ser una enzima nitrato reductasa que es constitutivamente activa. La planta de tabaco puede ser de la especie *Nicotiana tabacum*, p. ej., el producto de tabaco puede comprender un material de planta de una planta de tabaco de la especie *Nicotiana tabacum*. El polinucleótido que codifica una nitrato reductasa desregulada puede ser un polinucleótido heterólogo que codifica un polipéptido de nitrato reductasa modificado. El polinucleótido heterólogo puede unirse a un promotor que no está asociado de manera natural con un gen de nitrato reductasa endógeno. El promotor puede ser el promotor del virus del mosaico del coliflor 35S. El polinucleótido que codifica una nitrato reductasa desregulada puede comprender una secuencia de polinucleótidos de la sec. con núm. de ident.: 5. El polinucleótido que codifica una nitrato reductasa desregulada puede codificar un gen de nitrato reductasa endógeno que se modificó por un sistema de edición de genomas o por un mutagén. El sistema de edición de

genomas puede comprender un sistema basado en CRISPR/Cas diseñado, una nucleasa efectora similar al activador de la transcripción diseñada, una nucleasa de dedos de zinc diseñada o una meganucleasa diseñada. El tabaco puede ser un tabaco Burley. El producto de tabaco puede tener niveles reducidos de nitrosamina específica del tabaco (TSNA) en comparación con un producto de tabaco derivado de una planta de tabaco de control en la que la enzima nitrato reductasa no se desreguló. El nivel de TSNA total se puede medir en una hoja de la planta de tabaco, donde (a) la hoja es recién cosechada; (b) la hoja es curada, almacenada o procesada o (c) la hoja es curada al aire. El nivel de al menos una TSNA en el producto de tabaco puede ser menor en comparación con un nivel de control para al menos una TSNA, donde al menos una TSNA se selecciona del grupo que consiste en N-nitrosornicotina (NNN), 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK), N-nitrosoanabasina (NAB), N-nitrosoanatabina (NAT) y combinaciones de estas. Los niveles totales de TSNA se pueden reducir en al menos 50%. Los niveles de TSNA se pueden medir en el humo obtenido de la combustión de hojas de la planta de tabaco. Los niveles totales de TSNA en humo se pueden reducir en al menos 70%. El nivel de NNN se puede reducir en aproximadamente 90%. El nivel de NNK se puede reducir en aproximadamente 66%. El nivel de NAB se puede reducir en aproximadamente 92%. El nivel de NAT se puede reducir en aproximadamente 88%. La planta de tabaco también puede comprender un gen de la vía de nor nicotina modificado. El gen de la vía de nor nicotina modificado puede comprender un gen de nicotina desmetilasa modificado o un gen citocromo P450. La planta de tabaco puede comprender un gen CYP82E4 modificado o un gen CYP82E10 modificado. El gen CYP82E4 modificado o el gen CYP82E10 modificado se puede inactivar.

Descripción de la invención

La presente invención se refiere, en un aspecto, a un método para producir un producto de tabaco donde los niveles de TSNA medidos en el humo obtenido de la combustión de hojas de una planta de tabaco modificada se reducen en comparación con los niveles de TSNA medidos en el humo obtenido de la combustión de una planta de tabaco no modificada. El método comprende (a) modificar una planta de tabaco para que comprenda: (i) un polinucleótido que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que codifica una enzima nitrato reductasa desregulada; (ii) un polipéptido codificado por el polinucleótido establecido en (i); (iii) un polipéptido que comprende, consiste o consiste esencialmente en una enzima nitrato reductasa desregulada o (iv) una construcción, vector o vector de expresión que comprende el polinucleótido establecido en (i), donde la expresión o actividad de dicha nitrato reductasa está desregulada en comparación con una planta de tabaco no modificada de control y donde la enzima nitrato reductasa desregulada comprende (I) un polipéptido de nitrato reductasa que comprende una sustitución de aminoácidos en una posición que corresponde a la posición 523 de la sec. con núm. de ident.: 4; o (II) un polipéptido de nitrato reductasa que comprende una sustitución de aminoácidos en una posición que corresponde a la posición 523 de la sec. con núm. de ident.: 4, donde el aminoácido en la posición 523 de la sec. con núm. de ident.: 4 se sustituye en un ácido aspártico; (b) cosechar hojas de tabaco de dicha planta de tabaco modificada y (c) producir un producto de tabaco a partir de las hojas cosechadas.

En otro aspecto, en la presente también se describe un producto de tabaco con niveles reducidos de nitrosamina específica del tabaco (TSNA) que se genera a partir de una planta de tabaco, dicha planta de tabaco se modifica para comprender: (i) un polinucleótido que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que codifica una enzima nitrato reductasa desregulada; (ii) un polipéptido codificado por el polinucleótido establecido en (i); (iii) un polipéptido que comprende, consiste o consiste esencialmente en una enzima

nitrato reductasa desregulada o (iv) una construcción, vector o vector de expresión que comprende el polinucleótido establecido en (i), donde la expresión o actividad de dicha nitrato reductasa es desregulada en comparación con una planta de tabaco no modificada de control y donde la enzima nitrato reductasa desregulada comprende (a) un polipéptido de nitrato reductasa truncado que comprende una truncación en el extremo N o (c) un polipéptido de nitrato reductasa que comprende una truncación en el extremo N de 56 aminoácidos.

En otro aspecto, en la presente también se describe un método para producir un producto de tabaco donde los niveles de TSNA medidos en el humo obtenido de la combustión de hojas de una planta de tabaco modificada se reducen en comparación con los niveles de TSNA medidos en el humo obtenido de la combustión de una planta de tabaco no modificada, el método comprende (a) modificar una planta de tabaco para que comprenda: (i) un polinucleótido que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que codifica una enzima nitrato reductasa desregulada; (ii) un polipéptido codificado por el polinucleótido establecido en (i); (iii) un polipéptido que comprende, consiste o consiste esencialmente en una enzima nitrato reductasa desregulada o (iv) una construcción, vector o vector de expresión que comprende el polinucleótido establecido en (i), donde la expresión o actividad de dicha nitrato reductasa está desregulada en comparación con una planta de tabaco no modificada de control y donde la enzima nitrato reductasa desregulada comprende (I) un polipéptido de nitrato reductasa truncado; (II) un polipéptido de nitrato reductasa que comprende una truncación en el extremo N o (III) un polipéptido de nitrato reductasa que comprende una truncación en el extremo N de 56 aminoácidos; (b) cosechar hojas de tabaco de dicha planta de tabaco modificada y (c) producir un producto de tabaco de las hojas cosechadas.

El polinucleótido que codifica una nitrato reductasa desregulada puede comprender una secuencia de polinucleótidos de sec. con núm. de ident.: 7.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra un esquema de la vía de asimilación de nitrógeno en plantas mayores.

5 En la vía de asimilación de N principal, el nitrato (NO_3^-) se convierte en nitrito (NO_2^-), luego posteriormente en amonio (NH_4^+) y glutamina, donde las principales enzimas implicadas en estas reacciones son nitrato y nitrito reductasa (NR y NiR, respectivamente), glutamina sintetasa (GS) y glutamato sintasa (GOGAT). AMT, transportadores de amonio; AS, asparagina sintetasa; GDH, deshidrogenasa de glutamato dependiente de NADH; ICDH, 10 deshidrogenasa isocitrato dependiente de NADP; NRT, transportadores de nitrato; TCA, ciclo de ácido tricarboxílico.

La Figura 2 muestra una alineación de la región que contiene la posición 523 de las secuencias de aminoácidos de nitrato reductasa de varias especies de plantas.

Las Figuras 3A y 3B muestran mapas de construcción de las construcciones 35S:GS1, 15 35S:ICDH, 35S:GOGAT, E4:GOGAT, 35S:tr-NR, E4:tr-NR, 35S:S523D-NR, y E4:S523D-NR.

La Figura 4 muestra los pesos frescos de plantas de tipo salvaje (WT) y líneas transgénicas 35S:tr-NR, 35S:S523D-NR, 35S:GS1, 35S:GOGAT y 35S:ICDH cultivadas en tres niveles de fertilización con nitrato (N).

20 Las Figuras 5A-5C muestran los contenidos de clorofila a (Ca, FIG. 5A), clorofila b (Cb, FIG. 5B) y clorofila a+b (Ca + b, FIG. 5C) de plantas WT y líneas transgénicas 35S:tr-NR, 35S:S523D-NR, 35S:GS1, 35S:GOGAT y 35S:ICDH cultivadas en tres niveles de fertilización con N.

Las Figuras 6A y 6B muestran el contenido total de nitrato en hojas de plantas WT y líneas transgénicas 35S:tr-NR, 35S:S523D-NR, 35S:GS1, 35S:GOGAT y 35S:ICDH cultivadas en tres niveles de fertilización con N.

La Figura 7 muestra el contenido promedio de amoníaco en hojas de plantas WT y líneas transgénicas 35S:tr-NR, 35S:S523D-NR, 35S:GS1, 35S:GOGAT y 35S:ICDH cultivadas en tres niveles de fertilización con N.

La Figura 8 muestra el contenido total de aminoácido libre en hojas de 35S:GOGAT, 35S:ICDH, 35S:tr-NR, 35S:S523D-NR, 35S:GS1 y plantas WT cultivadas en fertilización con N medio (8 mM) y alto (19 mM).

Las Figuras 9A-9D muestran el contenido de arginina (Arg) (Figura 9A), glutamina (Gln) (Figura 9B), asparagina (Asn) (Figura 9C) y glutamato (Glu) (Figura 9D) en hojas de tabaco de plantas WT y líneas transgénicas 35S:tr-NR, 35S:S523D-NR, 35S:GS1, 35S:GOGAT y 35S:ICDH cultivadas en fertilización con N medio (8 mM) y alto (19 mM).

La Figura 10 muestra el contenido promedio de nitrato y nicotina en picadura de tabaco derivada de la lámina de genotipos WT y 35S:S523D-NR.

Las Figuras 11A-11E muestran el contenido promedio de NAB (Figura 11A), NAT (Figura 11B), NNK (Figura 11C), NNN (Figura 11D) y TSNA totales (Figura 11E) en la picadura y el humo de cigarrillos hechos a partir de la lámina de hojas WT y 35S:S523D-NR.

La Figura 12 muestra la concentración de nitrato y los niveles de transcripción de NR relativos en hojas de tabaco tratadas con etefón que contienen construcciones S523D-NR bajo el control de transcripción del promotor de CaMV 35S y/o el promotor inducible por etefón *CYP82E4* (E4).

La Figura 13 muestra el contenido de alcaloide total (TA % DW) en líneas transgénicas 35S:S523D-NR y 35S:S523D-NR/E4:S523D-NR, GH3-1, GH8-1 y GH8-5, respectivamente.

La Figura 14 muestra el contenido de nitrato (NO₃ % DW) en tres líneas transgénicas 35S:S523D-NR y 35S:S523D-NR/E4:S523D-NR, GH3-1, GH8-1 y GH8-5, respectivamente.

La Figura 15 muestra el contenido de TSNA (NNN, NNK, NAT y NAB, ng/g) en la picadura de tres líneas transgénicas 35S:S523D-NR y 35S:S523D-NR/E4:S523D-NR, GH3-1, GH8-1 y GH8-5, respectivamente.

La Figura 16 muestra el contenido de TSNA (NNN, NNK, NAT y NAB, ng/g) en el humo de cigarrillos hechos con la picadura de tres líneas transgénicas 35S:S523D-NR y 35S:S523D-NR/E4:S523D-NR, GH3-1, GH8-1 y GH8-5, respectivamente.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere, en un aspecto, a una estrategia novedosa para reducir los niveles de nitrato libre en las hojas de plantas de tabaco modificadas mediante la alteración de la vía de asimilación de nitrato, reduciendo así los niveles de todas las TSNA en las hojas curadas de la planta de tabaco modificada. Los niveles de nitrato libre y el contenido y los niveles de TSNA, incluyendo TSNA totales y/o TSNA específicas de las hojas de tabaco, se redujeron usando nitrato reductasas desreguladas. Al dirigirse al agente nitrosante y reducir la cantidad de nitrato libre almacenada en la hoja, la producción de TSNA carcinogénicas en productos de tabaco se minimiza. Esta tecnología representa un enfoque novedoso para la reducción de TSNA que podría ayudar a la industria del tabaco a producir productos de tabaco con menores niveles de TSNA de lo que es posible usando las prácticas actuales.

Las nitrato reductasas desreguladas se han descrito en *Nicotiana plumbaginifolia*, por ejemplo por Nussaume et al. Plant Cell 7:611-621 (1995), y Lea et al., Plant Physiology 140:1085-1094 (2006). La reducción en los niveles de nitrato observada en *N. plumbaginifolia* es considerablemente inferior a la observada en *N. tabacum* en los datos

presentados aquí. Además, una reducción en los niveles de TSNA que proviene de nitrato reductasas desreguladas no se ha demostrado anteriormente.

Los títulos de las secciones como se usan en esta sección y en toda la descripción son simplemente con fines de organización y no pretenden ser limitantes.

5 **1. Definiciones**

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto en la técnica. En caso de conflicto, el presente documento, incluyendo sus definiciones, regirá.

10 Los métodos y materiales preferidos se describen a continuación, pese a que los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente se pueden usar en la puesta en práctica o evaluación de la presente invención. Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes y otras referencias mencionadas en la presente se incorporan a la presente mediante referencia en su totalidad. Los materiales, métodos y ejemplos descritos en la presente son solamente ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

15 Los términos “comprende(n)”, “incluye(n)”, “tiene(n)”, “puede(n)”, “contiene(n)” y variantes de estos, como se usan en la presente, son frases, términos o palabras de transición y abiertas que no excluyen la posibilidad de actos o estructuras adicionales. Las formas singulares “un/una” “y” y “el” incluyen referencias al plural a menos que el contexto claramente indique otra cosa. La presente descripción también contempla otras modalidades “que comprenden”, “que consisten en” y “que consisten esencialmente en” las modalidades o
20 elementos presentados en la presente, ya sea establecidos explícitamente o no. Para recitar los intervalos numéricos en la presente, cada número intermedio entre estos con el mismo grado de precisión se contempla explícitamente. Por ejemplo, para el intervalo 6-9,

los números 7 y 8 se contemplan además de 6 y 9 y para el intervalo 6.0-7.0, los números 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9 y 7.0 se contemplan explícitamente.

Como se usa en toda la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, los siguientes términos tienen los siguientes significados:

5 “Secuencia codificante” o “ácido nucleico codificante”, como se usa en la presente, se refiere a los ácidos nucleicos (molécula de ARN o ADN) que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína. La secuencia codificante también puede incluir señales de inicio y terminación unidas operativamente a elementos de regulación incluyendo una señal promotora y de poliadenilación capaz de dirigir la expresión en las células de un
10 individuo o mamífero al que se le administra el ácido nucleico. A la secuencia codificante se le pueden optimizar los codones.

“Complemento” o “complementario”, como se usa en la presente, se refiere a que un ácido nucleico puede significar apareamiento de bases Watson-Crick (*p. ej.*, A-T/U y C-G) o Hoogsteen entre nucleótidos o análogos de nucleótidos de moléculas de ácido nucleico.

15 “Complementariedad” se refiere a una propiedad compartida entre dos secuencias de ácido nucleico, de manera que cuando están alineadas de manera antiparalela entre sí, las bases de nucleótidos en cada posición serán complementarias.

El término “construcción”, como se usa en la presente, se refiere a un fragmento de ácido nucleico recombinante de cadena doble que comprende uno o más polinucleótidos. La
20 construcción comprende una “cadena molde” con apareamiento de bases con una “cadena codificante o sentido” complementaria. Una construcción dada 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.

El término "control", como se usa en la presente en el contexto de una planta de control o células vegetales de control significa una planta o células vegetales en las que la expresión o actividad de la nitrato reductasa no se ha modificado (por ejemplo, aumentado o reducido) y por lo tanto puede proporcionar una comparación con una planta en la que la expresión o actividad de la nitrato reductasa se ha modificado. Como se usa en la presente, una "planta de control" es una planta que es sustancialmente equivalente a una planta de prueba o planta modificada en todos los parámetros con la excepción de los parámetros de prueba. Por ejemplo, al referirse a una planta en la que se introdujo un polinucleótido de conformidad con la presente invención, en determinadas modalidades, una planta de control es una planta equivalente en la que no se introdujo un polinucleótido. En determinadas modalidades, una planta de control es una planta equivalente en la que se introdujo un polinucleótido de control. En estos casos, el polinucleótido de control es uno que se espera que resulte en poco o nada de efecto fenotípico en la planta. La planta control puede comprender un vector vacío. La planta de control puede corresponder a una planta de tipo salvaje. La planta de control puede ser un segregante nulo donde el segregante T1 ya no posee el transgén.

"ADN donante" o "plantilla donante", como se usan de manera intercambiable en la presente, se refieren a un fragmento o molécula de ADN de cadena doble que incluye al menos una porción del gen de interés. El ADN donante puede codificar una proteína completamente funcional o una proteína parcialmente funcional.

"Gen endógeno" como se usa en la presente se refiere a un gen que se origina en el genoma del organismo que no se sometió a un cambio, como una pérdida, ganancia o intercambio de material genético. Un gen endógeno se somete a transmisión de genes y expresión de genes normal.

“Secuencias potenciadoras” como se usa en la presente, se refiere a las secuencias que pueden aumentar la expresión de genes. Estas secuencias se pueden ubicar corriente arriba, dentro de intrones o corriente abajo de la región transcrita. La región transcrita comprende los exones y los intrones intermedios, desde el promotor a la región de terminación de la transcripción. La potenciación de la expresión de genes puede ser a través de varios mecanismos que incluyen, pero no se limitan a, mayor eficacia de la transcripción, estabilización de ARNm maduro y potenciación de la traducción.

“Expresión” como se usa en la presente se refiere a la producción de un producto funcional. Por ejemplo, la expresión de un fragmento de ácido nucleico puede referirse a la transcripción del fragmento de ácido nucleico (p. ej., transcripción que resulta en ARNm o ARN funcional) y/o traducción de ARNm en una proteína madura o precursor. “Sobreexpresión” se refiere a la producción de un producto génico en organismos transgénicos que excede los niveles de producción en un organismo de segregación nula (o no transgénico) del mismo experimento.

“Funcional” y “completamente funcional” como se usa en la presente, describe una proteína con actividad biológica. Un “gen funcional” se refiere a un gen transcrito a ARNm, que se traduce en una proteína funcional.

“Construcción genética” como se usa en la presente se refiere a las moléculas de ADN o ARN que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína. La secuencia codificante incluye señales de inicio y terminación unidas operativamente a elementos de regulación incluyendo una señal promotora y de poliadenilación capaces de dirigir la expresión en las células del individuo o mamífero al que se le administra la molécula de ácido nucleico.

“Edición de genomas” como se usa en la presente se refiere a cambiar un gen endógeno que codifica una proteína o polipéptido endógeno, de manera de obtener la expresión de

proteína de una proteína endógena truncada o una proteína endógena con una sustitución de aminoácidos. La edición de genomas puede incluir el remplazo de la región del gen endógeno a ser dirigido o el remplazo de todo el gen endógeno con una copia del gen que tiene una truncación o una sustitución de aminoácidos con un mecanismo de reparación como reparación dirigida por homología (HDR). La edición de genomas también puede incluir la generación de una sustitución de aminoácidos en el gen endógeno mediante la generación de una ruptura de cadena doble en el gen endógeno que luego se repara usando unión de extremos no homólogos (NHEJ). NHEJ puede agregar o eliminar al menos un par de bases durante la reparación que puede genera una sustitución de aminoácidos. La edición de genomas también puede incluir la eliminación de un segmento de genes por la acción simultánea de dos nucleasas en la misma cadena de ADN para crear una truncación entre los dos sitios diana de nucleasa y reparar la ruptura de ADN por NHEJ.

“Heterólogo” como se usa en la presente respecto de una secuencia se refiere a una secuencia que se origina de una especie externa o, si es de la misma especie, se modifica sustancialmente de su forma natural en composición y/o en el locus genómico por la intervención deliberada del ser humano.

“Reparación dirigida por homología” o “HDR” como se usan de manera intercambiable en la presente se refieren a un mecanismo en las células para reparar lesiones de ADN de cadena doble cuando un pedazo homólogo de ADN está presente en el núcleo, principalmente en la fase G2 y S del ciclo celular. HDR usa un ADN donante o plantilla donante para guiar la reparación y se puede utilizar para crear cambios específicos de secuencia al genoma, incluyendo la adición dirigida de genomas enteros. Si se proporciona una plantilla donante junto con la nucleasa específica del sitio, la maquinaria celular reparará la ruptura por recombinación homóloga, que se potencia varios órdenes de

magnitud en presencia de escisión de ADN. Cuando el pedazo de ADN homólogo está ausente, la unión de extremos no homólogos puede tener lugar.

Los términos "homología" o "similitud", como se usan en la presente, se refieren al grado de similitud de secuencia 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.

"Idéntico" o "identidad" como se usa en la presente en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias de polipéptidos significa que las secuencias tienen un porcentaje específico de residuos que son los mismos en una región especificada. El porcentaje se puede calcular mediante la alineación óptima de dos secuencias, comparando las dos secuencias en la región especificada, determinando la cantidad de posiciones en las que ocurre el residuo idéntico en ambas secuencias para proporcionar la cantidad de posiciones coincidentes, dividiendo la cantidad de posiciones coincidentes por la cantidad total de posiciones en la región especificada y multiplicando el resultado por 100 para proporcionar el porcentaje de identidad de secuencia. En los casos en que las dos secuencias tienen diferentes longitudes o la alineación produce uno o más extremos escalonados y la región especificada de comparación incluyen solo una secuencia de señal, los residuos de la única secuencia se incluyen en el denominador pero no el numerador del cálculo. Al comparar ADN y ARN, timina (T) y uracilo (U) se pueden considerar equivalentes. La identidad se puede realizar manualmente o usando un algoritmo de secuencia informático como ClustalW, ClustalX, BLAST, FASTA o Smith-Waterman.

El término "aumentar" o "aumentado" como se usa en la presente, se refiere a un aumento de aproximadamente 10% a aproximadamente 99%, 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%, al menos 99%, al menos 100%, al menos 150%, o al menos 200% o más, o más de una cantidad o una actividad, tal como pero sin limitarse a niveles de nitrato o niveles de TSNA.

El término “inhibir” o “inhibido” como se usa en la presente, se refiere a una reducción desde aproximadamente 98 % hasta aproximadamente 100 %, o una reducción de al menos 98 %, al menos 99 %, pero particularmente de 100 %, de una cantidad o una actividad, tal como pero sin limitarse a la actividad de un polipéptido, la actividad de transcripción y/o la expresión de proteínas.

El término “introducido” como se usa en la presente se refiere a proporcionar un ácido nucleico (p. ej., construcción de expresión) o proteína en una célula. Introducido incluye la referencia a la incorporación de un ácido nucleico en una célula eucariota donde el ácido nucleico se puede incorporar en el genoma de la célula e incluye la referencia a la introducción transitoria de un ácido nucleico o proteína en la célula. Introducido incluye la referencia a métodos de transformación estable o transitoria, así como cruzamiento sexual.

Por lo tanto, “introducido” en el contexto de insertar un fragmento de ácido nucleico (p. ej., una construcción/construcción de expresión de ADN recombinante) en una célula, se refiere a “transfección” o “transformación” o “transducción” e incluye la referencia a la incorporación de un fragmento de ácido nucleico en una célula eucariota donde el fragmento de ácido nucleico se puede incorporar en el genoma de la célula (p. ej., cromosoma, plásmido, plástido o ADN mitocondrial), convertido en un replicón autónomo o expresado transitoriamente (p. ej., ARNm transfectado).

Los términos “aislado”, “purificado” o “biológicamente puro”, como se usan en la presente, se refieren a un material que está sustancialmente o básicamente libre de componentes que lo acompañan normalmente como se encuentra en su estado natural. La pureza y homogeneidad se determinan típicamente usando técnicas de química analítica como

electroforesis en gel de poliacrilamida o cromatografía líquida de alto rendimiento. Una proteína que es la especie predominante presente en una preparación está sustancialmente purificada. En particular, un ácido nucleico aislado de la presente invención se separa de marcos abiertos de lectura que flanquean el gen deseado y codifican proteínas que no son la proteína deseada. El término “purificado”, como se usa en la presente, denota que un ácido nucleico o proteína da lugar básicamente a una banda en un gel electroforético. En particular, significa que el ácido nucleico o proteína es al menos 85% puro, con más preferencia al menos 95% puro y con preferencia superlativa al menos 99% puro.

Los polinucleótidos aislados se pueden purificar a partir de una célula hospedadora en la que ocurren naturalmente. Los métodos de purificación de ácido nucleico convencionales conocidos por los expertos en la técnica se pueden usar para obtener polinucleótidos aislados. El término también abarca polinucleótidos recombinantes y polinucleótidos sintetizados químicamente.

“Nitrato reductasa” como se usa en la presente se refiere a una enzima que redujo el nitrato (NO_3^-) a nitrito (NO_2^-). El término “enzima nitrato reductasa desregulada” típicamente se refiere a una enzima nitrato reductasa que no está sujeta a uno o más mecanismos de regulación (p. ej., mecanismos de regulación transcripcional, posttranscripcional o posttraduccional) que controlan o restringen la expresión o actividad de la nitrato reductasa en una planta de tabaco no modificada de control. Por lo tanto, “la expresión o actividad de dicha nitrato reductasa está desregulada” típicamente significa que la expresión o actividad de la nitrato reductasa está aumentada en la planta de tabaco modificada en comparación con la planta de tabaco no modificada de control. El término “polinucleótido de nitrato reductasa desregulada” incluye polinucleótidos que codifican una nitrato reductasa (NR) modificada de *Nicotiana tabacum* e incluye polinucleótidos que comprenden, consisten o consisten esencialmente en polinucleótidos con homología sustancial (es decir, similitud de

secuencia) o identidad sustancial a las sec. con núm. de ident.: 5 o 7, variantes de polinucleótidos con al menos aproximadamente 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 75%, 80%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con las secuencias de sec. con núm. de ident.: 5 o 7; fragmentos de los polinucleótidos incluyendo fragmentos de sec. con núm. de ident.: 5 o 7; y fragmentos de sec. con núm. de ident.: 5 o 7 con homología sustancial (es decir, similitud de secuencia) o identidad sustancial con esta que tienen al menos aproximadamente 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 75%, 80%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con los fragmentos correspondientes de sec. con núm. de ident.: 5 o 7. Los fragmentos pueden tener al menos aproximadamente 20, 50, 70, 100, 200, 300, 500, 1000, o 2000 nucleótidos de longitud, p. ej., el polinucleótido de nitrato reductasa desregulada puede comprender (i) al menos aproximadamente 20, 50, 70, 100, 200, 300, 500, 1000, o 2000 nucleótidos de sec. con núm. de ident.: 5 o 7, o (ii) una secuencia con al menos aproximadamente 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 75%, 80%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con al menos aproximadamente 20, 50, 70, 100, 200, 300, 500, 1000 o 2000 nucleótidos de sec. con núm. de ident.: 5 o 7. Típicamente el fragmento puede retener la actividad biológica de la secuencia de longitud completa, p. ej., el fragmento codifica la actividad de la nitrato reductasa, la actividad de la nitrato reductasa típicamente modificada o desregulada. El polinucleótido de nitrato reductasa incluye además secuencias que comprenden un grado de identidad o similitud suficiente o sustancial con la sec. con núm. de ident.: 5 o 7 o codifica un polipéptido que funciona como nitrato reductasa. En una modalidad, el término “polinucleótido de nitrato reductasa” se refiere a un polímero de nucleótidos que comprende, consiste o consiste

esencialmente en un polinucleótido designado en la presente como sec. con núm. de ident.: 1 o 3.

El término “polipéptido de nitrato reductasa desregulada” incluye una nitrato reductasa (NR)

modificada de *Nicotiana tabacum* e incluye polipéptidos que comprenden, consisten o

consisten esencialmente en polipéptidos con homología sustancial (es decir, similitud de secuencia) o identidad sustancial a las sec. con núm. de ident.: 6 o 8, o variantes de polipéptidos con al menos aproximadamente 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 75%, 80%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la secuencia de sec. con núm. de ident.: 6

o 8; fragmentos de los polipéptidos incluyendo fragmentos de sec. con núm. de ident.: 6 o 8; y fragmentos de sec. con núm. de ident.: 6 o 8 con homología sustancial (es decir, similitud de secuencia) o identidad sustancial con esta que tienen al menos aproximadamente 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 75%, 80%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o

100% de identidad de secuencia con los fragmentos correspondientes de sec. con núm. de ident.: 6 o 8. Los fragmentos pueden tener al menos aproximadamente 10, 30, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 o 900 aminoácidos de longitud, p. ej., el polipéptido de nitrato reductasa desregulada puede comprender (i) al menos aproximadamente 10, 30, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 o 900 aminoácidos de sec. con núm. de ident.: 6 o

8, o (ii) una secuencia con al menos aproximadamente 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 75%, 80%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con al menos aproximadamente 10, 30, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 o 900 aminoácidos de sec. con núm. de ident.: 6 o 8. Típicamente el fragmento puede retener la actividad

biológica de la secuencia de longitud completa, p. ej., el fragmento comprende la actividad

de nitrato reductasa, actividad de nitrato reductasa típicamente modificada o desregulada. El polipéptido de nitrato reductasa incluye además secuencias que comprenden un grado de identidad o similitud suficiente o sustancial con la sec. con núm. de ident.: 6 o 8 que funciona como nitrato reductasa. En una modalidad, el término “polipéptido de nitrato reductasa” se refiere a un polímero de aminoácidos que comprende, consiste o consiste esencialmente en un polipéptido designado en la presente como sec. con núm. de ident.: 2 o 4.

“Vía de unión de extremos no homólogos” (NHEJ), como se usa en la presente, se refiere a una vía que repara las rupturas de cadena doble en el ADN mediante la ligación directa de los extremos rotos sin necesidad de una plantilla homóloga. La religación independiente de plantilla de los extremos de ADN por NHEJ es un proceso de reparación estocástico, propenso a errores, que introduce microinserciones y microeliminaciones (indel) aleatorias en el punto de ruptura del ADN. Este método se puede usar para interrumpir, eliminar o alterar intencionalmente el marco de lectura de las secuencias del gen dirigido. NHEJ típicamente usa secuencias de ADN homólogas cortas denominadas microhomologías para guiar la reparación. Estas microhomologías están frecuentemente presentes en salientes de cadena simple en el extremo de las rupturas de cadena doble. Cuando las salientes son perfectamente compatibles, NHEJ frecuentemente repara la ruptura de manera exacta, aunque también puede ocurrir una reparación imprecisa que lleva a la pérdida de nucleótidos, pero es mucho más común cuando las salientes no son compatibles. “NHEJ mediada por nucleasas”, como se usa en la presente, se refiere a NHEJ iniciada luego de que una nucleasa corta el ADN de cadena doble.

“Truncación en el extremo N”, como se usa en la presente, se refiere a una eliminación de aminoácidos en el extremo N o cerca de este. En algunas modalidades, la eliminación de aminoácidos puede ocurrir en el extremo N del polipéptido, es decir, la eliminación incluye el

primer aminoácido de la proteína transcrita o madura. En algunas modalidades, la eliminación de aminoácidos puede ocurrir en el extremo N del polipéptido, es decir, la eliminación no incluye el primer aminoácido de la proteína transcrita o madura pero ocurre dentro de la primera mitad del polipéptido.

5 “Ácido nucleico” u “oligonucleótido” o “polinucleótido” como se usan en la presente, se refieren al menos a dos nucleótidos enlazados covalentemente entre sí. La ilustración de una cadena simple también define la secuencia de la cadena complementaria. Por lo tanto, un ácido nucleico también abarca la cadena complementaria de una cadena simple ilustrada. Muchas variantes de un ácido nucleico se pueden usar para el mismo objetivo
10 que un ácido nucleico dado. Por lo tanto, un ácido nucleico también abarca ácidos nucleicos sustancialmente idénticos y complementos de estos. Una cadena simple proporciona una sonda que puede hibridarse a una secuencia diana en condiciones rigurosas de hibridación. Por lo tanto, un ácido nucleico también abarca una sonda que se hibrida en condiciones rigurosas de hibridación.

15 Los ácidos nucleicos pueden ser de cadena simple o cadena doble o pueden contener porciones de secuencia tanto de cadena simple como de cadena doble. El ácido nucleico puede ser ADN, tanto genómico como ADNc, ARN o un híbrido, donde el ácido nucleico puede contener combinaciones de desoxirribo- y ribo-nucleótidos y combinaciones de bases incluyendo uracilo, adenina, timina, citosina, guanina, inosina, santina hipoxantina,
20 isocitosina e isoguanina. Los ácidos nucleicos se pueden obtener por métodos de síntesis química o por métodos recombinantes.

La especificidad de ADN de cadena simple para hibridar los fragmentos complementarios se determina por la “rigurosidad” de las condiciones de reacción (Sambrook *et al.*, Molecular Cloning and Laboratory Manual, segunda Ed., Cold Spring Harbor (1989)). La rigurosidad
25 de hibridación aumenta a medida que la propensión a formar híbridos de ADN se reduce.

En reacciones de hibridación de ácido nucleico, la rigurosidad se puede elegir para favorecer hibridaciones específicas (alta rigurosidad), que se pueden usar para identificar, por ejemplo, clones de longitud completa de una biblioteca. Las hibridaciones menos específicas (baja rigurosidad) se pueden usar para identificar moléculas o segmentos de ADN relacionados pero no exactos (homólogos pero no idénticos).

Los híbridos de ADN se estabilizan por: (1) la cantidad de pares de bases complementarios; (2) el tipo de pares de bases; (3) la concentración de sal (resistencia iónica) de la mezcla de reacción; (4) la temperatura de la reacción y (5) la presencia de determinados solventes orgánicos, como formamida, que reducen la estabilidad del híbrido de ADN. En general, cuanto más larga la sonda, mayor la temperatura necesaria para un templado adecuado. Un enfoque común es el de variar la temperatura; las mayores temperaturas relativas resultan en condiciones de reacción más rigurosas.

Hibridar en “condiciones rigurosas” describe los protocolos de hibridación en los que las secuencias de nucleótidos al menos 60% homólogas entre sí permanecen hibridadas.

Generalmente, las condiciones rigurosas se seleccionan para ser aproximadamente 5°C menores que el punto de fusión térmica (T_m) para la secuencia específica en una resistencia iónica y pH definidos. El T_m es la temperatura (con resistencia iónica, pH, y concentración de ácido nucleico definidos) a la que 50% de las sondas complementarias a la secuencia diana se hibridan a la secuencia diana en equilibrio. Debido a que las secuencias diana están generalmente presentes en exceso, en el T_m , 50% de las sondas están ocupadas en equilibrio.

“Condiciones de hibridación rigurosas” son condiciones que permiten que una sonda, cebador u oligonucleótido se hibride solo a su secuencia diana (p. ej., sec. con núm. de ident.: 1, 3, 5 o 7). Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y serán diferentes.

Las condiciones rigurosas comprenden: (1) baja resistencia iónica y lavados de alta

temperatura, por ejemplo 15 mM de cloruro de sodio, 1.5 mM de citrato de sodio, 0.1% de dodecil sulfato de sodio a 50°C; (2) un agente desnaturalizante durante la hibridación, p. ej., 50% (v/v) de formamida, 0.1% de albúmina de suero bovino, 0.1% de Ficoll, 0.1% de polivinilpirrolidona, 50 mM de amortiguador de fosfato de sodio (750 mM de cloruro de sodio, 75 mM de citrato de sodio; pH 6.5), a 42 °C o (3) 50% de formamida. Los lavados típicamente también comprenden 5xSSC (0.75 M de NaCl, 75 mM de citrato de sodio), 50 mM de fosfato de sodio (pH 6.8), 0.1% de pirofosfato de sodio, 5x de solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonificado (50 µg/mL), 0.1% de SDS y 10% de sulfato de dextrano a 42°C, con un lavado a 42°C en 0.2xSSC (cloruro de sodio/citrato de sodio) y 50% de formamida a 55 °C, seguido de un lavado de alta rigurosidad que consiste en 0.1xSSC que contiene EDTA a 55°C. Preferentemente, las condiciones son tales que las secuencias al menos aproximadamente 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% homólogas entre sí típicamente permanecen hibridadas entre sí. Estas condiciones se presentan como ejemplos y no pretenden ser taxativas.

“Condiciones moderadamente rigurosas” usan soluciones de lavado y condiciones de hibridación que son menos rigurosas, de manera que un polinucleótido se hibridará a la secuencia diana entera, fragmentos, derivados o análogos de esta (p. ej., sec. con núm. de ident.: 1, 3, 5 o 7). Un ejemplo comprende hibridación en 6xSSC, 5x de solución de Denhardt, 0.5% de SDS y 100 µg/mL de ADN de esperma de salmón desnaturalizado a 55°C, seguido de uno o más lavados en 1xSSC, 0.1% de SDS a 37°C. La temperatura, resistencia iónica, etc., se puede ajustar para adaptarse a factores experimentales como longitud de sonda. Se han descrito otras condiciones de rigurosidad moderadas (Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, tomos 1-3, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, N.J. (1993); Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual, Stockton Press,

Nueva York, N.Y. (1990); Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, segunda edición, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y. (1988)).

“Condiciones de baja rigurosidad” usan soluciones de lavado y condiciones de hibridación que son menos rigurosas que las de la rigurosidad moderada, de manera que un polinucleótido se hibridará a la secuencia diana entera, fragmentos, derivados o análogos de esta (p. ej., sec. con núm. de ident.: 1, 3, 5 o 7). Un ejemplo no taxativo de condiciones de hibridación de baja rigurosidad incluyen hibridación en 35% de formamida, 5xSSC, 50 mM de Tris HCl (pH 7.5), 5 mM de EDTA, 0.02% de PVP, 0.02% de Ficoll, 0.2% de BSA, 100 µg/mL de ADN de esperma de salmón desnaturalizado, 10% (p/vol) de sulfato de dextrano a 40°C, seguido de uno o más lavados en 2xSSC, 25 mM de Tris HCl (pH 7.4), 5 mM de EDTA y 0.1% de SDS a 50°C. Otras condiciones de baja rigurosidad, como las de las hibridaciones entre especies se describen bien (Ausubel et al., 1993; Kriegler, 1990).

“Enlazado operativamente”, como se usa en la presente, se refiere a la expresión de un gen bajo el control de un promotor al que está conectado espacialmente. Un promotor puede estar ubicado 5' (corriente arriba) o 3' (corriente abajo) de un gen bajo su control. La distancia entre el promotor y un gen puede ser aproximadamente la misma que la distancia entre ese promotor y el gen que controla en el gen del que deriva el promotor. Como se sabe en la técnica, la variación en esta distancia se puede adaptar sin que se pierda la función del promotor. “Enlazado operativamente” se refiere a la asociación de fragmentos de ácido nucleico en un único fragmento de manera que la función de uno esté regulada por el otro. Por ejemplo, un promotor está enlazado operativamente a un fragmento de ácido nucleico cuando es capaz de regular la transcripción de ese fragmento de ácido nucleico.

El término "planta", como se usa en la presente, se refiere a cualquier planta en cualquier etapa de su ciclo de vida o desarrollo y sus progenies. En una modalidad, la planta es una "planta de tabaco", la cual se refiere a una planta que pertenece al género *Nicotiana*.

“Planta” incluye referencia a plantas enteras, órganos de plantas, tejidos de plantas, propágulos de plantas, semillas y células de plantas y sus progenies. Las células de plantas incluyen, de modo no taxativo, células de semillas, cultivos de suspensión, embriones, regiones meristemáticas, tejidos de callos, hojas, raíces, tallos, gametofitos, esporofitos, polen y microsporas. Las especies, plantas de cultivo, híbridos y variedades preferidas de plantas de tabaco se describen en la presente.

“Polinucleótido”, “secuencia de ácido nucleico”, “secuencia de nucleótido” o “fragmento de ácido nucleico” se usan de manera intercambiable en la presente para hacer referencia a un polímero de ARN o ADN de cadena doble o simple, que opcionalmente contiene bases de nucleótidos sintéticas, no naturales o alteradas. Se hace referencia a los nucleótidos (generalmente encontrados en su forma de 5'-monofosfato) por su designación de una sola letra de la siguiente manera: "A" para adenilato o desoxiadenilato (para ARN o ADN, respectivamente), "C" para citidilato o desoxicitidilato, "G" para guanilato o desoxiguanilato, "U" para uridilato, "T" para desoxitimidilato, "R" para purinas (A o G), "Y" para pirimidinas (C o T), "K" para G o T, "H" para A o C o T, "I" para inosina y "N" para cualquier nucleótido. Un polinucleótido puede ser, sin limitación, un ADN genómico, ADN complementario (ADNc), ARNm, o ARN antisentido o uno o más fragmentos de estos. Además, un polinucleótido puede ser ácido nucleico de cadena simple o de cadena doble que es una mezcla de regiones de cadena simple y de cadena doble, una molécula híbrida que comprende ADN y ARN, o una molécula híbrida con una mezcla de regiones de cadena simple y de cadena doble o uno o más fragmentos 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 (PNA). Generalmente, los polinucleótidos pueden ensamblarse a partir de fragmentos aislados o clonados de ADNc,

ADN genómico, oligonucleótidos 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.

“Polipéptido”, “péptido”, “secuencia de aminoácido” y “proteína” se usan en la presente de manera intercambiable para hacer referencia a un polímero de residuos de aminoácido. Los términos aplican a polímeros de aminoácido en los que uno o más residuos de aminoácidos son un análogo químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácido de origen natural. Los términos “polipéptido”, “péptido”, “secuencia de aminoácidos” y “proteína” también incluyen modificaciones incluyendo, entre otras, glicosilación, unión de lípidos, sulfación, gamma-carboxilación de residuos de ácido glutámico, hidroxilación y ADP-ribosilación.

“Promotor”, como se usa en la presente, se refiere a una molécula sintética o derivada naturalmente que puede conferir, activar o potenciar la expresión de un ácido nucleico en una célula. Un “promotor” se refiere a un elemento/secuencia de ácido nucleico, típicamente ubicado corriente arriba y unido operativamente a un fragmento de ácido nucleico de cadena doble. Los promotores pueden derivar 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 ácido nucleico sintéticos. Un promotor puede comprender una o más secuencias de regulación de la transcripción específicas para potenciar más la expresión y/o para alterar la expresión espacial y/o la expresión temporal de este. Un promotor también puede comprender elementos represores o potenciadores distales, que se pueden ubicar tan lejos como varios cientos de pares de bases desde el sitio de inicio de la transcripción. Un promotor puede derivar de fuentes que incluyen viral,

bacteriana, fúngica, vegetal, insectos y animales. Un promotor puede regular la expresión de un componente genético de manera constitutiva o diferencial respecto de la célula, el tejido o el órgano en el que ocurre la expresión o, respecto de la etapa de desarrollo en la que ocurre la expresión, o en respuesta a estímulos externos como tensiones fisiológicas, patógenos, iones de metal o agentes de inducción. “Promotor específico del tejido” y “promotor preferido del tejido”, como se usan de manera intercambiable en la presente, se refieren a un promotor expresado predominantemente, pero no necesariamente de manera exclusiva, en uno tejido u órgano, pero que también se puede expresar en una célula específica. “Promotor regulado desde el punto de vista del desarrollo”, como se usa en la presente, se refiere a un promotor cuya actividad se determina por eventos de desarrollo. Los promotores que hacen que un gen se exprese en la mayoría de los tipos celulares la mayoría de las veces se denominan comúnmente “promotores constitutivos”. Los promotores inducibles expresan selectivamente una secuencia de ADN enlazada operativamente en respuesta a la presencia de un estímulo endógeno o exógeno, por ejemplo, por compuestos químicos (inductores químicos) o en respuesta a señales ambientales, hormonales, químicas y/o de desarrollo. Ejemplos de promotores inducibles o regulados incluyen, entre otros, promotores regulados por luz, calor, tensión, inundación o sequía, patógenos, fitohormonas, lesión o productos químicos como etanol, jasmonato, ácido salicílico o protectores.

“Recombinante”, como se usa en la presente, se refiere a una combinación artificial de dos segmentos que de otro modo estaban separados de una secuencia, p. ej., por síntesis química o por la manipulación de segmentos aislados de ácidos nucleicos por técnicas de ingeniería genética. “Recombinante” también incluye referencia a una célula o vector que se modificó por la introducción de un ácido nucleico heterólogo o una célula que deriva de una célula modificada de este modo, pero que no abarca la alteración de la célula o vector

por eventos de origen natural (p. ej., mutación espontánea, transformación/transducción/transposición natural) como las que ocurren sin la intervención deliberada del ser humano.

“Construcción de ADN recombinante”, como se usa en la presente, se refiere a una combinación de fragmentos de ácido nucleico que no se encuentran normalmente juntos en la naturaleza. Por consiguiente, una construcción de ADN recombinante puede comprender secuencias reguladoras y secuencias codificantes que derivan de diferentes fuentes, o secuencias reguladoras y secuencias codificantes que derivan de la misma fuente, pero dispuestas en una manera diferente a la que se encuentran normalmente en la naturaleza.

Los términos “construcción de ADN recombinante” y “construcción recombinante” se utilizan de manera intercambiable en la presente.

El término “reducir” o “reducido” como se usa en la presente, se refiere a una reducción de aproximadamente 10 % a aproximadamente 99 %, o una reducción de al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, al menos 99 % o al menos 100 % o más de una cantidad o una actividad, tal como pero sin limitarse a los niveles de nitrato y los niveles de nitrosaminas específicas del tabaco (TSNA). El término “reducido” o la frase “una cantidad reducida” pretenden referirse a una cantidad de TSNA en una planta de tabaco modificada o un producto de tabaco generado a partir de la planta de tabaco modificada que es menor de lo que se encontraría en una planta de tabaco o producto de tabaco de la misma variedad de tabaco procesado de la misma manera pero no modificado. Por lo tanto, en algunos contextos, el tabaco de tipo salvaje de la misma variedad que se procesó de la misma manera se usa como control por el cual medir si una reducción en el nitrato o TSNA se obtuvo por los métodos inventivos descritos en la presente.

“Secuencias reguladoras” y “elementos reguladores”, como se usan de manera intercambiable en la presente, se refieren a secuencias de nucleótidos ubicadas corriente arriba (secuencias no codificantes 5'), dentro de, o corriente abajo (secuencias no codificantes 3') de una secuencia codificante y que influyen en la transcripción, procesamiento o estabilidad de ARN, o traducción de la secuencia codificante asociada. Las secuencias reguladoras pueden incluir, entre otros, promotores, secuencias líderes de la traducción, intrones y secuencias de reconocimiento de poliadenilación. Los términos “secuencia reguladora” y “elemento regulador” se usan en la presente de manera intercambiable.

“Nucleasa específica del sitio”, como se usa en la presente, se refiere a una enzima capaz de reconocer y escindir específicamente secuencias de ADN. La nucleasa específica del sitio puede diseñarse genéticamente. Ejemplos de nucleasas específicas del sitio diseñadas genéticamente incluyen nucleasas de dedos de zinc (ZFN), nucleasas efectoras TAL (TALEN), sistemas basados en CRISPR/Cas9 y meganucleasas.

El término “tabaco”, en algunos contextos, como se usa en la presente se usa en sentido colectivo para hacer referencia a cultivos de tabaco (p. ej., múltiples plantas de tabaco cultivadas en el campo, es decir, tabaco no cultivado hidropónicamente), plantas de tabaco y partes de estas incluyendo, entre otras cosas, raíces, tallos, hojas, flores y semillas preparadas y/u obtenidas, como se describe en la presente. Se entiende que “tabaco” se refiere a plantas de *Nicotiana tabacum* y productos de estas. El término “productos de tabaco” en algunos contextos se refiere a productos de tabaco para el consumidor incluyendo, entre otros, materiales para fumar (p. ej., cigarrillos, cigarros y tabaco de pipa), rapé, tabaco de masticar, chicles y pastillas, así como componentes, materiales e ingredientes para la fabricación de productos de tabaco para el consumidor. Preferentemente, estos productos de tabaco se fabrican a partir de hojas de tabaco

(*Nicotiana tabacum*) y tallos cosechados a partir de tabaco tratado como se describe anteriormente y cortado, secado, curado y/o fermentado de conformidad con técnicas convencionales en la preparación de tabaco.

“Terminador de la transcripción”, “secuencias de terminación” o “terminador”, como se usan en la presente se refieren a secuencias de ADN ubicadas corriente abajo de una secuencia codificante, incluyendo secuencias de reconocimiento de poliadenilación y otras secuencias que codifican señales reguladoras capaces de afectar el procesamiento de ARN o la expresión de genes. La señal de poliadenilación se caracteriza habitualmente afectando la adición de tractos de ácido poliadenílico al extremo 3' del precursor de ARNm.

“Transgénico”, como se usa en la presente, se refiere a cualquier célula, línea celular, callo, tejido, parte de planta o planta, el genoma de la cual se ha alterado por la presencia de un ácido nucleico heterólogo, como una construcción de ADN recombinante, incluyendo esos eventos transgénicos iniciales así como los creados por cruzamientos sexuales o propagación asexual del evento transgénico inicial. El término “transgénico”, como se usa en la presente, no abarca la alteración del genoma (cromosomal o extracromosomal) por métodos de mejoramiento de plantas convencionales o por eventos de origen natural como fertilización cruzada aleatoria, infección viral no recombinante, transformación bacteriana no recombinante, transposición no recombinante o mutación espontánea.

“Planta transgénica”, como se usa en la presente, incluye referencia a una planta que comprende dentro de su genoma un polinucleótido heterólogo, es decir, una planta o árbol que contiene material genético recombinante no encontrado normalmente en plantas o árboles de este tipo y que se introdujo a la planta en cuestión (o a progenitores de la planta) por manipulación humana. Por ejemplo, el polinucleótido heterólogo se integra de manera estable en el genoma de manera que el polinucleótido pase a generaciones sucesivas. El polinucleótido heterólogo se puede integrar en el genoma solo o como parte de una

construcción de ADN recombinante. El desarrollo comercial de germoplasma genéticamente mejorado también ha avanzado a la etapa de introducir múltiples rasgos a plantas de cultivo, denominado frecuentemente enfoque de apilamiento de genes. En este enfoque, múltiples genes que otorgan diferentes características de interés se pueden introducir en una planta. El apilamiento de genes se puede lograr por muchos medios incluyendo, sin limitarse a, cotransformación, retransformación y cruzamiento de líneas con diferentes transgenes. Por lo tanto, una planta que se cultiva a partir de una célula de una planta en la que el ADN recombinante se introdujo por transformación es una planta transgénica, y también lo es toda la descendencia de esa planta que contiene el transgén introducido (ya sea producido sexualmente o asexualmente). Se entiende que el término planta transgénica abarca toda la planta o árbol y partes de la planta o árbol, por ejemplo granos, semillas, flores, hojas, raíces, fruta, polen, tallos, etc.

“Planta transgénica” también incluye referencia a plantas que comprenden más de un polinucleótido heterólogo dentro de su genoma. Cada polinucleótido heterólogo puede conferir un rasgo diferente a la planta transgénica.

“Efector tipo activador de la transcripción” o “TALE”, como se usa en la presente, se refiere a una estructura de proteína que reconoce una secuencia de ADN particular y se une a esta. El “dominio de unión a ADN TALE” se refiere a un dominio de unión a ADN que incluye un arreglo de repeticiones de 33-35 aminoácidos en tándem, también denominadas módulos de RVD, cada uno de los cuales reconoce específicamente un único par de bases de ADN. Los módulos de RVD se pueden disponer en cualquier orden para armar un arreglo que reconoce una secuencia definida.

Una especificidad de unión de un dominio de unión a ADN TALE se determina por el arreglo RVD seguido de una única repetición truncada de 20 aminoácidos. Un dominio de unión a ADN TALE puede tener 12 a 27 módulos de RVD, cada uno de los cuales contiene un RVD

y reconoce un único par de bases de ADN. Se han identificado RVD específicos que reconocen cada uno de los cuatro posibles nucleótidos de ADN (A, T, C y G). Debido a que los dominios de unión a ADN TALE son modulares, las repeticiones que reconocen los cuatro nucleótidos de ADN diferentes se pueden unir entre sí para reconocer cualquier
5 secuencia de ADN particular. Estos dominios de unión a ADN dirigidos pueden combinarse luego con dominios catalíticos para crear enzimas funcionales, incluyendo factores de transcripción artificial, metiltransferasas, integrasas, nucleasas y recombinasas.

“Nucleasas efectoras tipo activador de transcripción” o “TALEN”, como se usan de manera intercambiable en la presente, se refiere a proteínas de fusión diseñadas del dominio
10 catalítico de una nucleasa, como endonucleasa *FokI* y un dominio de unión a ADN TALE diseñado que se puede dirigir a una secuencia de ADN personalizada. Un “monómero de TALEN” se refiere a una proteína de fusión diseñada con un dominio de nucleasa catalítico y un dominio de unión a ADN TALE diseñado. Dos monómeros de TALEN se pueden diseñar para dirigirse a una región diana de TALEN y escindirla.

“Transgén”, como se usa en la presente, se refiere a un gen o material genético que
15 contiene una secuencia de genes que se aísla de un organismo y se introduce en un organismo diferente. Este segmento no natural de ADN puede retener la capacidad de producir ARN o proteína en el organismo transgénico o puede alterar la función normal del código genético del organismo transgénico. La introducción de un transgén tiene el
20 potencial de cambiar el fenotipo de un organismo.

“Variante” usado en la presente respecto de un ácido nucleico significa (i) una porción o fragmento de una secuencia de nucleótidos de referencia; (ii) el complemento de una secuencia de nucleótidos de referencia o porción de esta; (iii) un ácido nucleico que es sustancialmente idéntico a un ácido nucleico de referencia o el complemento de este o (iv)

un ácido nucleico que se hibrida en condiciones rigurosas al ácido nucleico de referencia, complemento de este o una secuencia sustancialmente idéntica a este.

“Variante” es respecto de un péptido o polipéptido que difiere en secuencia de aminoácidos por la inserción, eliminación o sustitución conservadora de aminoácidos, pero retiene al menos una actividad biológica. Variante también puede referirse a una proteína con una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a una proteína de referencia con una secuencia de aminoácidos que retiene al menos una actividad biológica. Una sustitución conservadora de un aminoácido, *es decir*, remplazar un aminoácido con un aminoácido diferente de propiedades similares (*p. ej.*, hidrofiliicidad, grado y distribución de regiones cargadas) se reconoce en la técnica como que típicamente implica un cambio menor.

El término "variedad", como se usa en la presente, 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 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.

Un "vector", como se usa en la presente, se refiere a un vehículo de ácido nucleico que comprende una combinación de componentes de ácidos nucleicos para permitir el transporte de ácido nucleico, construcciones de ácidos nucleicos y conjugados de ácidos nucleicos y similares. Un vector puede ser un vector viral, bacteriófago, cromosoma artificial bacteriano o cromosoma artificial de levadura. Un vector puede ser un vector de ADN o ARN. 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. Por ejemplo, el vector puede codificar una proteína nitrato reductasa desregulada que

comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las sec. con núm. de ident.:

5 o 7. Un "vector de expresión", como se usa en la presente, es un vehículo de ácido nucleico que comprende una combinación de componentes de ácidos nucleicos para permitir la expresión de ácido nucleico, construcciones de ácidos nucleicos y conjugados de ácidos nucleicos y similares. 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 corriente arriba y enlazado operativamente a un ácido nucleico, construcciones de ácidos nucleicos o conjugado de ácido nucleico, como se define a continuación.

"Dedo de zinc", como se usa en la presente, se refiere a una estructura de proteína que reconoce secuencias de ADN y se une a estas. El dominio de dedo de zinc es el motivo de unión a ADN más común en el proteoma humano. Un único dedo de zinc contiene aproximadamente 30 aminoácidos y el dominio funciona típicamente uniendo 3 pares de bases consecutivos de ADN mediante interacciones de una cadena lateral de un solo aminoácido por par de base.

"Nucleasa de dedo de zinc" o "ZFN", como se usan de manera intercambiable en la presente, se refieren a una molécula de proteína quimérica que comprende al menos un dominio de unión a ADN de dedo de zinc unido de manera eficaz al menos a una nucleasa o parte de una nucleasa capaz de escindir el ADN cuando se ensambla totalmente.

A menos que se defina de otro modo en la presente, todos los términos técnicos y científicos usados respecto de la presente tendrán el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto en la técnica. Por ejemplo, cualquier nomenclatura usada en conexión con, y las técnicas de, cultivo celular y de tejido, biología molecular, inmunología,

microbiología, genética, y química de proteína y ácido nucleico e hibridación descritas en la presente son las conocidas y comúnmente usadas en la técnica. El significado y alcance de los términos debería quedar claro; sin embargo, en el caso de cualquier ambigüedad latente, las definiciones provistas por la presente toman precedencia sobre cualquier definición de diccionario o extrínseca. Además, a menos que el contexto claramente lo requiera de otro modo, los términos en singular incluirán el plural y los términos en plural incluirán el singular.

2. Planta de tabaco modificada con nitrato reducido

La presente invención se refiere, en un aspecto, a plantas de tabaco modificadas con niveles reducidos de nitrato libre en sus hojas. Los niveles de nitrato libre se reducen mediante la vía de asimilación de nitrato. Un diagrama simplificado de la vía de asimilación de nitrógeno en plantas se muestra en la Figura 1. Luego de que las plantas se exponen a nitrato en el suelo, hay varios pasos implicados en la incorporación de N, incluyendo absorción, asimilación, translocación y removilización. Después de la absorción por transportadores específicos ubicados en membranas de célula raíz, el nitrato ingresa en una vía de asimilación específica. Inicialmente, el nitrato se reduce a nitrito (NO_2^-) por la enzima nitrato reductasa (NR; EC 1.7.1.1-3). Posteriormente, el nitrito se reduce a amoníaco por la enzima nitrato reductasa (NiR). El último paso tiende a ser altamente eficaz en plantas y, como resultado, las células vegetales típicamente contienen niveles muy bajos de nitrito. Después de la reducción de nitrito en amoníaco, la enzima glutamina sintetasa (GS) incorpora el nitrógeno en la molécula orgánica glutamina (Gln). La enzima GS funciona junto con la enzima glutamato sintasa (GOGAT) para formar el ciclo GS/GOGAT, que funciona para transportar grupos amino de Gln a ácido glutámico (Glu) para que funcione como puerta para la posterior redistribución del nitrógeno a otros aminoácidos y en última

instancia proteínas y otras macromoléculas que contienen nitrógeno. Otro paso importante en este proceso se cataliza por isocitrato deshidrogenasa (ICDH), la enzima que se cree que es responsable de proporcionar la estructura de 2-oxoglutarato carbono requerida por GOGAT para producir Glu.

5 El tabaco (*Nicotiana tabacum*) tiene dos genes de tabaco NR altamente homólogos, designados *Nia1* y *Nia2*. Las plantas de tabaco modificadas, como se describen en la presente que tienen niveles reducidos de nitrato libre en sus hojas, tienen un polinucleótido de nitrato reductasa modificado que codifica un polipéptido de nitrato reductasa desregulada, es decir, un producto génico *Nia1* y *Nia2* desregulado. La nitrato reductasa
10 está altamente regulada tanto a nivel transcripcional como posttranscripcional. Debido a los mecanismos de regulación posttraduccional, que incluyen reducción de luz/oscuridad mediante fosforilación, la sobreexpresión de genes de NR en plantas transgénicas lleva típicamente solo a un aumento modesto en la actividad de NR en la célula. En algunas modalidades, el polipéptido de nitrato reductasa desregulada es un polipéptido de nitrato
15 reductasa endógeno o heterólogo que es constitutivamente activo. El polipéptido de nitrato reductasa desregulada puede haber perdido la capacidad de ser regulado por fosforilación debido a una pérdida de un sitio de fosforilación en el polipéptido de nitrato reductasa y por lo tanto no se regula por luz y oscuridad. La planta de tabaco modificada puede tener un polinucleótido que codifica un polipéptido de nitrato reductasa desregulada o un polipéptido
20 de nitrato reductasa desregulada de sec. con núm. de ident.: 5 o la sec. con núm. de ident.: 7 o variantes o fragmentos de esta. Por ejemplo, la nitrato reductasa desregulada puede ser un polipéptido de nitrato reductasa truncada o un polipéptido de nitrato reductasa con una sustitución de aminoácido donde el sitio de fosforilación se elimina.

En algunas modalidades, la planta de tabaco modificada muestra un crecimiento y
25 desarrollo de planta sustancialmente normal, en comparación con una planta de control no

modificada. Por ejemplo, la planta de tabaco modificada puede senescer normalmente, es decir, la senescencia en la planta de tabaco modificada puede ser sustancialmente la misma que en la planta de tabaco de control no modificada. En algunas modalidades, el aspecto visual de la planta de tabaco modificada puede ser sustancialmente el mismo que la planta de control no modificada, p. ej., 3 o 6 meses después del trasplante al campo. Por ejemplo, el contenido de clorofila de hojas, coloración de hojas, grado de madurez, cantidad de hojas por planta, altura de tallo, ángulo de inserción de hoja, tamaño de hoja (ancho o longitud), distancia entre nodos y/o relación de lámina-nervio central puede ser sustancialmente la misma en las plantas de tabaco modificadas en comparación con las plantas de control no modificadas.

(1) Nitrato reductasa truncada

El polipéptido de nitrato reductasa desregulada puede ser un polipéptido de nitrato reductasa con una truncación en el extremo N, es decir, una eliminación en el extremo N o cerca de este. Un gen *Nia2* de tabaco truncado que codifica una proteína NR que posee una eliminación de 56 aminoácidos en su dominio de extremo N tiene gran parte del control posttraduccional de la enzima suprimido. La eliminación de 56 aminoácidos permite que la enzima nitrato reductasa sea igualmente activa tanto en la luz como en la oscuridad, en comparación con la enzima de tipo salvaje (WT) que se inactiva durante los ciclos de oscuridad mediante fosforilación. Al acoplarse a un promotor constitutivo fuerte, la expresión del gen de nitrato reductasa truncada puede potenciar la actividad global de nitrato reductasa NR en la planta, pero también la producción desregulada de glutamina (Gln) y asparagina (Asn).

El polipéptido de nitrato reductasa desregulada puede ser un polipéptido de nitrato reductasa con una truncación en el extremo N de aproximadamente 10 aminoácidos a

[illegible]

60 aminoácidos, aproximadamente 40 aminoácidos a aproximadamente 55 aminoácidos, aproximadamente 40 aminoácidos a aproximadamente 50 aminoácidos, aproximadamente 50 aminoácidos a aproximadamente 100 aminoácidos, aproximadamente 50 aminoácidos a aproximadamente 90 aminoácidos, aproximadamente 50 aminoácidos a aproximadamente 80 aminoácidos, aproximadamente 50 aminoácidos a aproximadamente 70 aminoácidos, aproximadamente 50 aminoácidos a aproximadamente 60 aminoácidos, aproximadamente 50 aminoácidos a aproximadamente 55 aminoácidos, aproximadamente 55 aminoácidos a aproximadamente 100 aminoácidos, aproximadamente 55 aminoácidos a aproximadamente 90 aminoácidos, aproximadamente 55 aminoácidos a aproximadamente 80 aminoácidos, aproximadamente 55 aminoácidos a aproximadamente 70 aminoácidos, o aproximadamente 55 aminoácidos a aproximadamente 60 aminoácidos, o al menos aproximadamente 10 aminoácidos, al menos aproximadamente 20 aminoácidos, al menos aproximadamente 30 aminoácidos, al menos aproximadamente 40 aminoácidos, al menos aproximadamente 50 aminoácidos, al menos 51 aminoácidos, al menos 52 aminoácidos, al menos 53 aminoácidos, al menos 54 aminoácidos, al menos 55 aminoácidos, al menos aproximadamente 56 aminoácidos, al menos 57 aminoácidos, al menos aproximadamente 58 aminoácidos, al menos 59 aminoácidos, al menos aproximadamente 60 aminoácidos, o al menos 65 aminoácidos, en comparación con sec. con núm. de ident. 4. El polipéptido de nitrato reductasa desregulada puede ser un polipéptido de nitrato reductasa con una truncación de 56 aminoácidos en el extremo N.

(2) Sustitución de aminoácidos

El polipéptido de nitrato reductasa desregulada puede ser un polipéptido de nitrato reductasa con una sustitución de aminoácidos en la posición que corresponde a la posición 523 de la sec. con núm. de ident.: 4. Mutar el residuo de serina en un sitio de fosforilación

putativa (véase Figura 2), eliminando así los controles de regulación posttraduccional mediante luz y oscuridad, aumenta y mantiene altos niveles de forma activa de nitrato reductasa en plantas transgénicas para facilitar la asimilación de nitrato. Al cambiar el residuo de serina (Ser) en la posición 523 a un aspartato (Asp) de la sec. con núm. de ident.: 4, usando mutagénesis dirigida por el sitio, el polipéptido de nitrato reductasa ya no sirve como sustrato para las proteína cinasas que normalmente activan esta enzima durante la oscuridad mediante la fosforilación de este residuo de Ser. En algunas modalidades, la nitrato reductasa desregulada incluye un polipéptido que comprende una sustitución de aminoácidos en una posición que corresponde a la posición 523 de la sec. con núm. de ident.: 4. En algunas modalidades, la nitrato reductasa desregulada incluye un polipéptido que comprende un aminoácido que no es serina en una posición que corresponde a la posición 523 de la sec. con núm. de ident.: 4. En algunas modalidades, la nitrato reductasa desregulada incluye un polipéptido que comprende un aspartato en una posición que corresponde a la posición 523 de la sec. con núm. de ident.: 4.

a. Niveles reducidos de nitrato

Las plantas de tabaco modificadas pueden tener niveles reducidos de nitrato en comparación con una planta de tabaco de control, como un control de planta de tabaco de tipo salvaje. En algunas modalidades, las plantas de tabaco modificadas pueden tener niveles reducidos de nitrato en las hojas cuando se cultivan con niveles altos, como 19 mM de nitrato, o niveles medios, como 8 mM de nitrato, de tratamiento de fertilización con nitrato en comparación con una planta de tabaco de control. En algunas modalidades, las plantas de tabaco modificadas pueden tener niveles reducidos de nitrato en las hojas cuando se cultivan en condiciones de campo en comparación con una planta de tabaco de control. En algunas modalidades, las hojas son recién cosechadas. En algunas modalidades, las hojas

son curadas, almacenadas o procesadas. En algunas modalidades, las hojas son curadas al aire.

Las plantas de tabaco modificadas pueden tener una reducción de al menos aproximadamente 1 vez, una reducción de al menos aproximadamente 2 veces, una
5 reducción de al menos aproximadamente 3 veces, una reducción de al menos aproximadamente 4 veces, una reducción de al menos aproximadamente 5 veces, una
reducción de al menos aproximadamente 6 veces, una reducción de al menos aproximadamente 7 veces, una reducción de al menos aproximadamente 8 veces, una
reducción de al menos aproximadamente 9 veces, una reducción de al menos
10 aproximadamente 10 veces, una reducción de al menos aproximadamente 15 veces, una
reducción de al menos aproximadamente 20 veces, una reducción de al menos
aproximadamente 25 veces o una reducción de al menos aproximadamente 30 veces en los
niveles de nitrato en hojas recién cosechadas de una planta de tabaco modificada cultivada
en niveles altos de tratamiento de fertilización con nitrato en comparación con hojas recién
15 cosechadas de una planta de tabaco de control. Las hojas recién cosechadas de plantas de
tabaco modificadas pueden tener de aproximadamente 0.5% a aproximadamente 99%,
aproximadamente 0.5% a aproximadamente 95%, aproximadamente 0.5% a
aproximadamente 90%, aproximadamente 0.5% a aproximadamente 85%,
aproximadamente 0.5% a aproximadamente 80%, aproximadamente 0.5% a
20 aproximadamente 75%, aproximadamente 0.5% a aproximadamente 70%,
aproximadamente 0.5% a aproximadamente 65%, aproximadamente 0.5% a
aproximadamente 60%, aproximadamente 0.5% a aproximadamente 55%,
aproximadamente 0.5% a aproximadamente 50%, aproximadamente 0.5% a
aproximadamente 45%, aproximadamente 0.5% a aproximadamente 40%,
25 aproximadamente 0.5% a aproximadamente 35%, aproximadamente 0.5% a

aproximadamente 30%, aproximadamente 0.5% a aproximadamente 25%,
aproximadamente 0.5% a aproximadamente 20%, aproximadamente 0.5% a
aproximadamente 15%, aproximadamente 0.5% a aproximadamente 13%,
aproximadamente 0.5% a aproximadamente 10%, aproximadamente 0.5% a
5 aproximadamente 5%, aproximadamente 1% a aproximadamente 99%, aproximadamente
1% a aproximadamente 95%, aproximadamente 1% a aproximadamente 90%,
aproximadamente 1% a aproximadamente 85%, aproximadamente 1% a aproximadamente
80%, aproximadamente 1% a aproximadamente 75%, aproximadamente 1% a
aproximadamente 70%, aproximadamente 1% a aproximadamente 65%, aproximadamente
10 1% a aproximadamente 60%, aproximadamente 1% a aproximadamente 55%,
aproximadamente 1% a aproximadamente 50%, aproximadamente 1% a aproximadamente
45%, aproximadamente 1% a aproximadamente 40%, aproximadamente 1% a
aproximadamente 35%, aproximadamente 1% a aproximadamente 30%, aproximadamente
1% a aproximadamente 25%, aproximadamente 1% a aproximadamente 20%,
15 aproximadamente 1% a aproximadamente 15%, aproximadamente 1% a aproximadamente
13%, aproximadamente 1% a aproximadamente 10%, aproximadamente 1% a
aproximadamente 5%, aproximadamente 5% a aproximadamente 99%, aproximadamente
5% a aproximadamente 95%, aproximadamente 5% a aproximadamente 90%,
aproximadamente 5% a aproximadamente 85%, aproximadamente 5% a aproximadamente
20 80%, aproximadamente 5% a aproximadamente 75%, aproximadamente 5% a
aproximadamente 70%, aproximadamente 5% a aproximadamente 65%, aproximadamente
5% a aproximadamente 60%, aproximadamente 5% a aproximadamente 55%,
aproximadamente 5% a aproximadamente 50%, aproximadamente 5% a aproximadamente
45%, aproximadamente 5% a aproximadamente 40%, aproximadamente 5% a
25 aproximadamente 35%, aproximadamente 5% a aproximadamente 30%, aproximadamente

5% a aproximadamente 25%, aproximadamente 5% a aproximadamente 20%,
aproximadamente 5% a aproximadamente 15%, aproximadamente 5% a aproximadamente
13%, aproximadamente 5% a aproximadamente 10%, aproximadamente 10% a
aproximadamente 99%, aproximadamente 10% a aproximadamente 95%, aproximadamente
5 10% a aproximadamente 90%, aproximadamente 10% a aproximadamente 85%,
aproximadamente 10% a aproximadamente 80%, aproximadamente 10% a
aproximadamente 75%, aproximadamente 10% a aproximadamente 70%, aproximadamente
10% a aproximadamente 65%, aproximadamente 10% a aproximadamente 60%,
aproximadamente 10% a aproximadamente 55%, aproximadamente 10% a
10 aproximadamente 50%, aproximadamente 10% a aproximadamente 45%, aproximadamente
10% a aproximadamente 40%, aproximadamente 10% a aproximadamente 35%,
aproximadamente 10% a aproximadamente 30%, aproximadamente 10% a
aproximadamente 25%, aproximadamente 10% a aproximadamente 20%, aproximadamente
10% a aproximadamente 15%, aproximadamente 10% a aproximadamente 13%,
15 aproximadamente 20% a aproximadamente 99%, aproximadamente 20% a
aproximadamente 95%, aproximadamente 20% a aproximadamente 90%, aproximadamente
20% a aproximadamente 85%, aproximadamente 20% a aproximadamente 80%,
aproximadamente 20% a aproximadamente 75%, aproximadamente 20% a
aproximadamente 70%, aproximadamente 20% a aproximadamente 65%, aproximadamente
20 aproximadamente 60%, aproximadamente 20% a aproximadamente 55%,
aproximadamente 20% a aproximadamente 50%, aproximadamente 20% a
aproximadamente 45%, aproximadamente 20% a aproximadamente 40%, aproximadamente
20% a aproximadamente 35%, aproximadamente 20% a aproximadamente 30%,
aproximadamente 20% a aproximadamente 25%, aproximadamente 30% a
25 aproximadamente 99%, aproximadamente 30% a aproximadamente 95%, aproximadamente

30% a aproximadamente 90%, aproximadamente 30% a aproximadamente 85%,
aproximadamente 30% a aproximadamente 80%, aproximadamente 30% a
aproximadamente 75%, aproximadamente 30% a aproximadamente 70%, aproximadamente
30% a aproximadamente 65%, aproximadamente 30% a aproximadamente 60%,
5 aproximadamente 30% a aproximadamente 55%, aproximadamente 30% a
aproximadamente 50%, aproximadamente 30% a aproximadamente 45%, aproximadamente
30% a aproximadamente 40%, aproximadamente 30% a aproximadamente 35%,
aproximadamente 40% a aproximadamente 99%, aproximadamente 40% a
aproximadamente 95%, aproximadamente 40% a aproximadamente 90%, aproximadamente
10 40% a aproximadamente 85%, aproximadamente 40% a aproximadamente 80%,
aproximadamente 40% a aproximadamente 75%, aproximadamente 40% a
aproximadamente 70%, aproximadamente 40% a aproximadamente 65%, aproximadamente
40% a aproximadamente 60%, aproximadamente 40% a aproximadamente 55%,
aproximadamente 40% a aproximadamente 50%, aproximadamente 40% a
15 aproximadamente 45%, aproximadamente 50% a aproximadamente 99%, aproximadamente
50% a aproximadamente 95%, aproximadamente 50% a aproximadamente 90%,
aproximadamente 50% a aproximadamente 85%, aproximadamente 50% a
aproximadamente 80%, aproximadamente 50% a aproximadamente 75%, aproximadamente
50% a aproximadamente 70%, aproximadamente 50% a aproximadamente 65%,
20 aproximadamente 50% a aproximadamente 60%, aproximadamente 50% a
aproximadamente 55%, aproximadamente 60% a aproximadamente 99%, aproximadamente
60% a aproximadamente 95%, aproximadamente 60% a aproximadamente 90%,
aproximadamente 60% a aproximadamente 85%, aproximadamente 60% a
aproximadamente 80%, aproximadamente 60% a aproximadamente 75%, aproximadamente
25 60% a aproximadamente 70%, aproximadamente 60% a aproximadamente 65%, o al menos

aproximadamente 0.5%, al menos aproximadamente 1%, al menos aproximadamente 2%, al menos aproximadamente 3%, al menos aproximadamente 4%, al menos aproximadamente 5%, al menos aproximadamente 6%, al menos aproximadamente 7%, al menos aproximadamente 8%, al menos aproximadamente 9%, al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 11%, al menos aproximadamente 12%, al menos aproximadamente 13%, al menos aproximadamente 14%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 16%, al menos aproximadamente 17%, al menos aproximadamente 18%, al menos aproximadamente 19%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 25%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 45%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 55%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 65%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, o al menos aproximadamente 99% de los niveles de nitrato en hojas recién cosechadas de plantas de tabaco de control, como plantas de tabaco de control de tipo salvaje, cuando se cultiva en niveles altos de tratamiento de fertilización con nitrato. Las plantas de tabaco modificadas pueden tener al menos aproximadamente 50 ppm, al menos aproximadamente 100 ppm, al menos aproximadamente 500 ppm, al menos aproximadamente 1000 ppm, al menos aproximadamente 1500 ppm, al menos aproximadamente 2000 ppm, al menos aproximadamente 2500 ppm, al menos aproximadamente 3000 ppm, al menos aproximadamente 3500 ppm, al menos aproximadamente 4000 ppm, o al menos aproximadamente 5000 ppm de nitrato en hojas recién cosechadas de una planta de tabaco modificada cultivada en niveles medios de tratamiento de fertilización con nitrato en comparación con hojas recién cosechadas de una planta de tabaco de control.

Las plantas de tabaco modificadas pueden tener una reducción de al menos aproximadamente 1 vez, una reducción de al menos aproximadamente 2 veces, una reducción de al menos aproximadamente 3 veces, una reducción de al menos aproximadamente 4 veces, una reducción de al menos aproximadamente 5 veces, una reducción de al menos aproximadamente 6 veces, una reducción de al menos aproximadamente 7 veces, una reducción de al menos aproximadamente 8 veces, una reducción de al menos aproximadamente 9 veces, una reducción de al menos aproximadamente 10 veces, una reducción de al menos aproximadamente 15 veces, una reducción de al menos aproximadamente 20 veces, una reducción de al menos aproximadamente 25 veces o una reducción de al menos aproximadamente 30 veces en los niveles de nitrato en hojas recién cosechadas de una planta de tabaco modificada cultivada en niveles medios de tratamiento de fertilización con nitrato en comparación con hojas recién cosechadas de una planta de tabaco de control. Las hojas recién cosechadas de plantas de tabaco modificadas pueden tener de aproximadamente 0.5% a aproximadamente 99%, aproximadamente 0.5% a aproximadamente 95%, aproximadamente 0.5% a aproximadamente 90%, aproximadamente 0.5% a aproximadamente 85%, aproximadamente 0.5% a aproximadamente 80%, aproximadamente 0.5% a aproximadamente 75%, aproximadamente 0.5% a aproximadamente 70%, aproximadamente 0.5% a aproximadamente 65%, aproximadamente 0.5% a aproximadamente 60%, aproximadamente 0.5% a aproximadamente 55%, aproximadamente 0.5% a aproximadamente 50%, aproximadamente 0.5% a aproximadamente 45%, aproximadamente 0.5% a aproximadamente 40%, aproximadamente 0.5% a aproximadamente 35%, aproximadamente 0.5% a aproximadamente 30%, aproximadamente 0.5% a aproximadamente 25%, aproximadamente 0.5% a aproximadamente 20%, aproximadamente 0.5% a

aproximadamente 15%, aproximadamente 0.5% a aproximadamente 13%,
aproximadamente 0.5% a aproximadamente 10%, aproximadamente 0.5% a
aproximadamente 5%, aproximadamente 1% a aproximadamente 99%, aproximadamente
1% a aproximadamente 95%, aproximadamente 1% a aproximadamente 90%,
5 aproximadamente 1% a aproximadamente 85%, aproximadamente 1% a aproximadamente
80%, aproximadamente 1% a aproximadamente 75%, aproximadamente 1% a
aproximadamente 70%, aproximadamente 1% a aproximadamente 65%, aproximadamente
1% a aproximadamente 60%, aproximadamente 1% a aproximadamente 55%,
aproximadamente 1% a aproximadamente 50%, aproximadamente 1% a aproximadamente
10 45%, aproximadamente 1% a aproximadamente 40%, aproximadamente 1% a
aproximadamente 35%, aproximadamente 1% a aproximadamente 30%, aproximadamente
1% a aproximadamente 25%, aproximadamente 1% a aproximadamente 20%,
aproximadamente 1% a aproximadamente 15%, aproximadamente 1% a aproximadamente
13%, aproximadamente 1% a aproximadamente 10%, aproximadamente 1% a
15 aproximadamente 5%, aproximadamente 5% a aproximadamente 99%, aproximadamente
5% a aproximadamente 95%, aproximadamente 5% a aproximadamente 90%,
aproximadamente 5% a aproximadamente 85%, aproximadamente 5% a aproximadamente
80%, aproximadamente 5% a aproximadamente 75%, aproximadamente 5% a
aproximadamente 70%, aproximadamente 5% a aproximadamente 65%, aproximadamente
20 5% a aproximadamente 60%, aproximadamente 5% a aproximadamente 55%,
aproximadamente 5% a aproximadamente 50%, aproximadamente 5% a aproximadamente
45%, aproximadamente 5% a aproximadamente 40%, aproximadamente 5% a
aproximadamente 35%, aproximadamente 5% a aproximadamente 30%, aproximadamente
5% a aproximadamente 25%, aproximadamente 5% a aproximadamente 20%,
25 aproximadamente 5% a aproximadamente 15%, aproximadamente 5% a aproximadamente

13%, aproximadamente 5% a aproximadamente 10%, aproximadamente 10% a
aproximadamente 99%, aproximadamente 10% a aproximadamente 95%, aproximadamente
10% a aproximadamente 90%, aproximadamente 10% a aproximadamente 85%,
aproximadamente 10% a aproximadamente 80%, aproximadamente 10% a
5 aproximadamente 75%, aproximadamente 10% a aproximadamente 70%, aproximadamente
10% a aproximadamente 65%, aproximadamente 10% a aproximadamente 60%,
aproximadamente 10% a aproximadamente 55%, aproximadamente 10% a
aproximadamente 50%, aproximadamente 10% a aproximadamente 45%, aproximadamente
10% a aproximadamente 40%, aproximadamente 10% a aproximadamente 35%,
10 aproximadamente 10% a aproximadamente 30%, aproximadamente 10% a
aproximadamente 25%, aproximadamente 10% a aproximadamente 20%, aproximadamente
10% a aproximadamente 15%, aproximadamente 10% a aproximadamente 13%,
aproximadamente 20% a aproximadamente 99%, aproximadamente 20% a
aproximadamente 95%, aproximadamente 20% a aproximadamente 90%, aproximadamente
15 20% a aproximadamente 85%, aproximadamente 20% a aproximadamente 80%,
aproximadamente 20% a aproximadamente 75%, aproximadamente 20% a
aproximadamente 70%, aproximadamente 20% a aproximadamente 65%, aproximadamente
20% a aproximadamente 60%, aproximadamente 20% a aproximadamente 55%,
aproximadamente 20% a aproximadamente 50%, aproximadamente 20% a
20 aproximadamente 45%, aproximadamente 20% a aproximadamente 40%, aproximadamente
20% a aproximadamente 35%, aproximadamente 20% a aproximadamente 30%,
aproximadamente 20% a aproximadamente 25%, aproximadamente 30% a
aproximadamente 99%, aproximadamente 30% a aproximadamente 95%, aproximadamente
30% a aproximadamente 90%, aproximadamente 30% a aproximadamente 85%,
25 aproximadamente 30% a aproximadamente 80%, aproximadamente 30% a

aproximadamente 75%, aproximadamente 30% a aproximadamente 70%, aproximadamente 30% a aproximadamente 65%, aproximadamente 30% a aproximadamente 60%, aproximadamente 30% a aproximadamente 55%, aproximadamente 30% a aproximadamente 50%, aproximadamente 30% a aproximadamente 45%, aproximadamente 30% a aproximadamente 40%, aproximadamente 30% a aproximadamente 35%, aproximadamente 40% a aproximadamente 99%, aproximadamente 40% a aproximadamente 95%, aproximadamente 40% a aproximadamente 90%, aproximadamente 40% a aproximadamente 85%, aproximadamente 40% a aproximadamente 80%, aproximadamente 40% a aproximadamente 75%, aproximadamente 40% a aproximadamente 70%, aproximadamente 40% a aproximadamente 65%, aproximadamente 40% a aproximadamente 60%, aproximadamente 40% a aproximadamente 55%, aproximadamente 40% a aproximadamente 50%, aproximadamente 40% a aproximadamente 45%, aproximadamente 50% a aproximadamente 99%, aproximadamente 50% a aproximadamente 95%, aproximadamente 50% a aproximadamente 90%, aproximadamente 50% a aproximadamente 85%, aproximadamente 50% a aproximadamente 80%, aproximadamente 50% a aproximadamente 75%, aproximadamente 50% a aproximadamente 70%, aproximadamente 50% a aproximadamente 65%, aproximadamente 50% a aproximadamente 60%, aproximadamente 50% a aproximadamente 55%, aproximadamente 60% a aproximadamente 99%, aproximadamente 60% a aproximadamente 95%, aproximadamente 60% a aproximadamente 90%, aproximadamente 60% a aproximadamente 85%, aproximadamente 60% a aproximadamente 80%, aproximadamente 60% a aproximadamente 75%, aproximadamente 60% a aproximadamente 70%, aproximadamente 60% a aproximadamente 65%, o al menos aproximadamente 0.5%, al menos aproximadamente 1%, al menos aproximadamente 2%, al menos aproximadamente 3%, al menos aproximadamente 4%, al menos

aproximadamente 5%, al menos aproximadamente 6%, al menos aproximadamente 7%, al menos aproximadamente 8%, al menos aproximadamente 9%, al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 11%, al menos aproximadamente 12%, al menos aproximadamente 13%, al menos aproximadamente 14%, al menos aproximadamente 15%,
5 al menos aproximadamente 16%, al menos aproximadamente 17%, al menos aproximadamente 18%, al menos aproximadamente 19%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 25%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 37%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 45%, al menos aproximadamente 50%, al menos
10 aproximadamente 55%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 65%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, o al menos aproximadamente 99% de los niveles de nitrato en hojas recién cosechadas de plantas de tabaco de control, como plantas de tabaco
15 de control de tipo salvaje, cuando se cultivan en niveles medios de tratamiento de fertilización con nitrato. Las plantas de tabaco modificadas pueden tener al menos aproximadamente 50 ppm, al menos aproximadamente 100 ppm, al menos aproximadamente 150 ppm, al menos aproximadamente 200 ppm, al menos aproximadamente 250 ppm, al menos aproximadamente 300 ppm, al menos
20 aproximadamente 350 ppm, al menos aproximadamente 400 ppm, al menos aproximadamente 450 ppm, al menos aproximadamente 500 ppm, al menos aproximadamente 550 ppm, al menos aproximadamente 600 ppm, al menos aproximadamente 650 ppm, al menos aproximadamente 700 ppm, al menos aproximadamente 750 ppm, al menos aproximadamente 800 ppm, al menos
25 aproximadamente 850 ppm, al menos aproximadamente 900 ppm, al menos

aproximadamente 950 ppm, o al menos aproximadamente 1000 ppm de nitrato en hojas recién cosechadas de una planta de tabaco modificada cultivada en niveles medios de tratamiento de fertilización con nitrato en comparación con hojas recién cosechadas de una planta de tabaco de control.

- 5 Las hojas recién cosechadas o las hojas curadas de plantas de tabaco modificadas pueden tener una reducción de al menos aproximadamente 1 vez, una reducción de al menos aproximadamente 2 veces, una reducción de al menos aproximadamente 3 veces, una reducción de al menos aproximadamente 4 veces, una reducción de al menos aproximadamente 5 veces, una reducción de al menos aproximadamente 6 veces, una
- 10 reducción de al menos aproximadamente 7 veces, una reducción de al menos aproximadamente 8 veces, una reducción de al menos aproximadamente 9 veces, una reducción de al menos aproximadamente 10 veces, una reducción de al menos aproximadamente 15 veces, una reducción de al menos aproximadamente 20 veces, una reducción de al menos aproximadamente 25 veces o una reducción de al menos
- 15 aproximadamente 30 veces en los niveles de nitrato en hojas recién cosechadas o en hojas curadas de una planta de tabaco modificada cultivada en un campo. Las hojas recién cosechadas o las hojas curadas de plantas de tabaco modificadas pueden tener de aproximadamente 0.5% a aproximadamente 99%, aproximadamente 0.5% a
- 20 aproximadamente 95%, aproximadamente 0.5% a aproximadamente 90%, aproximadamente 0.5% a aproximadamente 85%, aproximadamente 0.5% a aproximadamente 80%, aproximadamente 0.5% a aproximadamente 75%, aproximadamente 0.5% a aproximadamente 70%, aproximadamente 0.5% a
- 25 aproximadamente 65%, aproximadamente 0.5% a aproximadamente 60%, aproximadamente 0.5% a aproximadamente 55%, aproximadamente 0.5% a aproximadamente 50%, aproximadamente 0.5% a aproximadamente 45%,

aproximadamente 0.5% a aproximadamente 40%, aproximadamente 0.5% a
aproximadamente 35%, aproximadamente 0.5% a aproximadamente 30%,
aproximadamente 0.5% a aproximadamente 25%, aproximadamente 0.5% a
aproximadamente 20%, aproximadamente 0.5% a aproximadamente 15%,
5 aproximadamente 0.5% a aproximadamente 13%, aproximadamente 0.5% a
aproximadamente 10%, aproximadamente 0.5% a aproximadamente 5%, aproximadamente
1% a aproximadamente 99%, aproximadamente 1% a aproximadamente 95%,
aproximadamente 1% a aproximadamente 90%, aproximadamente 1% a aproximadamente
85%, aproximadamente 1% a aproximadamente 80%, aproximadamente 1% a
10 aproximadamente 75%, aproximadamente 1% a aproximadamente 70%, aproximadamente
1% a aproximadamente 65%, aproximadamente 1% a aproximadamente 60%,
aproximadamente 1% a aproximadamente 55%, aproximadamente 1% a aproximadamente
50%, aproximadamente 1% a aproximadamente 45%, aproximadamente 1% a
aproximadamente 40%, aproximadamente 1% a aproximadamente 35%, aproximadamente
15 1% a aproximadamente 30%, aproximadamente 1% a aproximadamente 25%,
aproximadamente 1% a aproximadamente 20%, aproximadamente 1% a aproximadamente
15%, aproximadamente 1% a aproximadamente 13%, aproximadamente 1% a
aproximadamente 10%, aproximadamente 1% a aproximadamente 5%, aproximadamente
5% a aproximadamente 99%, aproximadamente 5% a aproximadamente 95%,
20 aproximadamente 5% a aproximadamente 90%, aproximadamente 5% a aproximadamente
85%, aproximadamente 5% a aproximadamente 80%, aproximadamente 5% a
aproximadamente 75%, aproximadamente 5% a aproximadamente 70%, aproximadamente
5% a aproximadamente 65%, aproximadamente 5% a aproximadamente 60%,
aproximadamente 5% a aproximadamente 55%, aproximadamente 5% a aproximadamente
25 50%, aproximadamente 5% a aproximadamente 45%, aproximadamente 5% a

aproximadamente 40%, aproximadamente 5% a aproximadamente 35%, aproximadamente 5% a aproximadamente 30%, aproximadamente 5% a aproximadamente 25%, aproximadamente 5% a aproximadamente 20%, aproximadamente 5% a aproximadamente 15%, aproximadamente 5% a aproximadamente 13%, aproximadamente 5% a aproximadamente 10%, aproximadamente 10% a aproximadamente 99%, aproximadamente 10% a aproximadamente 95%, aproximadamente 10% a aproximadamente 90%, aproximadamente 10% a aproximadamente 85%, aproximadamente 10% a aproximadamente 80%, aproximadamente 10% a aproximadamente 75%, aproximadamente 10% a aproximadamente 70%, aproximadamente 10% a aproximadamente 65%, aproximadamente 10% a aproximadamente 60%, aproximadamente 10% a aproximadamente 55%, aproximadamente 10% a aproximadamente 50%, aproximadamente 10% a aproximadamente 45%, aproximadamente 10% a aproximadamente 40%, aproximadamente 10% a aproximadamente 35%, aproximadamente 10% a aproximadamente 30%, aproximadamente 10% a aproximadamente 25%, aproximadamente 10% a aproximadamente 20%, aproximadamente 10% a aproximadamente 15%, aproximadamente 10% a aproximadamente 13%, aproximadamente 20% a aproximadamente 99%, aproximadamente 20% a aproximadamente 95%, aproximadamente 20% a aproximadamente 90%, aproximadamente 20% a aproximadamente 85%, aproximadamente 20% a aproximadamente 80%, aproximadamente 20% a aproximadamente 75%, aproximadamente 20% a aproximadamente 70%, aproximadamente 20% a aproximadamente 65%, aproximadamente 20% a aproximadamente 60%, aproximadamente 20% a aproximadamente 55%, aproximadamente 20% a aproximadamente 50%, aproximadamente 20% a aproximadamente 45%, aproximadamente 20% a aproximadamente 40%, aproximadamente 20% a aproximadamente 35%, aproximadamente 20% a aproximadamente 30%, aproximadamente 20% a

aproximadamente 25%, aproximadamente 30% a aproximadamente 99%, aproximadamente 30% a aproximadamente 95%, aproximadamente 30% a aproximadamente 90%, aproximadamente 30% a aproximadamente 85%, aproximadamente 30% a aproximadamente 80%, aproximadamente 30% a aproximadamente 75%, aproximadamente 30% a aproximadamente 70%, aproximadamente 30% a aproximadamente 65%, aproximadamente 30% a aproximadamente 60%, aproximadamente 30% a aproximadamente 55%, aproximadamente 30% a aproximadamente 50%, aproximadamente 30% a aproximadamente 45%, aproximadamente 30% a aproximadamente 40%, aproximadamente 30% a aproximadamente 35%, aproximadamente 40% a aproximadamente 99%, aproximadamente 40% a aproximadamente 95%, aproximadamente 40% a aproximadamente 90%, aproximadamente 40% a aproximadamente 85%, aproximadamente 40% a aproximadamente 80%, aproximadamente 40% a aproximadamente 75%, aproximadamente 40% a aproximadamente 70%, aproximadamente 40% a aproximadamente 65%, aproximadamente 40% a aproximadamente 60%, aproximadamente 40% a aproximadamente 55%, aproximadamente 40% a aproximadamente 50%, aproximadamente 40% a aproximadamente 45%, aproximadamente 50% a aproximadamente 99%, aproximadamente 50% a aproximadamente 95%, aproximadamente 50% a aproximadamente 90%, aproximadamente 50% a aproximadamente 85%, aproximadamente 50% a aproximadamente 80%, aproximadamente 50% a aproximadamente 75%, aproximadamente 50% a aproximadamente 70%, aproximadamente 50% a aproximadamente 65%, aproximadamente 50% a aproximadamente 60%, aproximadamente 50% a aproximadamente 55%, aproximadamente 60% a aproximadamente 99%, aproximadamente 60% a aproximadamente 95%, aproximadamente 60% a aproximadamente 90%, aproximadamente 60% a aproximadamente 85%, aproximadamente 60% a aproximadamente 80%, aproximadamente

60% a aproximadamente 75%, aproximadamente 60% a aproximadamente 70%,
aproximadamente 60% a aproximadamente 65%, o al menos aproximadamente 0.5%, al
menos aproximadamente 1.0%, al menos aproximadamente 2.0%, al menos
aproximadamente 3.0%, al menos aproximadamente 4.0%, al menos aproximadamente
4.1%, al menos aproximadamente 4.2%, al menos aproximadamente 4.3%, al menos
aproximadamente 4.4%, al menos aproximadamente 4.5%, al menos aproximadamente
5.0%, al menos aproximadamente 5.1%, al menos aproximadamente 5.2%, al menos
aproximadamente 5.3%, al menos aproximadamente 5.4%, al menos aproximadamente
5.5%, al menos aproximadamente 5.6%, al menos aproximadamente 5.7%, al menos
aproximadamente 5.8%, al menos aproximadamente 5.9%, al menos aproximadamente
6.0%, al menos aproximadamente 7.0%, al menos aproximadamente 8.0%, al menos
aproximadamente 9.0%, al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente
11%, al menos aproximadamente 12%, al menos aproximadamente 13%, al menos
aproximadamente 14%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 16%,
al menos aproximadamente 17%, al menos aproximadamente 18%, al menos
aproximadamente 19%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 25%,
al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 35%, al menos
aproximadamente 37%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 45%,
al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 55%, al menos
aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 65%, al menos aproximadamente 70%,
al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos
aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%,
o al menos aproximadamente 99% de los niveles de nitrato encontrados en hojas recién
cosechadas o en hojas curadas de plantas de tabaco de control, como una planta de tabaco
de tipo salvaje cuando se cultiva en un campo.

b. Nitrato reductasa heteróloga

El polipéptido de nitrato reductasa desregulada se puede codificar por un polinucleótido o gen de nitrato reductasa heterólogo, es decir, un gen de nitrato reductasa que no es endógeno a la planta de tabaco modificada. El gen de nitrato reductasa heterólogo puede introducirse en el genoma de la planta de tabaco modificada por transformación de planta, como se describe a continuación. Por ejemplo, el gen de nitrato reductasa heterólogo se puede introducir en la planta de tabaco modificada por métodos de transformación estable o transformación transitoria.

El gen de nitrato reductasa heterólogo puede ser un gen de nitrato reductasa de planta, hongo o alga. Por ejemplo, el gen de nitrato reductasa heterólogo puede ser de *Ricinus communis*, *Ricinus communis*, *Vitis vinifera*, *Populus trichocarpa*, *Selaginella moellendorffii*, *Selaginella moellendorffii*, *Cucumis sativus*, *Cucurbita maxima*, *Cucumis sativus*, *Brassica napus*, *Populus trichocarpa*, *Betula pendula*, *Solanum tuberosum*, *Nicotiana tomentosiformis*, *Nicotiana tabacum*, *Solanum lycopersicum*, *Nicotiana benthamiana*, *Medicago truncatula*, *Nicotiana benthamiana*, *Brassica rapa subsp. chinensis*, *Beta vulgaris*, *Nicotiana sylvestris*, una variedad diferente de *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana plumbaginifolia*, *Glycine max*, *Solanum tuberosum*, *Solanum tuberosum*, *Brassica napus*, *Arabidopsis lyrata subsp. lyrata*, *Arabidopsis thaliana*, *Phaseolus vulgaris*, *Medicago truncatula*, *Petunia x hybrid*, *Spinacia oleracea*, *Lotus japonicas*, *Cichorium intybus*, *Petunia x hybrid*, *Spinacia oleracea*, *Thellungiella halophila*, grupo *Oryza sativa Japonica*, *Zea Mays*, *Arabidopsis thaliana*, *Arabidopsis lyrata subsp. lyrata*, *Phaseolus vulgaris*, *Sorghum bicolor*, *Oryza sativa* Grupo Indica, *Oryza sativa* Grupo Japonica, *Hordeum vulgare subsp vulgare*, sorgo *bicolor*, *Oryza sativa* Grupo Japonica, *glicina max*, *Hordeum vulgare subsp. vulgare*, *Sorghum bicolor*, *Zea mays*, *Heterosigma akashiwo*, *Chlorella vulgaris* UTEX259, *Chlorella*

vulgaris NJ-7, *Chlorella variabilis*, *Ectocarpus siliculosus*, *Volvox carteri* f. *nagariensis*, *Gracilaria tenuistipitata*, *Dunaliella tertiolecta*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Dunaliella viridis*, *Thalassiosira pseudonana* CCMP1335, *Dunaliella salina*, *Phaeodactylum tricornutum*, o *Ostreococcus lucimarinus* CCE9901.

5 El gen de nitrato reductasa heterólogo puede ser un gen de nitrato reductasa con una secuencia de GenBank con el n.º de acceso XP_002513830.1, AAG30576.1, XP_002285831.1, XP_002307415.1, XP_002984312.1, XP_002972481.1, ADN96689.1, P17569.1, ADK77877.1, P39867.1, XP_002301015.1, P27783.1, BAB93534.1, 227925, P11605.1, P17570.1, BAE46746.1, ADV03139.1, BAE96752.1, ACF93242.1, ABW05098.1, 10 227926, P08509.2, P39870.1, AAB18985.1, AAB52786.1, P39868.1, XP_002889158.1, NP_177899.1, P39866.1, ADV03138.1, P36859.1, P23312.1, P39869.1, P43101.1, AAA33712.1, BAA13047.1, BAJ33682.1, NP_001062006.1, AAD38068.1, NP_174901.1, XP_002891229.1, P39865.1, XP_002444490.1, EEC74079.1, NP_001048253.1, P27967.1, XP_002454625.1, NP_001062009.1, P54233.1, P27968.1, XP_002454083.1, P49102.1, 15 ACS44801.1, ABP97095.1, ABJ91208.4, EFN52691.1, CBN78746.1, XP_002955156.1, ACX31652.1, AAL79356.1, AAF17595.1, AAT72293.1, XP_002294410.1, AAP75705.1, AAV66996.1 o XP_001420098.1.

c. Modificación de gen de nitrato reductasa endógeno

20 El tabaco (*Nicotiana tabacum*) tiene dos genes de tabaco NR altamente homólogos, designados *Nia1* y *Nia2*, es decir, dos genes de nitrato reductasa endógenos. El gen de nitrato reductasa desregulado puede ser un gen de nitrato reductasa endógeno que se modificó o sometió a mutagénesis por un sistema de edición de genomas o por un mutagén. 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.

Los procesos para preparar mutantes se conocen bien en la técnica y pueden incluir mutagénesis que usa sustancias químicas adicionadas de manera exógena - tales como compuestos orgánicos mutagénicos, teratogénicos, o carcinogénicos , por ejemplo etil metanosulfonato (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. Lesiones locales inducidas por direccionamiento en genomas (TILLING) también se puede usar como se describe en otra parte.

A manera de un ejemplo adicional, el proceso puede incluir una o más etapas de cruzamiento de plantas. 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 contendrá 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.

(1) Sistema de edición de genomas

El sistema de edición de genomas puede unirse al gen de nitrato reductasa endógeno y escindirlo en una ubicación para generar un polipéptido de nitrato reductasa truncado o un polipéptido de nitrato reductasa con una sustitución de aminoácidos. El gen de nitrato reductasa endógeno se puede modificar por un sistema de edición de genomas que incluye una nucleasa específica del sitio que se une al gen de nitrato reductasa endógeno y lo escinde. El sistema de edición de genomas puede utilizar unión de extremos no homólogos mediada por nucleasas o reparación dirigida por homología. El sistema de edición de genomas se puede introducir en la planta de tabaco modificada por métodos de transformación estable o transformación transitoria.

La nucleasa específica del sitio se puede diseñar. Por ejemplo, una nucleasa específica del sitio diseñada puede ser un sistema basado en CRISPR/Cas9, un ZFN o un TALEN. La nucleasa específica al sitio puede unirse a un gen de nitrato reductasa endógeno y escindirlo. El sistema de edición de genomas puede incluir un sistema CRISPR/Cas diseñado, como un sistema CRISPR/Cas9 diseñado, una nucleasa efectora similar al

activador de la transcripción diseñada, una nucleasa de dedos de zinc diseñada o una meganucleasa diseñada.

(2) Mutágenos

Los mutágenos que crean principalmente mutaciones puntuales y deleciones, inserciones, transversiones, y/o transiciones cortas, incluyendo mutágenos químicos o radiación, pueden usarse para crear las mutaciones en el gen de nitrato reductasa. Los mutágenos incluyen, pero no se limitan a, metanosulfato de etilo, sulfato de metilmetano, N-etil-N-nitrosourea, trietilmelamina, N-metil-N-nitrosourea, procarbazona, 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 similares), dihidrocloruro 2-metoxi-6-cloro-9[3-(etil-2-cloro-etil)aminopropilamino]acridina y formaldehído.

d. Combinación con un gen precursor de alcaloide

El polipéptido de nitrato reductasa desregulada, que se dirige al agente nitrosante, se puede usar en combinación con un gen precursor de alcaloide modificado, que inhibe la producción del precursor de alcaloide nornicotina. La combinación del polipéptido de nitrato reductasa desregulada y el gen precursor de alcaloide modificado puede producir una reducción aun mayor en la acumulación de NNN en comparación con el uso de nitrato reductasa desregulada o un gen precursor de alcaloide modificado solamente. El gen precursor de alcaloide modificado puede reducir una TSNA específica, como N'-nitrososnornicotina, reduciendo los niveles del precursor de alcaloide nornicotina a nornicotina baja más baja. El gen precursor de alcaloide modificado puede ser un gen de nicotina desmetilasa modificado o un gen citocromo P450. El gen precursor de alcaloide modificado puede ser un gen

CYP82E4 modificado, un gen CYP82E5v2 modificado o un gen CYP82E10 modificado y combinaciones de estos. En algunas modalidades, el polipéptido de nitrato reductasa desregulado se puede introducir en una planta de tabaco que tiene una mutación de inactivación en un gen de nicotina desmetilasa endógeno, como una línea de mejoramiento DH98-325-6#775 (Lewis et al. Phytochem. 71:1988-1998 (2010)), o una planta de tabaco con un fondo genético de nicotina desmetilasa mutante triple. En algunas modalidades, el polipéptido de nitrato reductasa desregulado se puede introducir en una planta de tabaco con mutaciones de inactivación en ambos genes de nicotina desmetilasa *CYP82E4* y *CYP82E5*, como la planta de cultivo Burley TN90e4e5, que es una línea que representa una variante derivada por retrocruzamiento de la variedad comercial TN90 y se describe en la solicitud de patente estadounidense n.º 20120216822, que se incorpora en la presente en su totalidad mediante referencia.

3. Construcciones, vector y vector de expresión

En determinadas modalidades, los polinucleótidos que se introducirán en la planta están enlazados operativamente a una secuencia promotora y se pueden proporcionar como una construcción. Como se usa en la presente, un polinucleótido está “enlazado operativamente” cuando se pone en una relación funcional con una segunda secuencia de polinucleótidos. Por ejemplo, un promotor está enlazado operativamente a una secuencia codificante si el promotor está conectado a la secuencia codificante de manera que pueda efectuar la transcripción de la secuencia codificante. En varias modalidades, los polinucleótidos pueden estar enlazados operativamente a al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco o al menos diez promotores.

Las secuencias de ácido nucleico puede constituir una construcción genética que puede ser un vector. El vector puede ser capaz de expresar el polipéptido de nitrato reductasa

desregulada o el sistema de edición de genomas en la célula de una planta. El vector puede ser recombinante. El vector puede comprender un ácido nucleico heterólogo que codifica el polipéptido de nitrato reductasa desregulada o el sistema de edición de genomas. Los vectores adecuados incluye plásmidos y vectores derivados de virus. Los vectores conocidos en la técnica que son adecuados para transformarlos en plantas, clonación y expresión de proteínas se pueden usar. El vector puede ser útil para transfectar células con ácido nucleico que codifica el polipéptido de nitrato reductasa desregulada o el sistema de edición de genomas, donde la célula hospedadora transformada se cultiva y mantiene en condiciones donde se produce la expresión del polipéptido de nitrato reductasa desregulada o el sistema de edición de genomas.

Las construcciones genéticas pueden comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de nitrato reductasa desregulada o el sistema de edición de genomas descrito en la presente. La construcción genética puede estar presente en la célula como una molécula extracromosomal que funciona. La construcción genética puede ser un minicromosoma lineal que incluye centrómero, telómeros o plásmidos o cósmidos. La construcción genética también puede ser parte de un genoma de un vector viral recombinante, incluyendo virus del mosaico del coliflor recombinante, virus del mosaico del tabaco recombinante y vectores basados en el virus de la papa recombinante X. La construcción genética puede ser parte del material genético en microorganismos vivos atenuados o vectores microbianos recombinantes que pueden vivir en células. Las construcciones genéticas pueden comprender elementos de regulación para la expresión de genes de las secuencias codificantes del ácido nucleico. Los elementos de regulación pueden ser un promotor, un promotor, un codón de inicio, un codón de detención o una señal de poliadenilación.

El vector puede comprender ácido nucleico heterólogo que codifica el polipéptido de nitrato reductasa desregulada y también puede comprender un codón de inicio, que puede estar corriente arriba de la secuencia codificante del polipéptido de nitrato reductasa desregulada y un codón de detención, que puede estar corriente abajo de la secuencia codificante del polipéptido de nitrato reductasa desregulada. El codón de inicio y terminación pueden estar en marco con la secuencia codificante del polipéptido de nitrato reductasa desregulada. El vector también puede comprender un promotor que está enlazado operativamente a la secuencia codificante del polipéptido de nitrato reductasa desregulada. El promotor que está enlazado operativamente a la secuencia codificante del polipéptido de nitrato reductasa desregulada puede no estar asociado naturalmente con el polinucleótido que codifica el polipéptido de nitrato reductasa desregulada. Los promotores útiles en la puesta en práctica de la presente invención incluyen, entre otros, promotores constitutivos, inducibles, regulados temporalmente, regulados desde el punto de vista del desarrollo, regulados químicamente, preferidos del tejido y específicos del tejido. De manera adecuada, el promotor provoca una expresión suficiente en la planta para producir los fenotipos descritos en la presente. Los promotores adecuados incluyen, sin limitación, el promotor del virus del mosaico del coliflor 35S, el promotor *CYP82E4*, ubiquitina, promotor constitutivo críptico tCUP, el promotor Rsyn7, promotores inducibles por patógenos, el promotor del maíz In2-2, el promotor del tabaco PR-1a, promotores inducibles por glucocorticoides y promotores inducibles por tetraciclina y reprimibles por tetraciclina.

El vector también puede comprender una señal de poliadenilación, que puede estar corriente abajo de la secuencia codificante de polipéptido de nitrato reductasa desregulada. El vector también puede comprender un potenciador corriente arriba de la secuencia codificante de polipéptido de nitrato reductasa desregulada. El potenciador puede ser necesario para la expresión de ADN. El vector también puede comprender un origen de

replicación vegetal para mantener el vector extracromosomalmente y producir múltiples copias del vector en una célula. El vector también puede comprender una secuencia reguladora, que puede estar bien adaptada para la expresión de genes en una célula de una planta a la que se administra el vector. El vector también puede comprender un gen reportero, como una proteína fluorescente verde (“GFP”) y/o un marcador seleccionable, como higromicina (“Hygro”).

Las secuencias codificantes se pueden optimizar con fines de estabilidad y altos niveles de expresión. En algunos casos, los codones se seleccionan para reducir la formación de estructura secundaria del ARN como la formada debido a la unión intramolecular.

El vector pueden ser vectores de expresión o sistemas para producir proteínas por técnicas de rutina y materiales de partida fácilmente disponibles incluyendo Sambrook et al., 1989, que se incorpora en su totalidad mediante referencia. En algunas modalidades, el vector puede comprender la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de nitrato reductasa desregulada. El vector puede ser pBI121.

4. Transformación vegetal

El polinucleótido que codifica la nitrato reductasa desregulada se puede introducir en una célula vegetal para producir una planta transgénica. Como se usa en la presente, “introducir en una planta”, respecto de polinucleótidos abarca el suministro de un polinucleótido a una planta, tejido de planta o célula de planta usando cualquier método de suministro de polinucleótido adecuado. Los métodos adecuados para introducir polinucleótidos en una planta útiles en la puesta en práctica de la presente invención incluyen, entre otros, el método de congelado-descongelado, bombardeo de micropartículas, absorción de ADN directa, electroporación, sonicación, microinyección, transferencia mediada por virus de planta y mediada por *Agrobacterium* a la planta. Cualquier cepa, vector o sistema de vector

de *Agrobacterium* adecuado para transformar la planta se puede emplear de conformidad con la presente invención. En determinadas modalidades, el polinucleótido se introduce usando al menos uno de un método de transformación estable, método de transformación transitoria o método mediado por virus.

5 “Transformación estable” significa que la construcción de nucleótidos introducida en una planta se integra en el genoma de la planta y puede ser heredada por su progenie. Por ejemplo, el nucleótido introducido y/o gen marcador seleccionable unido, como el sistema de edición de genomas, se puede segregar en posteriores generaciones de la planta usando técnicas de mejoramiento convencionales.

10 “Transformación transitoria” significa que una construcción de nucleótidos introducida en una planta no se integra en el genoma de la planta. Una planta o célula vegetal puede, además, transformarse transitoriamente de manera que el polinucleótido recombinante no se integra en su genoma. Las células transformadas transitoriamente típicamente pierden todo o alguna porción del polinucleótido recombinante introducido con cada división celular,
15 de manera que el polinucleótido recombinante introducido no puede detectarse en las células hijas después de un suficiente número de divisiones celulares. Por ejemplo, las células vegetales pueden transformarse inicialmente con el sistema de edición de genomas que carece de un marcador seleccionable y pueden cultivarse en medios que carecen de un agente de selección. En estas condiciones, una fracción de las células tratadas adquirirá el
20 sistema de edición de genomas y expresará el sistema de edición de genomas de manera transitoria sin integrar el sistema de edición de genomas 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.

Métodos adecuados para introducir secuencias de nucleótidos en células vegetales y su posterior inserción en el genoma de la planta incluyen microinyección (Crossway et al., *Biotechniques* 4:320-334 (1986)), electroporación (Riggs et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 83:5602-5606 (1986)), transformación mediada por *Agrobacterium* (patentes estadounidenses n.º 5,981,840 y 5,563,055), transferencia directa de genes (Paszkowski et al., *EMBO J.* 3:2717-2722 (1984)) y aceleración de partículas balística (véase, por ejemplo, patentes estadounidenses n.º 4,945,050; 5,879,918; 5,886,244; 5,932,782; Tomes et al., en *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture: Fundamental Methods*, ed. Gamborg and Phillips (Springer-Verlag, Berlín) (1995); y McCabe et al., *Biotechnology* 6:923-926 (1988)), todas las cuales se incorporan en su totalidad en la presente mediante referencia.

En algunas modalidades, una planta se puede regenerar o cultivar a partir de la planta, tejido de planta o célula de planta. Cualquier método adecuado para regenerar o cultivar una planta a partir de una célula de planta o tejido de planta se puede usar, tal como, entre otros, cultivo de tejido o regeneración de protoplastos. De manera adecuada, las plantas se pueden regenerar cultivando células de planta transformadas en medio de inducción de callos, medio de inducción de tallo y/o medio de inducción de raíz. Véase, por ejemplo, McCormick et al., *Plant Cell Reports* 5:81-84 (1986). Estas plantas luego puede cultivarse y polinarse con la misma cepa transformada o cepas diferentes y el híbrido resultante tendrá la expresión de la característica fenotípica deseada identificada. Se pueden cultivar dos o más generaciones para asegurar que la expresión de la característica fenotípica deseada se mantenga de manera estable y se herede y luego cosechar las semillas para asegurar que se logre la expresión de la característica fenotípica deseada. Por lo tanto, como se usa en la presente, “semillas de transformación” se refieren a semillas que contienen la construcción de nucleótidos integrada establemente en el genoma de la planta.

5. Variedades de tabaco

Las variedades de tabaco que se pueden modificar de conformidad con los métodos descritos incluyen, entre otras, variedades oscuras (p. ej., Burley), variedades de humo o brillante (p. ej., humo de Virginia), variedades orientales o turcas, como Latakia y variedades modificadas genéticamente (p. ej., Vector 2141). Los tabacos Burley generalmente acumulan mayores niveles de nitrato que otros tipos de tabaco y tienden a contribuir a una parte desproporcionada de las TSNA encontradas en el estilo común “mezcla americana” de cigarrillos (que también contiene tabacos orientales curados en atmósfera artificial).

6. Producto de tabaco con nitrosaminas específicas del tabaco reducidas

La presente invención se refiere, en un aspecto, a un producto de tabaco con nitrosaminas específicas del tabaco (TSNA) reducidas. Las TSNA se producen durante el proceso de curado del tabaco y mientras se fuma. Las TSNA se forman por una reacción entre un agente nitrosante y alcaloides encontrados naturalmente en el tabaco y también son carcinógenos en el humo del tabaco. El producto de tabaco se produce a partir de la planta de tabaco modificada, como se describe anteriormente.

Las plantas de tabaco modificadas pueden ser recién cosechadas, curadas y procesadas en productos de tabaco que presentan un potencial carcinogénico reducido. Las hojas pueden curarse al aire, curarse al fuego, curarse al humo o curarse al sol. El tabaco curado al aire se cuelga en graneros bien ventilados y se deja secar por un período de cuatro a ocho semanas. El tabaco curado al aire es bajo en azúcar, lo que le brinda al humo de tabaco un sabor suave, y es alto en nicotina. Los puros y tabacos Burley se curan al aire “en oscuridad”. El tabaco curado al fuego se cuelga en graneros grandes donde los fuegos de maderas duras se mantienen ardiendo de forma continua o baja intermitente y toma entre

tres días y diez semanas, dependiendo del proceso y el tabaco. El curado al fuego produce un tabaco bajo en azúcar y alto en nicotina. El tabaco curado en atmósfera artificial se ensartaba originalmente en palillos de tabaco, que luego se colgaban de postes de niveles en graneros de curado. Estos graneros tienen humeros de cajas de incendio alimentadas desde el exterior que curan el tabaco al calor sin exponerlo al humo, elevando lentamente la temperatura durante el transcurso del curado. El proceso generalmente lleva aproximadamente una semana y produce tabaco de cigarrillo con alto contenido de azúcar y niveles medio a alto de nicotina. La mayoría de los cigarrillos incorporan tabaco curado en atmósfera artificial, que produce un humo más suave y más inhalable. El tabaco curado al sol se seca destapado al sol. Este método se usa en Turquía, Grecia y otros países mediterráneos para producir tabaco oriental. El tabaco curado al sol es bajo en azúcar y nicotina y se usa en cigarrillos.

Los productos de tabaco incluyendo, entre otros, materiales para fumar (p. ej., cigarrillos, cigarros, tabaco de pipa, tabaco de shisha saborizado), rapé, tabaco de inmersión, sustitutos del cigarrillo, como parche de nicotina, enjuague bucal de nicotina, agente pulverizador empaquetado en un tanque de gas de alta presión con propulsor, chicle de nicotina y bebida y pastillas de nicotina preparadas a partir de dichas plantas de tabaco modificadas también son modalidades. Los productos de tabaco que se utilizan como líquidos electrónicos o solución de nicotina para cigarrillos electrónicos, vaporizador personal o sistemas de suministro de nicotina electrónicos también son modalidades.

Los productos de tabaco producidos a partir de las plantas de tabaco modificadas descritas en la presente pueden tener niveles reducidos de TSNA en comparación con los productos de tabaco producidos a partir de una planta de tabaco de control, como un control de planta de tabaco de tipo salvaje. En algunas modalidades, los productos de tabaco producidos a partir de las plantas de tabaco modificadas pueden tener niveles reducidos de TSNA total en

comparación con los productos de tabaco producidos a partir de una planta de tabaco de control, como una planta de control de tabaco de tipo salvaje. En algunas modalidades, los productos de tabaco producidos a partir de las plantas de tabaco modificadas pueden tener niveles reducidos de al menos una TSNA incluyendo, entre otras *N*-nitrosonornicotina (NNN), 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK), *N*-nitrosoanabasina (NAB), *N*-nitrosoanatabina (NAT) y combinaciones de estas, en comparación con el tabaco de la misma variedad y cultivado por técnicas convencionales o un producto de tabaco preparado a partir de tabaco convencional.

El producto de tabaco producido a partir de hojas curadas de la planta de tabaco modificada puede tener una reducción de al menos aproximadamente 5.0%, una reducción de al menos aproximadamente 10.0%, una reducción de al menos aproximadamente 15.0%, una reducción de al menos aproximadamente 20.0%, una reducción de al menos aproximadamente 25.0%, una reducción de al menos aproximadamente 30.0%, una reducción de al menos aproximadamente 35.0%, una reducción de al menos aproximadamente 40.0%, una reducción de al menos aproximadamente 45.0%, una reducción de al menos aproximadamente 50.0%, una reducción de al menos aproximadamente 55.0%, una reducción de al menos aproximadamente 60.0%, una reducción de al menos aproximadamente 65.0%, una reducción de al menos aproximadamente 70.0%, una reducción de al menos aproximadamente 75.0%, una reducción de al menos aproximadamente 80.0%, una reducción de al menos aproximadamente 85.0%, una reducción de al menos aproximadamente 90.0%, una reducción de al menos aproximadamente 95.0% o una reducción de al menos aproximadamente 99.0% en los niveles de TSNA totales en comparación con un producto de tabaco de control que se produce a partir de hojas curadas de una planta de tabaco de control. El producto de tabaco producido a partir de hojas curadas de la planta de tabaco

modificada puede tener de aproximadamente 5.0% a aproximadamente 99.0%,
 aproximadamente 5.0% a aproximadamente 95.0%, aproximadamente 5.0% a
 aproximadamente 90.0%, aproximadamente 5.0% a aproximadamente 85.0%,
 aproximadamente 5.0% a aproximadamente 80.0%, aproximadamente 5.0% a
 5 aproximadamente 75.0%, aproximadamente 5.0% a aproximadamente 70.0%,
 aproximadamente 5.0% a aproximadamente 65.0%, aproximadamente 5.0% a
 aproximadamente 60.0%, aproximadamente 5.0% a aproximadamente 55.0%,
 aproximadamente 5.0% a aproximadamente 50.0%, aproximadamente 5.0% a
 aproximadamente 45.0%, aproximadamente 5.0% a aproximadamente 40.0%,
 10 aproximadamente 10.0% a aproximadamente 99.0%, aproximadamente 10.0% a
 aproximadamente 95.0%, aproximadamente 10.0% a aproximadamente 90.0%,
 aproximadamente 10.0% a aproximadamente 85.0%, aproximadamente 10.0% a
 aproximadamente 80.0%, aproximadamente 10.0% a aproximadamente 75.0%,
 aproximadamente 10.0% a aproximadamente 70.0%, aproximadamente 10.0% a
 15 aproximadamente 65.0%, aproximadamente 10.0% a aproximadamente 60.0%,
 aproximadamente 10.0% a aproximadamente 55.0%, aproximadamente 10.0% a
 aproximadamente 50.0%, aproximadamente 10.0% a aproximadamente 45.0%,
 aproximadamente 10.0% a aproximadamente 40.0%, aproximadamente 20.0% a
 aproximadamente 99.0%, aproximadamente 20.0% a aproximadamente 95.0%,
 20 aproximadamente 20.0% a aproximadamente 90.0%, aproximadamente 20.0% a
 aproximadamente 85.0%, aproximadamente 20.0% a aproximadamente 80.0%,
 aproximadamente 20.0% a aproximadamente 75.0%, aproximadamente 20.0% a
 aproximadamente 70.0%, aproximadamente 20.0% a aproximadamente 65.0%,
 aproximadamente 20.0% a aproximadamente 60.0%, aproximadamente 20.0% a
 25 aproximadamente 55.0%, aproximadamente 20.0% a aproximadamente 50.0%,

aproximadamente 20.0% a aproximadamente 45.0%, aproximadamente 20.0% a
 aproximadamente 40.0%, aproximadamente 30.0% a aproximadamente 99.0%,
 aproximadamente 30.0% a aproximadamente 95.0%, aproximadamente 30.0% a
 aproximadamente 90.0%, aproximadamente 30.0% a aproximadamente 85.0%,
 5 aproximadamente 30.0% a aproximadamente 80.0%, aproximadamente 30.0% a
 aproximadamente 75.0%, aproximadamente 30.0% a aproximadamente 70.0%,
 aproximadamente 30.0% a aproximadamente 65.0%, aproximadamente 30.0% a
 aproximadamente 60.0%, aproximadamente 30.0% a aproximadamente 55.0%,
 aproximadamente 30.0% a aproximadamente 50.0%, aproximadamente 30.0% a
 10 aproximadamente 45.0%, aproximadamente 30.0% a aproximadamente 40.0%,
 aproximadamente 40.0% a aproximadamente 99.0%, aproximadamente 40.0% a
 aproximadamente 95.0%, aproximadamente 40.0% a aproximadamente 90.0%,
 aproximadamente 40.0% a aproximadamente 85.0%, aproximadamente 40.0% a
 aproximadamente 80.0%, aproximadamente 40.0% a aproximadamente 75.0%,
 15 aproximadamente 40.0% a aproximadamente 70.0%, aproximadamente 40.0% a
 aproximadamente 65.0%, aproximadamente 40.0% a aproximadamente 60.0%,
 aproximadamente 40.0% a aproximadamente 55.0%, aproximadamente 40.0% a
 aproximadamente 50.0%, aproximadamente 50.0% a aproximadamente 99.0%,
 aproximadamente 50.0% a aproximadamente 95.0%, aproximadamente 50.0% a
 20 aproximadamente 90.0%, aproximadamente 50.0% a aproximadamente 85.0%,
 aproximadamente 50.0% a aproximadamente 80.0%, aproximadamente 50.0% a
 aproximadamente 75.0%, aproximadamente 50.0% a aproximadamente 70.0%,
 aproximadamente 50.0% a aproximadamente 65.0%, aproximadamente 50.0% a
 aproximadamente 60.0%, aproximadamente 50.0% a aproximadamente 55.0%,
 25 aproximadamente 60.0% a aproximadamente 99.0%, aproximadamente 60.0% a

aproximadamente 95.0%, aproximadamente 60.0% a aproximadamente 90.0%,
aproximadamente 60.0% a aproximadamente 85.0%, aproximadamente 60.0% a
aproximadamente 80.0%, aproximadamente 60.0% a aproximadamente 75.0%,
aproximadamente 60.0% a aproximadamente 70.0% o aproximadamente 60.0% a
5 aproximadamente 65.0% de reducción en los niveles de TSNA totales en comparación con
un producto de tabaco de control que se produce a partir de hojas curadas de una planta de
tabaco de control.

El producto de tabaco producido a partir de hojas curadas de la planta de tabaco modificada
puede tener una reducción de al menos aproximadamente 5.0%, una reducción de al menos
10 aproximadamente 10.0%, una reducción de al menos aproximadamente 15.0%, una
reducción de al menos aproximadamente 20.0%, una reducción de al menos
aproximadamente 25.0%, una reducción de al menos aproximadamente 30.0%, una
reducción de al menos aproximadamente 35.0%, una reducción de al menos
aproximadamente 40.0%, una reducción de al menos aproximadamente 45.0%, una
15 reducción de al menos aproximadamente 50.0%, una reducción de al menos
aproximadamente 55.0%, una reducción de al menos aproximadamente 60.0%, una
reducción de al menos aproximadamente 65.0%, una reducción de al menos
aproximadamente 70.0%, una reducción de al menos aproximadamente 72.0%, una
reducción de al menos aproximadamente 72.5%, una reducción de al menos
20 aproximadamente 73.0%, una reducción de al menos aproximadamente 75.0%, una
reducción de al menos aproximadamente 80.0%, una reducción de al menos
aproximadamente 85.0%, una reducción de al menos aproximadamente 90.0%, una
reducción de al menos aproximadamente 95.0% o una reducción de al menos
aproximadamente 99.0% en los niveles de al menos una TSNA que incluye, entre otros, *N*-
25 nitrosonornicotina (NNN), 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK), *N*-

nitrosoanabasina (NAB), N-nitrosoanatabina (NAT) y combinaciones de estas, en comparación con un producto de tabaco de control que se produce a partir de hojas curadas de una planta de tabaco de control. El producto de tabaco producido a partir de hojas curadas de la planta de tabaco modificada puede tener de aproximadamente 5.0% a

5 aproximadamente 99.0%, aproximadamente 5.0% a aproximadamente 95.0%, aproximadamente 5.0% a aproximadamente 90.0%, aproximadamente 5.0% a aproximadamente 85.0%, aproximadamente 5.0% a aproximadamente 80.0%, aproximadamente 5.0% a aproximadamente 75.0%, aproximadamente 5.0% a aproximadamente 70.0%, aproximadamente 5.0% a aproximadamente 65.0%,

10 aproximadamente 5.0% a aproximadamente 60.0%, aproximadamente 5.0% a aproximadamente 55.0%, aproximadamente 5.0% a aproximadamente 50.0%, aproximadamente 5.0% a aproximadamente 45.0%, aproximadamente 5.0% a aproximadamente 40.0%, aproximadamente 10.0% a aproximadamente 99.0%, aproximadamente 10.0% a aproximadamente 95.0%, aproximadamente 10.0% a

15 aproximadamente 90.0%, aproximadamente 10.0% a aproximadamente 85.0%, aproximadamente 10.0% a aproximadamente 80.0%, aproximadamente 10.0% a aproximadamente 75.0%, aproximadamente 10.0% a aproximadamente 70.0%, aproximadamente 10.0% a aproximadamente 65.0%, aproximadamente 10.0% a aproximadamente 60.0%, aproximadamente 10.0% a aproximadamente 55.0%,

20 aproximadamente 10.0% a aproximadamente 50.0%, aproximadamente 10.0% a aproximadamente 45.0%, aproximadamente 10.0% a aproximadamente 40.0%, aproximadamente 20.0% a aproximadamente 99.0%, aproximadamente 20.0% a aproximadamente 95.0%, aproximadamente 20.0% a aproximadamente 90.0%, aproximadamente 20.0% a aproximadamente 85.0%, aproximadamente 20.0% a

25 aproximadamente 80.0%, aproximadamente 20.0% a aproximadamente 75.0%,

aproximadamente 20.0% a aproximadamente 70.0%, aproximadamente 20.0% a
 aproximadamente 65.0%, aproximadamente 20.0% a aproximadamente 60.0%,
 aproximadamente 20.0% a aproximadamente 55.0%, aproximadamente 20.0% a
 aproximadamente 50.0%, aproximadamente 20.0% a aproximadamente 45.0%,
 5 aproximadamente 20.0% a aproximadamente 40.0%, aproximadamente 30.0% a
 aproximadamente 99.0%, aproximadamente 30.0% a aproximadamente 95.0%,
 aproximadamente 30.0% a aproximadamente 90.0%, aproximadamente 30.0% a
 aproximadamente 85.0%, aproximadamente 30.0% a aproximadamente 80.0%,
 aproximadamente 30.0% a aproximadamente 75.0%, aproximadamente 30.0% a
 10 aproximadamente 70.0%, aproximadamente 30.0% a aproximadamente 65.0%,
 aproximadamente 30.0% a aproximadamente 60.0%, aproximadamente 30.0% a
 aproximadamente 55.0%, aproximadamente 30.0% a aproximadamente 50.0%,
 aproximadamente 30.0% a aproximadamente 45.0%, aproximadamente 30.0% a
 aproximadamente 40.0%, aproximadamente 40.0% a aproximadamente 99.0%,
 15 aproximadamente 40.0% a aproximadamente 95.0%, aproximadamente 40.0% a
 aproximadamente 90.0%, aproximadamente 40.0% a aproximadamente 85.0%,
 aproximadamente 40.0% a aproximadamente 80.0%, aproximadamente 40.0% a
 aproximadamente 75.0%, aproximadamente 40.0% a aproximadamente 70.0%,
 aproximadamente 40.0% a aproximadamente 65.0%, aproximadamente 40.0% a
 20 aproximadamente 60.0%, aproximadamente 40.0% a aproximadamente 55.0%,
 aproximadamente 40.0% a aproximadamente 50.0%, aproximadamente 50.0% a
 aproximadamente 99.0%, aproximadamente 50.0% a aproximadamente 95.0%,
 aproximadamente 50.0% a aproximadamente 90.0%, aproximadamente 50.0% a
 aproximadamente 85.0%, aproximadamente 50.0% a aproximadamente 80.0%,
 25 aproximadamente 50.0% a aproximadamente 75.0%, aproximadamente 50.0% a

aproximadamente 70.0%, aproximadamente 50.0% a aproximadamente 65.0%,
aproximadamente 50.0% a aproximadamente 60.0%, aproximadamente 50.0% a
aproximadamente 55.0%, aproximadamente 60.0% a aproximadamente 99.0%,
aproximadamente 60.0% a aproximadamente 95.0%, aproximadamente 60.0% a
5 aproximadamente 90.0%, aproximadamente 60.0% a aproximadamente 85.0%,
aproximadamente 60.0% a aproximadamente 80.0%, aproximadamente 60.0% a
aproximadamente 75.0%, aproximadamente 60.0% a aproximadamente 70.0% o
aproximadamente 60.0% a aproximadamente 65.0% en los niveles de al menos una TSNA
que incluye, entre otros, *N*-nitrosonornicotina (NNN), 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-
10 butanona (NNK), *N*-nitrosoanabasina (NAB), *N*-nitrosoanatabina (NAT) y combinaciones de
estas, en comparación con un producto de tabaco de control que se produce a partir de
hojas curadas de una planta de tabaco de control.

7. Picadura de tabaco y humo de tabaco con nitrosaminas específicas del tabaco reducidas

15 La presente invención se refiere, en un aspecto, a un producto de tabaco con nitrosaminas
específicas del tabaco (TSNA) reducidas en el humo obtenido de la combustión de hojas al
fumarse, es decir, humo de tabaco. El contenido de TSNA en el humo principal de
cigarrillos luego de la combustión depende de los siguientes factores: (1) la cantidad de
TSNA preexistentes en la picadura; (2) la eficacia de la transferencia de las TSNA
20 preexistentes de la picadura al humo; (3) el alcance de la destrucción de TSNA
preexistentes mediante pirólisis y (4) el alcance de la formación de nuevas TSNA mediante
pirosíntesis. El humo de tabaco se produce a partir de las plantas de tabaco modificadas,
como se describe anteriormente, que tienen niveles reducidos de nitrato libre en

comparación con una planta de tabaco de control, como un control de planta de tabaco de tipo salvaje.

La picadura de tabaco o el humo de tabaco producidos a partir de las plantas de tabaco modificadas descritas en la presente pueden tener niveles reducidos de TSNA en comparación con la picadura de tabaco o el humo de tabaco producidos a partir de una planta de tabaco de control, como un control de planta de tabaco de tipo salvaje. En algunas modalidades, la picadura de tabaco o el humo de tabaco producidos a partir de las plantas de tabaco modificadas pueden tener niveles reducidos de TSNA en comparación con la picadura de tabaco o el humo de tabaco producidos a partir de una planta de tabaco de control, como un control de planta de tabaco de tipo salvaje. En algunas modalidades, la picadura de tabaco o el humo de tabaco producidos a partir de las plantas de tabaco modificadas pueden tener niveles reducidos de al menos una TSNA incluyendo, entre otras *N*-nitrosonornicotina (NNN), 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK), *N*-nitrosoanabasina (NAB), *N*-nitrosoanatabina (NAT) y combinaciones de estas, en comparación con la picadura de tabaco o el humo de tabaco producidos a partir del tabaco de la misma variedad y cultivado por técnicas convencionales o un producto de tabaco preparado a partir de tabaco convencional.

La picadura de tabaco o el humo de tabaco producidos a partir de la planta de tabaco modificada pueden tener una reducción de al menos aproximadamente 5.0%, una reducción de al menos aproximadamente 10.0%, una reducción de al menos aproximadamente 15.0%, una reducción de al menos aproximadamente 20.0%, una reducción de al menos aproximadamente 25.0%, una reducción de al menos aproximadamente 30.0%, una reducción de al menos aproximadamente 32.0%, una reducción de al menos aproximadamente 35.0%, una reducción de al menos aproximadamente 40.0%, una reducción de al menos aproximadamente 44.0%, una reducción de al menos

aproximadamente 45.0%, una reducción de al menos aproximadamente 50.0%, una reducción de al menos aproximadamente 52.0%, una reducción de al menos aproximadamente 55.0%, una reducción de al menos aproximadamente 60.0%, una reducción de al menos aproximadamente 64.0%, una reducción de al menos aproximadamente 65.0%, una reducción de al menos aproximadamente 70.0%, una reducción de al menos aproximadamente 72.0%, una reducción de al menos aproximadamente 72.5%, una reducción de al menos aproximadamente 73.0%, una reducción de al menos aproximadamente 75.0%, una reducción de al menos aproximadamente 80.0%, una reducción de al menos aproximadamente 85.0%, una reducción de al menos aproximadamente 90.0%, una reducción de al menos aproximadamente 95.0% o una reducción de al menos aproximadamente 99.0% en los niveles de TSNA total o en los niveles de al menos una TSNA que incluye, entre otros, *N*-nitrosonornicotina (NNN), 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK), *N*-nitrosoanabasina (NAB), *N*-nitrosoanatabina (NAT) y combinaciones de estos, en comparación con la picadura de tabaco producida a partir de una picadura de tabaco de control que se produce a partir de una planta de tabaco de control.

La picadura de tabaco producida a partir del producto de tabaco puede tener de aproximadamente 5.0% a aproximadamente 99.0%, aproximadamente 5.0% a aproximadamente 95.0%, aproximadamente 5.0% a aproximadamente 90.0%, aproximadamente 5.0% a aproximadamente 85.0%, aproximadamente 5.0% a aproximadamente 80.0%, aproximadamente 5.0% a aproximadamente 75.0%, aproximadamente 5.0% a aproximadamente 70.0%, aproximadamente 5.0% a aproximadamente 65.0%, aproximadamente 5.0% a aproximadamente 60.0%, aproximadamente 5.0% a aproximadamente 55.0%, aproximadamente 5.0% a aproximadamente 50.0%, aproximadamente 5.0% a aproximadamente 45.0%,

aproximadamente 5.0% a aproximadamente 40.0%, aproximadamente 10.0% a
 aproximadamente 99.0%, aproximadamente 10.0% a aproximadamente 95.0%,
 aproximadamente 10.0% a aproximadamente 90.0%, aproximadamente 10.0% a
 aproximadamente 85.0%, aproximadamente 10.0% a aproximadamente 80.0%,
 5 aproximadamente 10.0% a aproximadamente 75.0%, aproximadamente 10.0% a
 aproximadamente 70.0%, aproximadamente 10.0% a aproximadamente 65.0%,
 aproximadamente 10.0% a aproximadamente 60.0%, aproximadamente 10.0% a
 aproximadamente 55.0%, aproximadamente 10.0% a aproximadamente 50.0%,
 aproximadamente 10.0% a aproximadamente 45.0%, aproximadamente 10.0% a
 10 aproximadamente 40.0%, aproximadamente 20.0% a aproximadamente 99.0%,
 aproximadamente 20.0% a aproximadamente 95.0%, aproximadamente 20.0% a
 aproximadamente 90.0%, aproximadamente 20.0% a aproximadamente 85.0%,
 aproximadamente 20.0% a aproximadamente 80.0%, aproximadamente 20.0% a
 aproximadamente 75.0%, aproximadamente 20.0% a aproximadamente 70.0%,
 15 aproximadamente 20.0% a aproximadamente 65.0%, aproximadamente 20.0% a
 aproximadamente 60.0%, aproximadamente 20.0% a aproximadamente 55.0%,
 aproximadamente 20.0% a aproximadamente 50.0%, aproximadamente 20.0% a
 aproximadamente 45.0%, aproximadamente 20.0% a aproximadamente 40.0%,
 aproximadamente 30.0% a aproximadamente 99.0%, aproximadamente 30.0% a
 20 aproximadamente 95.0%, aproximadamente 30.0% a aproximadamente 90.0%,
 aproximadamente 30.0% a aproximadamente 85.0%, aproximadamente 30.0% a
 aproximadamente 80.0%, aproximadamente 30.0% a aproximadamente 75.0%,
 aproximadamente 30.0% a aproximadamente 70.0%, aproximadamente 30.0% a
 aproximadamente 65.0%, aproximadamente 30.0% a aproximadamente 60.0%,
 25 aproximadamente 30.0% a aproximadamente 55.0%, aproximadamente 30.0% a

5 aproximadamente 50.0%, aproximadamente 30.0% a aproximadamente 45.0%,
 aproximadamente 30.0% a aproximadamente 40.0%, aproximadamente 40.0% a
 aproximadamente 99.0%, aproximadamente 40.0% a aproximadamente 95.0%,
 aproximadamente 40.0% a aproximadamente 90.0%, aproximadamente 40.0% a
 10 aproximadamente 85.0%, aproximadamente 40.0% a aproximadamente 80.0%,
 aproximadamente 40.0% a aproximadamente 75.0%, aproximadamente 40.0% a
 aproximadamente 70.0%, aproximadamente 40.0% a aproximadamente 65.0%,
 aproximadamente 40.0% a aproximadamente 60.0%, aproximadamente 40.0% a
 aproximadamente 55.0%, aproximadamente 40.0% a aproximadamente 50.0%,
 15 aproximadamente 50.0% a aproximadamente 99.0%, aproximadamente 50.0% a
 aproximadamente 95.0%, aproximadamente 50.0% a aproximadamente 90.0%,
 aproximadamente 50.0% a aproximadamente 85.0%, aproximadamente 50.0% a
 aproximadamente 80.0%, aproximadamente 50.0% a aproximadamente 75.0%,
 aproximadamente 50.0% a aproximadamente 70.0%, aproximadamente 50.0% a
 20 aproximadamente 65.0%, aproximadamente 50.0% a aproximadamente 60.0%,
 aproximadamente 50.0% a aproximadamente 55.0%, aproximadamente 60.0% a
 aproximadamente 99.0%, aproximadamente 60.0% a aproximadamente 95.0%,
 aproximadamente 60.0% a aproximadamente 90.0%, aproximadamente 60.0% a
 aproximadamente 85.0%, aproximadamente 60.0% a aproximadamente 80.0%,
 aproximadamente 60.0% a aproximadamente 75.0%, aproximadamente 60.0% a
 aproximadamente 70.0% o aproximadamente 60.0% a aproximadamente 65.0% en los
 niveles de TSNA total o en los niveles de al menos un TSNA que incluye, entre otros, *N*-
 nitrosonornicotina (NNN), 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK), *N*-
 nitrosoanabasina (NAB), *N*-nitrosoanatabina (NAT) y combinaciones de estos, en

comparación con la picadura de tabaco producida a partir de una picadura de tabaco de control que se produce a partir de una planta de tabaco de control

El humo de tabaco generado a partir del producto de tabaco puede tener una reducción de al menos aproximadamente 5.0%, una reducción de al menos aproximadamente 10.0%, una reducción de al menos aproximadamente 15.0%, una reducción de al menos aproximadamente 20.0%, una reducción de al menos aproximadamente 25.0%, una reducción de al menos aproximadamente 30.0%, una reducción de al menos aproximadamente 32.0%, una reducción de al menos aproximadamente 35.0%, una reducción de al menos aproximadamente 40.0%, una reducción de al menos aproximadamente 44.0%, una reducción de al menos aproximadamente 45.0%, una reducción de al menos aproximadamente 50.0%, una reducción de al menos aproximadamente 52.0%, una reducción de al menos aproximadamente 55.0%, una reducción de al menos aproximadamente 60.0%, una reducción de al menos aproximadamente 64.0%, una reducción de al menos aproximadamente 65.0%, una reducción de al menos aproximadamente 70.0%, una reducción de al menos aproximadamente 72.0%, una reducción de al menos aproximadamente 72.5%, una reducción de al menos aproximadamente 73.0%, una reducción de al menos aproximadamente 75.0%, una reducción de al menos aproximadamente 80.0%, una reducción de al menos aproximadamente 85.0%, una reducción de al menos aproximadamente 90.0%, una reducción de al menos aproximadamente 95.0% o una reducción de al menos aproximadamente 99.0% en los niveles de TSNA total o en los niveles de al menos un TSNA que incluye, entre otros, *N*-nitrosonornicotina (NNN), 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK), *N*-nitrosoanabasina (NAB), *N*-nitrosoanatabina (NAT) y combinaciones de estos, en comparación con el humo de tabaco de un producto de tabaco de control producido a partir de una planta de tabaco de control.

El humo de tabaco generado a partir del producto de tabaco puede tener de aproximadamente 5.0% a aproximadamente 99.0%, aproximadamente 5.0% a aproximadamente 95.0%, aproximadamente 5.0% a aproximadamente 90.0%, aproximadamente 5.0% a aproximadamente 85.0%, aproximadamente 5.0% a aproximadamente 80.0%, aproximadamente 5.0% a aproximadamente 75.0%, aproximadamente 5.0% a aproximadamente 70.0%, aproximadamente 5.0% a aproximadamente 65.0%, aproximadamente 5.0% a aproximadamente 60.0%, aproximadamente 5.0% a aproximadamente 55.0%, aproximadamente 5.0% a aproximadamente 50.0%, aproximadamente 5.0% a aproximadamente 45.0%, aproximadamente 5.0% a aproximadamente 40.0%, aproximadamente 10.0% a aproximadamente 99.0%, aproximadamente 10.0% a aproximadamente 95.0%, aproximadamente 10.0% a aproximadamente 90.0%, aproximadamente 10.0% a aproximadamente 85.0%, aproximadamente 10.0% a aproximadamente 80.0%, aproximadamente 10.0% a aproximadamente 75.0%, aproximadamente 10.0% a aproximadamente 70.0%, aproximadamente 10.0% a aproximadamente 65.0%, aproximadamente 10.0% a aproximadamente 60.0%, aproximadamente 10.0% a aproximadamente 55.0%, aproximadamente 10.0% a aproximadamente 50.0%, aproximadamente 10.0% a aproximadamente 45.0%, aproximadamente 10.0% a aproximadamente 40.0%, aproximadamente 20.0% a aproximadamente 99.0%, aproximadamente 20.0% a aproximadamente 95.0%, aproximadamente 20.0% a aproximadamente 90.0%, aproximadamente 20.0% a aproximadamente 85.0%, aproximadamente 20.0% a aproximadamente 80.0%, aproximadamente 20.0% a aproximadamente 75.0%, aproximadamente 20.0% a aproximadamente 70.0%, aproximadamente 20.0% a aproximadamente 65.0%, aproximadamente 20.0% a aproximadamente 60.0%, aproximadamente 20.0% a aproximadamente 55.0%,

aproximadamente 20.0% a aproximadamente 50.0%, aproximadamente 20.0% a
 aproximadamente 45.0%, aproximadamente 20.0% a aproximadamente 40.0%,
 aproximadamente 30.0% a aproximadamente 99.0%, aproximadamente 30.0% a
 aproximadamente 95.0%, aproximadamente 30.0% a aproximadamente 90.0%,
 5 aproximadamente 30.0% a aproximadamente 85.0%, aproximadamente 30.0% a
 aproximadamente 80.0%, aproximadamente 30.0% a aproximadamente 75.0%,
 aproximadamente 30.0% a aproximadamente 70.0%, aproximadamente 30.0% a
 aproximadamente 65.0%, aproximadamente 30.0% a aproximadamente 60.0%,
 aproximadamente 30.0% a aproximadamente 55.0%, aproximadamente 30.0% a
 10 aproximadamente 50.0%, aproximadamente 30.0% a aproximadamente 45.0%,
 aproximadamente 30.0% a aproximadamente 40.0%, aproximadamente 40.0% a
 aproximadamente 99.0%, aproximadamente 40.0% a aproximadamente 95.0%,
 aproximadamente 40.0% a aproximadamente 90.0%, aproximadamente 40.0% a
 aproximadamente 85.0%, aproximadamente 40.0% a aproximadamente 80.0%,
 15 aproximadamente 40.0% a aproximadamente 75.0%, aproximadamente 40.0% a
 aproximadamente 70.0%, aproximadamente 40.0% a aproximadamente 65.0%,
 aproximadamente 40.0% a aproximadamente 60.0%, aproximadamente 40.0% a
 aproximadamente 55.0%, aproximadamente 40.0% a aproximadamente 50.0%,
 aproximadamente 50.0% a aproximadamente 99.0%, aproximadamente 50.0% a
 20 aproximadamente 95.0%, aproximadamente 50.0% a aproximadamente 90.0%,
 aproximadamente 50.0% a aproximadamente 85.0%, aproximadamente 50.0% a
 aproximadamente 80.0%, aproximadamente 50.0% a aproximadamente 75.0%,
 aproximadamente 50.0% a aproximadamente 70.0%, aproximadamente 50.0% a
 aproximadamente 65.0%, aproximadamente 50.0% a aproximadamente 60.0%,
 25 aproximadamente 50.0% a aproximadamente 55.0%, aproximadamente 60.0% a

aproximadamente 99.0%, aproximadamente 60.0% a aproximadamente 95.0%,
aproximadamente 60.0% a aproximadamente 90.0%, aproximadamente 60.0% a
aproximadamente 85.0%, aproximadamente 60.0% a aproximadamente 80.0%,
aproximadamente 60.0% a aproximadamente 75.0%, aproximadamente 60.0% a
5 aproximadamente 70.0% o aproximadamente 60.0% a aproximadamente 65.0% de
reducción en los niveles de TSNA total o en los niveles de al menos una TSNA que incluye,
entre otros, *N*-nitrosonornicotina (NNN), 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK),
N-nitrosoanabasina (NAB), *N*-nitrosoanatabina (NAT) y combinaciones de estos, en
comparación con el humo de tabaco de un producto de tabaco de control producido a partir
10 de una planta de tabaco de control

8. Método para producir un producto de tabaco con TSNA reducida

La presente invención también se refiere a métodos para producir un producto de tabaco
con niveles de TSNA reducidos. En algunas modalidades, los métodos descritos en la
presente se pueden usar para introducir en una célula vegetal un polinucleótido aislado que
15 codifica un polipéptido de nitrato reductasa desregulada; regenerar la célula transformada
para producir una planta transgénica y producir un producto de tabaco a partir de una hoja
de la planta transgénica. En algunas modalidades, los métodos descritos en la presente se
pueden usar para introducir en una célula vegetal un sistema de edición de genomas que se
dirigen a un gen de nitrato reductasa endógeno; regenerar la célula transformada para
20 producir una planta transgénica y producir un producto de tabaco a partir de una hoja de la
planta transgénica.

En algunas modalidades, una planta se puede regenerar o cultivar a partir de la planta,
tejido de planta o célula de planta. Cualquier método adecuado para regenerar o cultivar
una planta a partir de una célula de planta o tejido de planta se puede usar, tal como, entre

otros, cultivo de tejido o regeneración de protoplastos. De manera adecuada, las plantas se pueden regenerar cultivando células de plantas transformadas en medio de inducción de callos, medio de inducción de tallo y/o medio de inducción de raíz. Las plantas regeneradas tienen sustancialmente todas las características morfológicas y fisiológicas de la planta de tabaco modificada.

9. Método para reducir las nitrosaminas específicas del tabaco en un producto de tabaco

La presente invención se refiere, en un aspecto, a métodos para producir un producto de tabaco con niveles reducidos de TSNA en comparación con los niveles de TSNA en una planta de tabaco no modificada. El método comprende modificar una planta de tabaco para que comprenda un polinucleótido que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que codifica una enzima nitrato reductasa desregulada; un polipéptido codificado por el polinucleótido establecido en (i); un polipéptido que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que codifica una enzima nitrato reductasa desregulada o una construcción, vector o vector de expresión que comprende el polinucleótido establecido en (i) y donde la expresión o actividad de dicha nitrato reductasa está desregulada en comparación con una planta de tabaco no modificada de control; cosechar hojas de tabaco de dicha planta de tabaco modificada y producir un producto de tabaco a partir de las hojas cosechadas.

10. Método para reducir nitrosaminas específicas del tabaco en el humo de productos de tabaco

La presente invención se refiere, en un aspecto, a métodos para producir un producto de tabaco donde los niveles de TSNA medidos en el humo obtenido de la combustión de hojas de una planta de tabaco modificada se reducen en comparación con los niveles de TSNA

medidos en el humo obtenido de la combustión de una planta de tabaco no modificada. El método comprende modificar una planta de tabaco para que comprenda un polinucleótido que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que codifica una enzima nitrato reductasa desregulada; un polipéptido codificado por el polinucleótido establecido en (i); un polipéptido que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que codifica una enzima nitrato reductasa desregulada o una construcción, vector o vector de expresión que comprende el polinucleótido establecido en (i) y donde la expresión o actividad de dicha nitrato reductasa está desregulada en comparación con una planta de tabaco no modificada de control; cosechar hojas de tabaco de dicha planta de tabaco modificada y producir un producto de tabaco a partir de las hojas cosechadas.

Será fácilmente evidente para los expertos en la técnica que otras modificaciones y adaptaciones adecuadas de los métodos de la presente divulgación que se describieron anteriormente se pueden aplicar y apreciar fácilmente y se pueden realizar usando equivalentes adecuados sin alejarse del alcance de la presente descripción o los aspectos y modalidades descritos en la presente. Habiendo descrito la presente divulgación en detalle, esta se entenderá más fácilmente mediante referencia a los siguientes ejemplos que simplemente pretenden ilustrar algunos aspectos y modalidades de la divulgación y no deben considerarse como limitación al alcance de esta. Las divulgaciones de todas las referencias a revistas, patentes estadounidenses y publicaciones a las que se hace referencia se incluyen en sus totalidades a la presente mediante referencia.

La presente invención tiene múltiples aspectos, ilustrados por los siguientes ejemplos no taxativos.

EJEMPLOS

Métodos y materiales

Construcciones de plásmidos Los siguientes cinco genes implicados en la vía de asimilación de nitrato (asimilación de N) se clonaron usando reacción en cadena de la polimerasa (PCR): “S523D-NR” - un ADNc de tabaco *Nia2* (Vaucheret et al. Plant Mol. Biol. 12:597-200 (1989)) que contiene una mutación de sustitución de Ser a Asp introducida en el codón 523 usando mutagénesis dirigida al sitio (Lillo et al. Plant J. 35:566-573 (2003)); “tr-NR” - una truncación del extremo N del ADNc de *Nia2* donde los codones 2 - 56 se retiraron por mutagénesis dirigida al sitio (Nussaume et al. Plant Cell 7:611-621 (1995)); “GS1” - el ADNc de longitud completa del gen *Gln1-3* del tabaco (Dubois et al. Plant Mol. Biol. 31:803-817 (1996)); “GOGAT” - el ADNc de longitud completa del gen *GLT1* de *Arabidopsis thaliana* (Lancien et al. Plant J. 29:347-358 (2002)); e “ICDH” - el ADNc de longitud completa de la isocitrato deshidrogenasa citosólica del tabaco (n.º de acceso de GenBank 77944).

Para expresar las diversas construcciones en el tabaco, cada ADNc se insertó individualmente en el vector binario pBI121 (Chen et al. Mol. Breed. 11:287-293 (2003)) reemplazando el gen reportero GUS dentro de este vector con el ADNc de la vía de asimilación de N correspondiente. Esto colocó a las construcciones bajo el control de transcripción del promotor fuerte y constitutivo de CaMV, 35S. El vector de expresión vegetal pBI121 contiene el gen *nptII* que permite la selección de células transformadas usando el antibiótico kanamicina. Para construcciones que contienen el promotor *CYP82E4* (E4), la región de ~850 bp del vector que contiene el promotor 35S se quitó y reemplazó con la región de 2.2 kb inmediatamente corriente arriba del codón de inicio *CYP82E4* (Chakrabarti et al. Plant Mol. Biol. 66:415-427 (2008)). Los vectores de expresión vegetal

resultantes se introdujeron en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 y se cultivaron en medio YEP (1% de Bacto-Peptona, 1% de extracto de Bacto-levadura y 0.5% de NaCl) complementado con kanamicina (50 mg/L) y rifampicina (20 mg/L).

Materiales de planta. La línea de mejoramiento de Burley DH98-325-6#775 se transformó

individualmente con las construcciones 35S:tr-NR, 35S:S523D-NR, 35S:GS1, 35S:GOGAT, 35S:ICDH, E4:tr-NR, E4:S523D-NR y E4:GOGAT. Varias líneas transgénicas independientes para cada construcción se sometieron a ensayo usando RT-PCR semicuantitativa para identificar las plantas individuales que presentaban los niveles más altos de expresión de transgén, respecto de un gen de actina del tabaco. El tejido de hoja verde se usó para el análisis de expresión de plantas que contienen construcciones bajo el control de transcripción del promotor de CaMV, 35S. Para plantas que contienen el promotor E4, el análisis de expresión se llevó a cabo en hojas que se separaron y trataron con etefón como se describe en Chakrabarti et al. (2008). Para cada individuo T0 de alta expresión, varias plantas T1 se cultivaron y se les determinó el genotipo usando cebadores de diagnóstico para transgenes cognados para distinguir la progenie que hereda el transgén de los segregantes nulos. Varias progenies de T1 de cada planta T0 que dio positivo en el ensayo de posesión de un transgén dado se volvieron a someter a ensayo por RT-PCR semicuantitativa para evaluar si el fenotipo de alta expresión se transmitía fielmente a la siguiente generación. Las líneas que se mostraba que transmitían uniformemente el fenotipo de alta expresión se usaron para producir la progenie de generación de T2.

La planta de cultivo Burley TN90e4e5 se cotransformó con las construcciones 35S:S523D-NR y E4:S523D-NR. Cantidades iguales de dos cultivos de *Agrobacterium*, cada uno alojando una de las construcciones S523D-NR, se combinaron y usaron para transformar los discos de hoja de TN90e4e5. El genotipado molecular basado en PCR se llevó a cabo para distinguir el complemento de transgenes dentro de cada individuo T0. Los cebadores

específicos para las regiones del promotor 35S o E4 se emparejaron con cebadores que corresponden a S523D-NR para distinguir las dos construcciones. Las plantas de control de vector se generaron mediante la transformación de TN90e4e5 con una construcción E4:GUS (Chakrabarti et al., 2008). Los niveles de expresión de transgén para cada planta T0 se determinó por RT-PCR usando un instrumento Mx3000P QPCR de conformidad con el protocolo del fabricante (Agilent Technologies). Los datos de RT-PCR usando cebadores que corresponden a S523D-NR se normalizaron de conformidad con la expresión de un gen de control del factor de elongación 1 α .

Condiciones de crecimiento para los experimentos de cámara ambiental controlada

Las plantas de tabaco transgénicas T2 de las líneas 35S:tr-NR, 35S:S523D-NR, 35S:GS1, 35S:GOGAT, 35S:ICDH y controles WT se cultivaron en cámaras ambientales controladas en las instalaciones de North Carolina State University Phytotron. Las semillas se germinaron en una mezcla de turba-arena 2:1. Las plántulas de cuatro semanas de edad se trasplantaron a celdas individuales y se cultivaron usando un régimen de 12 h a 26°C día/12 h a 22°C noche. Una densidad de flujo de fotones fotosintéticos de 1500 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ se proporcionó por una relación 1:1 de lámparas de haluro de metal y de sodio de alta presión y lámparas incandescentes. Las plantas se regaron una vez con agua desionizada y una vez por día con una solución de nutriente que consiste en 106.23 mg/L de nitrógeno, 10.41 mg/L de fósforo, 111.03 mg/L de potasio, 54.4 mg/L de calcio, 12.4 mg/L de magnesio, 5 mg/L de hierro, 13.13 mg/L de azufre, 0.113 mg/L de manganeso, 0.24 mg/L de boro, 0.013 mg/L de zinc, 0.005 mg/L de cobre, 0.00003 mg/L de cobalto, 0.05 mg/L de molibdeno y 11.04 mg/L de sodio.

Aproximadamente dos meses después de plantarlas, 18 plantas por genotipo se trasplantaron a macetas de 6" rellenas de arena de río esterilizada con vapor. Se debe tener cuidado de seleccionar individuos de tamaño similar. Seis plantas por genotipo se

expusieron a cada uno de los tratamientos de fertilización con nitrato. La muerte de la planta y/o la observancia de fenotipos de crecimiento anormalmente atrofiado resultaron en la pérdida de cuatro plantas 35S:ICDH, dos 35S:S523D-NR y una 35S:GS1.

Durante los primeros siete días posteriores al trasplante a macetas de 6", todas las plantas se regaron con una solución de nutriente que contiene exceso de nitrato (19 mM de NO_3^-) para permitirles ajustarse al choque del trasplante. La solución de nutriente de 19 mM de nitrato consistía de lo siguiente: 5 mM de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 2 mM de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, 5 mM de KNO_3 , 1 mM de KH_2PO_4 , 0.5 mM de K_2SO_4 , 19 μM de H_3BO_3 , 3.7 μM de MnCl_2 , 0.3 μM de ZnSO_4 , 0.13 μM de CuSO_4 , 0.05 μM de Na_2MoO_4 y 10.0 μM de 330 Fe-Secuestreno. Después del período de ajuste de siete días, las plantas de cada grupo fenotípico se dividieron igualmente en tres grupos y se regaron con una solución de nutriente de muy poco nitrato (0.2 mM de NO_3^-), de nitrato medio (8 mM de NO_3^-) o de nitrato alto N (19 mM de NO_3^-) durante el transcurso de los siguientes 16 días. Para mantener un equilibrio iónico y osmótico, SO_4^{2-} se sustituyó por NO_3^- en las soluciones de nitrato bajo y medio, según correspondiera. Por lo tanto, el nutriente de N bajo (0.2 mM de NO_3^-) consistía en 0.1 mM de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 3 mM de K_2SO_4 , 2 mM de MgSO_4 y 4.9 mM de $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (sin $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ o KNO_3) y el nutriente de N medio (8 mM de NO_3^-) contenía 4 mM de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 3 mM de K_2SO_4 , 2 mM de MgSO_4 y 1 mM de $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (sin $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ o KNO_3).

Durante el transcurso del experimento de 16 días, cada planta se regó tres veces por día: de mañana con 200 mL de la solución de nutriente apropiada, al mediodía con 200 mL de agua DI y en la tarde con 1000 mL de agua DI para sacar los nutrientes, seguido de 200 mL de la solución de nutriente apropiada. Las condiciones de cámara fueron 26°C /22°C día/noche, con un período de 12 h/12 h de día/noche.

Ensayos de clorofila. Al final del período de tratamiento, se realizaron ensayos de clorofila de conformidad con el protocolo publicado en Protocol Exchange (Ni et al. (2009)

doi:10.1038/nprot.2009.12) usando un espectrofotómetro DU® 640 (Beckman™ Coulter). Las concentraciones de clorofila a (Ca), clorofila b (Cb) y clorofila a+b (Ca+b) se calcularon de conformidad con las siguientes fórmulas (Arnon Plant Physiol 24:1-15 (1949)), donde V es el volumen del extracto (mL) y W es el peso de la hoja fresca (g).

5
$$Ca \text{ (mg/g)} = (12.7 \times A663 - 2.69 \times A645) \times V / (1000 \times W)$$

$$Cb \text{ (mg/g)} = (22.9 \times A645 - 4.68 \times A663) \times V / (1000 \times W)$$

$$Ca+b \text{ (mg/g)} = (8.02 \times A663 + 20.20 \times A645) \times V / (1000 \times W)$$

Análisis de peso fresco y preparación de la muestra. Luego del período de tratamiento de 16 días, las mediciones de biomasa total en planta se tomaron cortando cada planta por la base y registrando sus pesos frescos. Inmediatamente después de que se pesó cada muestra, una única hoja de una posición similar en cada planta (4ª o 5ª hoja desde arriba) se quitó, se le retiró el nervio central y la lámina restante se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C para el análisis de aminoácidos. También se recogió una muestra de hoja pequeña (~300 mg) de una posición similar de cada planta para ensayos de clorofila.

10 El resto de las hojas en cada planta se separaron posteriormente del tallo principal, se colocaron en una bolsa de papel y se incubaron en un horno de secado a 65°C durante dos días. Las muestras de hoja seca se molieron posteriormente hasta formar un polvo fino para el análisis de nitrato y amoníaco.

Ensayos de nitrato, nitrito y amoníaco Para los experimentos de cámara de crecimiento, se pesaron aproximadamente 100 mg de polvo de hoja seca de cada muestra y se extrajeron usando 10 mL de agua desionizada. Luego de filtrar a través de un papel filtro #4 Whatman™, los sobrenadantes se sometieron a ensayo para determinar las concentraciones de nitrato y amonio usando un autoanalizador de múltiples canales en el laboratorio de Environmental and Agricultural Testing Service (EATS) en la North Carolina

20

State University. Las cantidades de nitrato y amonio se calcularon de conformidad con el protocolo en el Lachat Instruments Handbook.

Para las muestras cultivadas en el campo y los materiales de T0 cultivados en invernadero, el tejido de hoja molida se analizó para determinar el nitrato en el laboratorio Tobacco Analytical Laboratory de la Universidad de Kentucky. La cuantificación de nitrato se determinó de conformidad con el protocolo descrito en Crutchfield and Grove (J. AOAC International 94:1898-1905 (2011)). El análisis de nitrito se llevó a cabo en las muestras de campo curadas al aire usando el método descrito por Crutchfield and Burton (Anal. Letters 22:555-571 (1989)).

Ensayos de aminoácidos. Las muestras de hojas de plantas cultivadas en cámara de crecimiento que se habían congelado en nitrógeno líquido se secaron hasta completarse colocándolas en un liofilizador durante dos días. Luego las muestras secas se molieron en nitrógeno líquido hasta formar un polvo fino usando un mortero y mano. Aproximadamente 100 mg de polvo de hojas secas se pesó y proporcionó al laboratorio analítico en el Biomanufacturing Training and Education Center en la North Carolina State University para mediciones de ensayo de aminoácidos. Brevemente, cada muestra se extrajo con 1.0 mL de 80% de MeOH-20% de H₂O y se agitaron en vórtex, seguido de centrifugación a 20,000 x g. Alícuotas de 200-μL del sobrenadante aclarado se enfriaron a -80°C durante aproximadamente 2 h y luego se liofilizaron durante la noche. El material seco se disolvió en 200 μL de amortiguador de borato (pH 8.0) luego se volvieron a diluir 1:10 con amortiguador de borato. Las muestras se derivaron agregando 10 μL de la muestra extraída a 70 μL de amortiguador de borato y 20 μL de reactivo de derivación. Los viales se calentaron a 55°C durante 10 minutos, se enfriaron a temperatura ambiente y se agitaron en vórtex para mezclar los contenidos. Las muestras derivadas se analizaron usando cromatografía líquida de rendimiento ultraalto.

Análisis de alcaloide y TSNA de hojas curadas al aire. Los niveles de nicotina, nornicotina, anatabina y anabasina en muestras de hojas curadas se cuantificaron usando una cromatografía de gas Perkin-Elmer Autosystem XL de conformidad con protocolos establecidos previamente (Jack et al. Rec. Adv. Tob. Sci. 33:58-79 (2007)). Los
5 alcaloides totales se calcularon como la suma de nicotina, nornicotina, anatabina y anabasina. Las cuantificaciones de NNN, NNK, NAT y NAB se realizaron de conformidad con el “Método 1” de Morgan et al. (Beit. Tabakforschung 23:192-203 (2004)). TSNA totales representan la suma de NNN, NNK, NAT y NAB.

Extracción de TSNA y análisis en el humo y picadura de tabaco. Muestras de picadura
10 de tabaco se extrajeron con una solución de 100 mM de acetato de amonio que contiene estándares internos deuterados para permitir la cuantificación. Los extractos se filtraron usando un filtro de jeringa de PVDF (0.45 µm de tamaño de los poros) y se analizaron por cromatografía líquida con espectrometría de masa en tándem (LC-MS/MS) acoplada con ionización por electropulverización (ESI). D4-N-nitrosornicotina (D4-NNN) se usó como
15 estándar interno para NNN, mientras que D4-4-(metil-nitrosamina)-1-(3-piridil)-1-butanona (D4-NNK) sirvió como estándar interno para NNK, NAT y NAB.

Los cigarrillos de prueba hechos a partir de la picadura se acondicionaron y se fumaron de conformidad con el procedimiento para fumar especificado en Health Canada Method No. T-115. El humo principal se recogió en filtros Cambridge y se extrajo con 100 M de acetato
20 de amonio que contiene estándares D4-NNN y D4-NNK seguido de filtración con un filtro de jeringa PVDF de 0.45 µm de poro. Los extractos de acetato de amonio se analizaron por LC-MS/MS acoplada con ESI y se cuantificaron de conformidad con los estándares D4-NNN y D4-NNK.

Análisis estadístico. El procedimiento PROC GLM de SAS 9.1 (SAS Institute, Cary, NC)
25 se usó para llevar a cabo un análisis de varianza y para calcular los promedios para cada

una de las líneas transgénicas y WT incluidas. Debido a las varianzas heterogenes, se llevaron a cabo transformaciones de datos logarítmicos naturales a las distribuciones normales aproximadas para los datos de peso fresco, nitrato y amoniaco recabados para los experimentos de cámara de crecimiento. Los valores no transformados se usaron para los otros conjuntos de datos. Se establecieron niveles de significancia de conformidad con la prueba de rango múltiple Ryan-Einot-Gabriel-Welsch (REGWQ).

EJEMPLO 2

Sobreexpresión de genes de asimilación de N en tabaco Burley

Las enzimas GS1, NADH-GOGAT, ICDH o NR desregulada (ya sea la mutación de truncación de 56 aminoácidos o la mutación puntual S523D) se sobreexpresaron en plantas de tabaco Burley para determinar si la expresión ectópica de cualquiera de estos genes de la vía de asimilación de N 1) compensaba la deficiencia de clorofila y/o los defectos del crecimiento asociados con la fertilización con N característicos de los tabacos Burley y/o 2) reducía los niveles de nitrato libre que se acumula en la hoja y ayuda a revertir el fenotipo de acumulación de nitrato alta que es característico de esta clase de plantas de tabaco. El remplazo del gen reportero GUS en el vector de expresión vegetal pBI121 con los genes de la vía de asimilación de N colocaba a cada una de estas construcciones bajo el control de regulación del promotor constitutivo fuerte 35S del virus del mosaico del coliflor (CaMV) y la secuencia terminadora 3' nos del gen de nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens* (Chen et al. Mol. Breed. 11:287-293 (2003)). Un diagrama de las construcciones usadas se muestra en las Figuras 3A-3B.

La línea de tabaco Burley DH98-325-6#775 se transformó individualmente con cada una de las cinco construcciones usando protocolos estándar de transformación mediada por

Agrobacterium. DH98-325-6#775 representa una selección de una población de Burley mutagenizada con etilmetano sulfonato (EMS) que contiene una mutación de inactivación en *CYP83E4*, el gen de nicotina desmetilasa principal del tabaco (Lewis et al. *Phytochem.* 71:1988-1998 (2010)). Los tabacos Burley tienen a un fenómeno denominado conversión de nicotina en el que el gen *CYP82E4* normalmente inactivo se activa espontáneamente, dando lugar a una alta proporción de progenie que acumula niveles excepcionalmente altos del precursor de nornicotina TSNA. La mutación de inactivación de *CYP82E4* en DH98-325-6#775 evita la conversión de nicotina y esta línea se seleccionó para evitar posibles complicaciones que podrían haber surgido al interpretar los datos de TSNA entre los diversos materiales transgénicos generados, lo que probablemente se hubiera vuelto un problema si se hubiera usado una planta de cultivo Burley estándar (debido a la gran variabilidad en los niveles de nornicotina que se esperaría observar usando un fondo de Burley normal).

Para permitir la selección de plantas que expresan los transgenes respectivos a un alto nivel, al menos 10 plantas T0 independientes para cada construcción se sometieron a ensayo por RT-PCR semicuantitativa. La semilla se cultivó de las tres líneas T0 de cada construcción que mostró los máximos niveles de acumulación del transgén. Debido a fenómenos como el silenciamiento de transgenes, o situaciones donde un transgén con expresión débil y el transgén con expresión alta pueden haberse integrado en locus independientes dentro de la misma planta T0, es posible que algunas líneas T0 que muestran alta expresión de transgén puedan producir progenie que segregan una expresión de transgenes alta y baja. Por lo tanto, RT-PCR semicuantitativo también se llevó a cabo en varias progenies de cada planta T0 con alta expresión seleccionada, para evaluar si la progenie de T1 que heredaba uno o más transgenes continuaba expresándolo a alto nivel. Todas las plantas usadas en estudios posteriores fueron plantas T2 tomadas de lotes de

siembra T1 donde toda la progenie que tenía un resultado positivo en la prueba del transgén (mediante genotipado molecular) continuaba expresando el transgén a alto nivel. Los segregantes T1 que ya no poseían un transgén se usaron como fuente de controles WT (segregante nulo).

5 **EJEMPLO 3**

Análisis de plantas transgénicas en un ambiente de cámara de crecimiento controlado

Para examinar los efectos de la sobreexpresión del gen de la vía de asimilación de N en plantas Burley cultivadas en condiciones diversas de disponibilidad de nitrato, tres conjuntos de plantas que comprenden seis plantas T2 jóvenes para cada genotipo de transgén (35S:tr-NR, 35S:S523D-NR, 35S:GS1, 35S:GOGAT y 35S:ICDH) y el control WT se cultivaron en una cámara de crecimiento ambiental controlado. Cada conjunto de plantas se regó con una solución de nutrientes que contiene 0.2 mM, 8 mM o 19 mM de nitrato durante 16 días. Durante la ejecución del experimento, sin embargo, una pequeña cantidad de plantas murió o mostró un crecimiento atrofiado y por lo tanto no se incluyeron en el análisis. Al final del período de tratamiento de 16 días, se observaron diferencias drásticas entre los conjuntos de plantas expuestas a diferentes niveles de nitrato. Como se esperaba, las plantas de tabaco regadas con medio que contiene 0.2 mM de nitrato mostraron clorosis y la menor cantidad de crecimiento, mientras que las plantas a las que se les proporcionó 19 mM de nitrato fueron las más grandes y de color verde más oscuro. Sin embargo, no se observaron diferencias claras en el fenotipo de crecimiento global de las plantas que contienen cualquier transgén específico en comparación con los controles WT en cualquier tratamiento de fertilización con N.

Se tomaron mediciones de peso fresco de las porciones aéreas de todas las plantas al final del período de tratamiento y se muestran en la Tabla 1 y Figura 4. Los valores mostrados en la Figura 4 representan los medios no transformados $\pm$ errores estándar de 4-6 plantas para cada genotipo. Se realizaron pruebas estadísticas en los datos transformados (transformación logarítmica natural). Para cada nivel de tratamiento con nitrato, los promedios que comparten la misma letra no fueron considerablemente diferentes entre sí ($P < 0.5$). Por ejemplo, la letra “a” solo corresponde a plantas tratadas con 19 mM de nitrato, las letras “b” y “c” corresponden solo a plantas regadas con el medio de 8 mM de nitrato y “d” y “e” solo corresponden a plantas tratadas con 0.2 mM de nitrato. La Tabla 1 muestra las mediciones promedio de peso fresco, clorofila, nitrato y amoníaco de plantas que expresan genes de la vía de asimilación de N cultivadas en tres condiciones de fertilización con N, donde “Ca” es clorofila a y “Cb” es clorofila b. No se observaron diferencias significativas entre los varios genotipos transgénicos en contraste con el control WT para las plantas que recibieron los tratamientos con 8 mM y 19 mM de nitrato. Al nivel de tratamiento con nitrato muy bajo, sin embargo, el peso fresco de plantas que expresan la construcción 35S:tr-NR fue moderadamente mayor que WT, una diferencia que se consideró estadísticamente significativa.

Tabla 1

Construcción transgénica	Tratamiento con N	Peso fresco (g)	Ca (mg/g)	Cb (mg/g)	Ca+b (mg/g)	Conc. de nitrato (ppm)	Conc. de amoníaco (ppm)
35S:GOGAT (n=6)	0.2 mM	28.420	0.053	0.022	0.075	99.100	166.692

Construcción transgénica	Tratamiento con N	Peso fresco (g)	Ca (mg/g)	Cb (mg/g)	Ca+b (mg/g)	Conc. de nitrato (ppm)	Conc. de amoníaco (ppm)
35S:GOGAT (n=6)	8 mM	107.688	0.808	0.246	1.053	1923.283	475.642
35S:GOGAT (n=6)	19 mM	132.798	0.763	0.232	0.995	15643.513	767.839
35S:ICDH (n=5)	0.2 mM	30.796	0.069	0.027	0.096	67.085	118.261
35S:ICDH (n=4)	8 mM	106.528	0.759	0.228	0.986	2257.586	269.833
35S:ICDH (n=5)	19 mM	139.472	0.794	0.237	1.031	10118.411	621.612
35S:tr-NR (n=6)	0.2 mM	43.270	0.050	0.021	0.071	59.426	119.206
35S:tr-NR (n=6)	8 mM	127.707	0.725	0.218	0.942	846.754	273.316
35S:tr-NR (n=6)	19 mM	160.602	0.838	0.255	1.093	8953.107	817.139
35S:S523D-NR (n=5)	0.2 mM	38.548	0.048	0.018	0.066	59.917	117.472
35S:S523D-NR (n=5)	8 mM	114.420	0.594	0.185	0.779	124.627	440.455

Construcción transgénica	Tratamiento con N	Peso fresco (g)	Ca (mg/g)	Cb (mg/g)	Ca+b (mg/g)	Conc. de nitrato (ppm)	Conc. de amoniaco (ppm)
35S:S523D-NR (n=6)	19 mM	120.892	0.739	0.215	0.954	2026.337	1544.655
35S:GS1 (n=6)	0.2 mM	34.953	0.037	0.015	0.052	79.219	134.696
35S:GS1 (n=6)	8 mM	113.643	0.647	0.197	0.844	2391.705	386.519
35S:GS1 (n=5)	19 mM	127.266	0.985	0.306	1.290	12614.557	890.905
Tipo salvaje (n=6)	0.2 mM	28.673	0.024	0.011	0.035	75.771	128.621
Tipo salvaje (n=6)	8 mM	110.357	0.678	0.201	0.879	2295.164	328.894
Tipo salvaje (n=6)	19 mM	130.175	1.000	0.300	1.300	14918.953	798.592

Las plantas de tabaco Burley muestran deficiencias de clorofila y se distinguen claramente de otros tipos de tabaco por su aspecto de color verde más claro. Si cualquiera de los transgenes sobreexpresados eran capaces de compensar las mutaciones de *yb1* y/o *yb2* que caracterizan los tipos Burley, uno podría esperar ver un aumento en el contenido de clorofila de estas plantas. Pese a que no se observaron diferencias obvias por simple observación visual entre los controles WT y los diversos genotipos transgénicos evaluados, se tomaron mediciones directas de clorofila a, b y a+b en el caso de que hubiera diferencias

más sutiles presentes (Tabla 1). De manera similar a las mediciones de peso fresco, hubo un efecto de tratamiento muy fuerte donde el contenido de clorofila se correlacionaba positivamente con un aumento en la fertilización con nitrato. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en las concentraciones de clorofila entre ningún genotipo de transgén y los controles WT dentro de ninguno de los tres tratamientos con nitrato (Figuras 5A-5C). Los valores mostrados en las Figuras 5A-5C representan los promedios $\pm$ error estándar de 4-6 plantas para cada genotipo. Para cada nivel de tratamiento con nitrato, los promedios que comparten la misma letra no fueron significativamente diferentes entre sí ($P < 0.5$).

Las concentraciones promedio de nitrato y amoníaco para los diversos genotipos en cada nivel de fertilización con nitrato también se muestran en la Tabla 1. Al nivel de tratamiento con 0.2 mM de nitrato, todas las plantas mostraron una acumulación excepcionalmente baja de nitrato y no se observaron diferencias considerables entre ningún genotipo de transgén y los controles WT (Figura 6). La Figura 6A muestra datos de plantas cultivadas usando los tratamientos con 19 mM de NO_3^- y 8 mM de NO_3^- ; los resultados del tratamiento con 0.2 mM de NO_3^- se muestran en la Figura 6B. Los valores mostrados representan los promedios no transformados $\pm$ errores estándar de 4-6 plantas para cada genotipo. Se realizaron pruebas estadísticas en los datos transformados (transformación logarítmica natural). Para cada nivel de tratamiento con nitrato, los promedios que comparten la misma letra no fueron significativamente diferentes ($P < 0.5$).

En los tratamientos con 8 mM y 19 mM de nitrato, la concentración promedio de nitrato medida en las plantas 35S:tr-NR fue solo 37% y 60% de la observada en los controles WT, respectivamente. Hubo una reducción drástica en el nitrato medido en las hojas de plantas que expresan la construcción 35S:S523D-NR cuando se fertilizaron con 8 mM o 19 mM de nitrato. En promedio, las plantas que contienen esta construcción de NR desregulada

acumularon solo aproximadamente 5% de la cantidad del nitrato presente en las plantas de control cuando se regaron en un régimen de fertilización con 8 mM de nitrato. Usando el tratamiento de fertilización de 19 mM de N, las plantas WT promediaron aproximadamente 14,900 ppm de nitrato, en comparación con solo ~2000 ppm observado en las plantas 35S:S523D-NR, una reducción de casi 8 veces en los individuos transgénicos (Figura 6A).

Las concentraciones de amoníaco de las plantas sometidas a ensayo en este experimento se muestran en la Figura 7. Los valores mostrados en la Figura 7 representan los promedios no transformados $\pm$ errores estándar de 4-6 plantas para cada genotipo. Se realizaron pruebas estadísticas en los datos transformados (transformación logarítmica natural). Para cada nivel de tratamiento con nitrato, los promedios que comparten la misma letra no fueron significativamente diferentes entre sí ($P < 0.5$). Pese a que los niveles de amoníaco no variaron tanto como el nitrato, las plantas 35S:S523D-NR acumularon aproximadamente el doble de este metabolito de la vía de asimilación de N que las plantas de control al nivel de tratamiento con 19 mM de nitrato. Sin embargo, a los niveles de tratamiento con N bajo y medio, ningún genotipo transgénico dado fue estadísticamente diferente en su contenido promedio de amoníaco de los controles WT, ni ningún otro genotipo transgénico.

Debido a que la vía de asimilación de N se alimenta directamente en la biosíntesis de aminoácidos, se estableció la medida en la cual las concentraciones de aminoácidos libres se podrían haber alterado en las plantas transgénicas. Independientemente del genotipo de transgén, se observaron solo diferencias mínimas en los niveles de nitrato y amonio en plantas fertilizadas con el medio con 0.2 mM de nitrato (Figuras 6 y 7); por lo tanto, la cuantificación del contenido de aminoácidos libres solo se llevó a cabo en plantas tratadas con 8 mM y 19 mM de nitrato. La Tabla 2 muestra las concentraciones promedio ($\mu\text{mol/g}$ de

peso seco) para los 20 aminoácidos en cada genotipo transgénico y de control cultivado en condiciones de nitrato medio (8 mM) y alto (19 mM).

Tabla 2

Concentración de metabolito (μmol/g de peso seco)						
Construcción	WT		tr-NR		S523D-NR	
Concentración de nitrato	8 mM	19 mM	8 mM	19 mM	8 mM	19 mM
His	0.916	1.670	0.934	1.830	1.450	7.584
Asn	4.057	17.934	7.079	33.443	13.880	98.851
Ser	22.750	33.695	18.203	27.970	17.308	46.370
Gln	36.651	111.772	30.583	151.395	72.416	968.148
Arg	0.490	2.898	5.767	3.869	0.791	15.292
Gly	4.461	27.494	2.832	11.812	1.856	48.442
Asp	18.533	26.219	10.239	17.290	15.605	44.033
Glu	82.841	86.255	70.556	81.072	78.470	144.897
Thr	36.234	28.762	24.079	30.702	22.548	41.732
Ala	11.124	28.160	16.904	23.089	10.784	40.634
Pro	15.916	20.291	20.839	31.498	22.776	58.392
Cys	0.041	0.154	0.135	0.096	0.077	0.090
Lys	1.522	1.696	1.613	1.925	1.686	3.295
Tyr	3.774	5.830	3.697	6.429	3.486	6.773
Met	0.224	0.720	0.537	0.492	0.601	1.447
Val	12.749	16.961	12.747	19.509	13.227	31.370
Ile	1.549	2.367	1.450	2.192	1.395	4.594
Leu	4.088	3.705	2.966	4.562	3.053	7.697

Phe	4.700	6.572	4.047	5.461	3.070	8.943
Trp	1.377	1.422	1.628	1.787	1.429	3.121
Total	263.998	424.578	236.835	456.424	285.909	1581.703

Continuación Tabla 2

Concentración de metabolito (μmol/g de peso seco)						
Construcción	GS		ICDH		GOGAT	
Concentración de nitrato	8 mM	19 mM	8 mM	19 mM	8 mM	19 mM
His	1.024	1.091	1.060	1.605	1.013	1.713
Asn	3.599	10.052	2.715	14.428	7.400	11.330
Ser	17.576	28.809	5.631	32.661	22.804	30.923
Gln	20.609	77.103	5.325	93.425	17.624	73.545
Arg	0.215	1.758	3.134	4.797	0.598	2.266
Gly	1.731	23.584	0.441	32.613	1.761	19.006
Asp	12.647	25.376	6.358	18.297	15.992	27.733
Glu	67.637	84.602	37.214	71.596	77.295	78.855
Thr	55.242	36.986	13.128	28.333	51.094	40.043
Ala	10.023	21.379	6.448	25.789	22.996	22.634
Pro	13.612	18.443	8.120	29.038	16.345	26.077
Cys	0.145	0.110	0.148	0.302	0.115	0.055
Lys	1.650	1.850	1.819	2.157	1.944	2.033
Tyr	2.705	4.905	2.069	4.616	3.643	4.683
Met	0.635	0.730	0.332	0.649	0.515	0.567
Val	9.064	18.887	6.092	13.562	13.749	16.397
Ile	1.701	2.148	1.038	2.601	2.179	3.928

Concentración de metabolito (μmol/g de peso seco)						
Construcción	GS		ICDH		GOGAT	
Leu	4.558	4.642	2.006	3.645	4.008	3.902
Phe	3.718	5.718	1.964	6.798	4.606	6.093
Trp	1.411	1.515	0.620	1.677	1.610	2.687
Total	229.501	369.688	105.663	388.590	267.292	374.471

Hubo un gran aumento en los aminoácidos libres totales en las plantas con la construcción 35S:S523D-NR tratada con 19 mM de nitrato (Figura 8). Los valores mostrados en la Figura 8 representan los promedios $\pm$ error estándar de 4-6 plantas para cada genotipo. Para cada nivel de tratamiento con nitrato, los promedios que comparten la misma letra no fueron significativamente diferentes entre sí ($P < 0.5$). Las plantas de tabaco que expresan esta construcción se acumularon, en promedio, 3.7 veces más en los aminoácidos libres totales que las plantas WT. Pese a que casi todos los aminoácidos eran mayores en el grupo 35S:S523D-NR en contraste con WT en el tratamiento con N alto, los niveles de Gln, Asn y Arg fueron particularmente elevados, mostrando aumentos de 8.5, 5.5 y 5.3 veces respectivamente (Figura 9). Los valores mostrados en la Figura 9 representan los promedios $\pm$ error estándar de 4-6 plantas para cada genotipo. Para cada nivel de tratamiento con nitrato, los promedios que comparten la misma letra no fueron significativamente diferentes entre sí ($P < 0.5$). Cuando se cultivaron usando la solución de nutriente con 8 mM de nitrato, los niveles de Gln y Asn también fueron significativamente mayor en la planta 35S:S523D-NR que en la de control (2 y 3.4 veces, respectivamente), igualmente las concentraciones totales de aminoácidos entre las dos líneas fueron casi idénticas (Figura 8), debido a que las reducciones promedio en los niveles de varios otros aminoácidos en las plantas 35S:S523D-NR en comparación con WT (Tabla 2). En conjunto,

el perfil de aminoácido de plantas que expresan las otras construcciones de genes NR desregulada (35S:tr-NR) fue similar a las plantas WT.

Glutamina es el producto de reacción de la enzima GS. Por lo tanto, es interesante que los niveles de Gln no aumentaron en plantas que sobreexpresan el gen GS (Figura 9B). Esto es en contraste a un aumento de 2 veces en Gln observado cuando un ADNc de alfalfa GS se sobreexpresó en plantas de tabaco y se fertilizó con una solución de nitrato alto. Asimismo, los niveles de Glu no aumentaron considerablemente en las plantas transgénicas que sobreexpresan el gen que codifica la enzima GOGAT que es directamente responsable de su síntesis (Figura 9). Al nivel de fertilización con 8 mM de nitrato, las plantas que sobreexpresan ICDH mostraron menos aminoácidos en total (Figura 8) y menores cantidades de Glu específicamente (Figura 9D) que cada uno de los otros genotipos.

La deficiencia de clorofila representa una de las características distintivas de los tabacos Burley y es un rasgo que se ha atribuido específicamente al locus *yb1* and *yb2*. Ya sea si crecieron en una cámara de crecimiento, invernadero o ambiente de campo, todas las plantas mostraron el mismo fenotipo de color verde claro que es distintivo de este tipo de tabaco. En los experimentos en cámara de crecimiento, el contenido de clorofila de las líneas transgénicas y WT se midió directamente y no se observaron diferencias entre ninguno de estos materiales. Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de los genes asociados con la vía de asimilación de N (tr-NR, S523D-NR, GS1, GOGAT e ICDH) no complementa o de otro modo desvía funcionalmente, el locus mutante *yb1* y/o *yb2* que define el fenotipo Burley.

Pese a que no se encontró evidencia de que la sobreexpresión de cualquiera de los transgenes de vía de asimilación de N evaluado podría sobreponer los defectos de crecimiento asociados a la fertilización con N o las deficiencias de clorofila que son

características de los tabacos Burley, la sobreexpresión de las actividades de NR desregulada fueron claramente eficaces para reducir los niveles de nitrato libre.

EJEMPLO 4

Análisis de plantas transgénicas cultivadas en condiciones de campo

5 Expresión constitutiva de las reducciones drásticas mediadas por la construcción de S523D-NR desregulada en la acumulación de nitrato libre en la hoja cuando se cultiva en condiciones de fertilización con N moderada o alta. También parecía que la construcción de tr-NR desregulada puede conferir una reducción modesta en el contenido de nitrato. Para determinar los efectos de las construcciones 35S:S523D-NR y 35S:tr-NR en la

10 concentración de nitrato en la hoja cuando se cultivaban en un ambiente de campo, las plantas T2 de los mismos lotes de siembra usados en los experimentos de cámara de crecimiento se germinaron en bandejas flotantes y se trasplantaron al campo. Debido a que las consecuencias del exceso de nitrato libre en las hojas respecto de la formación de TSNA se manifiestan principalmente durante el curado y la senescencia de hojas, las

15 construcciones de NR desregulada se colocaron bajo el control de transcripción de un promotor específico de la senescencia fuerte. El promotor que controla el gen de nicotina demetilasa *CYP82E4* media un alto nivel de expresión de genes específicamente durante la senescencia y el curado al aire. Las construcciones que ponen a los ADNc S532D-NR y tr-NR bajo el control del promotor *CYP82E4* (E4) se generaron mediante el remplazo inicial del

20 promotor de CaMV 35S del vector de expresión vegetal pBI121 con la región de 2.2 kb inmediatamente corriente arriba del codón de inicio Met de la traducción *CYP82E4*, seguido de la inserción de ADNc NR corriente abajo del promotor E4. Como un control que representa la sobreexpresión de un gen de la vía de asimilación de N que no influye en el

contenido de nitrato de la hoja, las plantas transgénicas 35S:GOGAT y E4:GOGAT también se incluyeron en los experimentos de campo. Los diagramas de estos vectores se muestran en las Figuras 3A-3B. Las poblaciones específicas de T2 evaluadas en el campo que posee las construcciones impulsadas por el promotor E4 vinieron de lotes de siembra de plantas T1 que se demostró que expresaban los transgenes a un alto nivel cuando se trataron con el compuesto inductor de la senescencia, etefón (Chakrabarti et al., 2008). De manera similar a los estudios de cámara de crecimiento, los segregantes nulos de las plantas T1 que ya no poseían un transgén se usaron como la fuente de los controles WT para los experimentos de campo.

Aproximadamente 100 plantas jóvenes para cada uno de los siete genotipos evaluados (WT, 35S:S523D-NR, E4:S523D-NR, 35S:tr-NR, E4:tr-NR, 35S:GOGAT y E4:GOGAT) se dividieron igualmente y se trasplantaron en dos ubicaciones de campo en Carolina del Norte usando un diseño de bloque completo aleatorizado. Las plantas se cultivaron en una estación de investigación de campo cerca de la ciudad de Clayton, NC o la ciudad de Rocky Mount, NC. Debido a que una cantidad sustancial de plantas murieron después del trasplante, la cantidad total de plantas que crecieron hasta la madurez varió de 60 a 79 por genotipo. Las plantas de tabaco se cultivaron, recubrieron y cosecharon de conformidad con la práctica estándar en la industria para los tabacos Burley. En la madurez, las plantas se cosecharon desde el tallo y dos hojas de una posición de tallo de aproximadamente un tercio desde la parte superior se separaron de cada planta, se retiró el nervio central y el resto del tejido de lámina se colocó en una bolsa de papel. Luego las plantas se colgaron en palos y se transfirieron a una estructura protegida de la lluvia para el curado al aire. Los materiales de hoja en las bolsas de papel se colocaron en un horno de secado y se secaron hasta completarse a 65°. Las muestras de hoja secas se cultivaron y analizaron para determinar el contenido de nitrato.

La concentración promedio de nitrato en plantas T2 que expresan diferentes genes implicados en la asimilación de nitrato se muestran en la Tabla 3. Como se muestra en la Tabla 3, los niveles promedio de nitrato observados en los diferentes genotipos sometidos a ensayo fueron muy similares entre las dos ubicaciones de campo (uno cerca de Clayton, NC, el otro cerca de Rocky Mount, NC). La observación más drástica en este conjunto de datos fue la mayor reducción de nitrato en las hojas de las plantas 35S:S523D-NR. En promedio, las plantas de tabaco que contienen la construcción 35S:S523D-NR mostraron solo 4.2% y 5.6% de la cantidad de nitrato observada en los controles WT en las ubicaciones de Clayton y Rocky Mount, respectivamente.

10

Tabla 3

	<u>Promedio en ppm</u> <u>de NO₃⁻</u>	<u>Error estándar del promedio</u>
<u>Clayton</u>		
WT (n=40)	1510	116
35S:S523D-NR (n=31)	63	7
E4:S523D-NR (n=32)	1107	102
35S:tr-NR (n=37)	988	103
E4:tr-NR (n=31)	1124	96
35S:GOGAT (n=36)	1277	119
E4:GOGAT (n=31)	1426	113

<u>Rocky Mount</u>		
WT (n=38)	1240	121
35S:S523D-NR (n=27)	69	10
E4:S523D-NR (n=43)	1135	96
35S:tr-NR (n=31)	838	95
E4:tr-NR (n=43)	1084	88
35S:GOGAT (n=43)	1247	110
E4:GOGAT (n=32)	1292	121

Un análisis estadístico de los conjuntos de datos combinados para ambas ubicaciones se muestra en la Tabla 4. La Tabla 4 muestra los efectos de las construcciones de genes relacionadas con nitrato en el contenido de NO_3^- (N) (ppm de peso seco) en las hojas de plantas Burley transgénicas de generación T2 en la madurez. El grupo 35S:S523D-NR acumuló considerablemente menos nitrato que cualquier otro genotipo. Si bien no fue tan drástica la reducción, los niveles de nitrato libre en los otros genotipos de plantas que contienen un ADNc de nitrato reductasa desregulada (35S:tr-NR, E4:tr-NR y E4:S532D-NR) también acumularon menos nitrato que el grupo WT, pero solo las plantas que contienen la construcción 35S:tr-NR se consideraron significativamente diferentes que los genotipos de control que expresan GOGAT. El contenido de nitrato de los grupos E4:GOGAT y 35S:GOGAT no se consideró significativamente diferente que WT.

Tabla 4

<i>Los promedios con la misma letra no son significativamente diferentes en $\alpha=0.05$.</i>			
Agrupamiento REGWQ	Promedio	N	Genotipo
A	1378.29	78	WT
BA	1358.02	63	E4:GOGAT
BAC	1260.73	79	35S:GOGAT
BDC	1123.07	75	E4:S523D-NR
DC	1100.96	74	E4:tr-NR
D	919.35	68	35S:tr-NR
E	65.73	59	35S:S523D-NR

Las plantas cosechadas por el tallo que se transfirieron al granero de curado se dejaron curar al aire durante aproximadamente 10 semanas. Al final de este período, dos hojas más de la tercera posición superior del tallo se cosecharon, se separaron del nervio medio y se colocaron en bolsas de papel. Pese a que los materiales estaban muy secos en la cosecha después del curado, las bolsas se colocaron en una secadora a temperatura ambiente con los secadores funcionando para asegurar la sequedad total (no se agregó calor debido a la potencial influencia de alta temperatura en la formación de TSNA). Las muestras se molieron y sometieron a análisis de nitrato. La Tabla 5 muestra los efectos de las construcciones de genes relacionadas con nitrato en el contenido de $\text{NO}_3^- \text{N}$ (ppm de peso seco) en las hojas de plantas Burley transgénicas de generación T2 después de ocho semanas de curado al aire. La comparación de los datos en la Tabla 4 con los presentados

en la Tabla 5 revela que el contenido de nitrato en la lámina de las hojas para todos los genotipos fue ~2 veces mayor después del curado al aire. Pese a que el mecanismo es desconocido, un aumento en la concentración de nitrato en hojas se observa comúnmente después del curado al aire en tabacos Burley. De manera similar a los resultados obtenidos usando tejido maduro y no curado, las plantas del genotipo 35S:S523D-NR acumularon mucho menos nitrato libre que cualquier otro grupo genotípico y solo ~4% del observado en las plantas WT (Tabla 5). Las muestras de hojas curadas de otros genotipos que contienen construcciones de NR desregulada también continuaron mostrando reducciones estadísticamente significativas en el contenido de nitrato en comparación con plantas WT, variando de 70% a 77% de la concentración de nitrato observada en el grupo WT.

Tabla 5

<i>Los promedios con la misma letra no son significativamente diferentes en $\alpha=0.05$.</i>			
Agrupamiento REGWQ	PROMEDIO	N	Genotipo
A	2806.1	79	WT
BA	2493.3	63	E4:GOGAT
BA	2451.4	79	35S:GOGAT
BC	2149.9	76	E4:tr-NR
C	2035.1	75	E4:S523D-NR
C	1974.7	70	35S:tr-NR
D	107.4	60	35S:S523D-NR

Pese a que los niveles de nitrito en plantas son generalmente muy bajos, supuestamente debido a la eficacia de las actividades de la nitrato reductasa endógena, el metabolismo drástico de las reservas de nitrato celular mediadas por la enzima S523D-NR expresada constitutivamente puede resultar en un aumento en los niveles de su producto final nitrito.

5 Debido a que el nitrito es en última instancia el compuesto que se cree que es responsable de la formación de TSNA durante el curado al aire, es importante que las modificaciones genéticas que llevan a reducciones en los grupos de nitrato no resulten en un aumento en los niveles de nitrito dentro de la hoja curada. Para determinar si la sobreexpresión de cualquiera de las construcciones de transgenes se asociaba con cambios en el contenido de
10 nitrito en la hoja, se realizaron ensayos de nitrito en todas las muestras de hojas curadas al aire recogidas. En total, los niveles de nitrito entre los diversos genotipos fueron similares (Tabla 6). La Tabla 6 muestra los efectos de las construcciones de genes relacionadas con nitrato en el contenido de NO_2^- (ppm de peso seco) en las hojas de plantas Burley transgénicas de generación T2 después de ocho semanas de curado al aire.

15 Tabla 6

<i>Los promedios con la misma letra no son significativamente diferentes en $\alpha=0.05$.</i>			
Agrupamiento REGWQ	Promedio	N	Genotipo
A	2.4403	63	E4:GOGAT
BA	2.3559	79	WT
BA	2.3236	75	E4:S523D-NR
BA	2.3052	79	35S:GOGAT
BA	2.279	76	E4:tr-NR
BA	2.1125	70	35S:tr-NR

B	1.9574	60	35S:S523D-NR
---	--------	----	--------------

Pese a que el promedio numérico del grupo 35S:S523D-NR fue el más bajo de todos los genotipos, no se consideró estadísticamente significativo de los controles WT (pese a que se consideró significativamente menor que la línea E4:GOGAT). Estos resultados muestran que la expresión constitutiva de la construcción S523D-NR desregulada no resulta en mayores niveles de nitrito; por el contrario, es posible que este transgén pueda mediar una reducción modesta en las concentraciones de nitrito de la hoja curada,

Para evaluar si la reducción del contenido de nitrato en la hoja impactaría en la acumulación de TSNA o alcaloide, un subconjunto de las muestras de hojas curadas descritas anteriormente de los genotipos WT, 35S:S523D-NR y 35S:GOGAT se seleccionó para analizarlo más profundamente. Para cada genotipo, un total de 33 muestras de hojas se eligieron, se distribuyeron uniformemente entre dos ubicaciones (16 de Clayton, 17 de Rocky Mount) y se seleccionaron de hileras individuales donde los tres genotipos estaban representados (es decir, no había plantas muertas para ninguno de los tres genotipos en una hilera seleccionada dada). Los resultados de los análisis de TSNA y alcaloide se muestran en la Tabla 7. La Tabla 7 muestra el contenido de TSNA y alcaloide en hojas curadas de plantas WT, 35S:GOGAT y 35S:S523D-NR. De manera acumulativa, la reducción total en el contenido de TSNA en el genotipo 35S:S523D-NR en comparación con WT fue 77.5%. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ningún contenido de TSNA individual o TSNA total en plantas WT en contraste con las plantas 35S:GOGAT. Estos resultados demuestran claramente que la expresión constitutiva de la construcción S523D-NR llevó a reducciones considerables en el contenido de TSNA para las hojas de tabaco curadas al aire, un fenómeno que más probablemente se atribuya a su capacidad de reducir drásticamente los niveles de nitrato libre en la hoja.

Tabla 7

	WT	35S:GOGAT	35S:S523D-NR
TSNA total (ng/g)	709	649	162
	A	A	B
NNN (ng/g)	287	288	31
	A	A	B
NAT (ng/g)	293	257	83
	A	A	B
NAB (ng/g)	17	14	0.3
	A	A	B
NNK (ng/g)	111	91	48
	A	A	B
Alcaloide total (%)	2.6	2.8	2.6
	A	A	A
Nicotina (%)	2.5	2.6	2.4
	A	A	A
Nornicotina (%)	0.058	0.063	0.058
	A	A	A
Anabasina (%)	0.011	0.011	0.012
	A	A	A
Anatabina (%)	0.075	0.075	0.091
	A	A	A

	WT	35S:GOGAT	35S:S523D-NR
Conversión (%)	2.4	2.6	2.5
	A	A	A
Los promedios con la misma letra no son significativamente diferentes en $\alpha=0.01$. Las mediciones de alcaloides representan el % en peso seco. Los promedios se agrupan de conformidad con el método REGWG, N=33.			

No se observaron diferencias significativas en ningún contenido alcaloide total o de ningún alcaloide individual sometido a ensayo (nicotina, nor nicotina, anabasina y anatabina) entre los tres genotipos. Por el contrario, las principales diferencias en el contenido de TSNA fueron aparentes en los materiales de hoja 35S:S523D-NR que contienen bajo nitrato. Una reducción del 90% en los niveles de NNN se observó en el grupo 35S:S523D-NR en comparación con los controles WT. La acumulación de *N*-nitrosoanatabina (NAT) y NNK se redujo en 72.5% y 55%, respectivamente, en plantas WT 35S:S523D-NR versus WT. Mientras que *N*-nitrosoanabasina (NAB) es típicamente la menos abundante de las TSNA en hojas de tabaco curadas, en las plantas 35S:S523D-NR, la presencia de este compuesto fue casi indetectable (Tabla 7).

El fenotipo de bajo nitrato mediado por la construcción 35S:S523D-NR se asoció con reducciones importantes en el contenido de TSNA de la hoja curada, coherente con el modelo de la formación de TSNA en tabacos curados al aire que postula que los microbios de superficie de hoja utilizan grupos de nitrato en la hoja para producir el nitrito que es directamente responsable de la nitrosación de alcaloides de tabaco. Pese a que las concentraciones de nitrato, alcaloides y TSNA variaron considerablemente en la planta de tabaco de conformidad con la posición del tallo de la hoja, la construcción 35S:S523D-NR

fue eficaz para mediar reducciones de nitrato y TSNA en toda la planta, ya que se observaron reducciones importantes en estos compuestos tanto en hojas de posición superior selecta como en muestras de picadura de tabaco producida a partir del resto de la planta, lo que se sesgaba bastante a favor de las hojas de tallo inferior. Por el contrario, los niveles de nicotina no se alteraron significativamente como consecuencia de la reducción de nitrato mediada por 35S:S523D-NR.

EJEMPLO 5

Análisis de la picadura y humo de cigarrillos hechos con plantas de tabaco de bajo contenido de nitrato

Para determinar el impacto del fenotipo de nitrato reducido en la prevalencia de TSNA en el humo principal, los cigarrillos se hicieron a partir de muestras agrupadas del resto de los materiales de hojas curadas de las plantas 35S:S523D-NR y los controles WT. Las primeras dos muestras de hoja descritas en la sección anterior se tomaron de la tercera posición superior del tallo; por lo tanto, el resto del tejido de hoja usado para hacer la picadura se torció en gran medida hacia las hojas de las posiciones inferiores del tallo de la planta. Debido a que las concentraciones relativas de nitrato, nicotina y TSNA difieren según la posición del tallo, era importante determinar independientemente los niveles de estos compuestos como se representan en la picadura para interpretar de manera exacta los datos de humo correspondientes.

Como se muestra en la Figura 10, la concentración de nitrato promedió 15,800 ppm en la picadura hecha de lámina de hojas WT. Por el contrario, en la picadura generada a partir de plantas 35S:S523D-NR, los niveles de nitrato promediaron 930 ppm, un valor de

aproximadamente 5.9% al observado en el relleno WT y coherente con la relación observada entre estos dos genotipos en hojas de tallo superior curadas (Tabla 5). Las concentraciones mayores globales del nitrato medidas en la picadura de plantas WT y 35S:S523D-NR en comparación con las lecturas de hoja superior (comparar Tabla 5 y Figura 10) es coherente con las observaciones anteriores de que los niveles de nitrato en las hojas inferiores de tabaco son mucho mayores que los encontrados en las hojas superiores. En la Figura 10, todos los materiales de planta de cada genotipo se agruparon según la ubicación (aproximadamente 30 plantas cada una de Clayton y Rocky Mount para 35S:S523D-NR; aproximadamente 40 plantas cada una de las dos ubicaciones para WT). Los datos mostrados representan el promedio y error estándar en ambas ubicaciones. La concentración de nicotina en las hojas de tabaco muestra la tendencia opuesta, con las hojas superiores mostrando mayores concentraciones que las hojas inferiores pese a que la magnitud del diferencial no es tan extrema como la que se observa con nitrato. El contenido de nicotina en la picadura de plantas WT y 35S:S523D-NR promedió 1.6% y 1.7% en peso seco, respectivamente (Figura 10), en comparación con 2.5% y 2.4% en sus hojas superiores respectivas (Tabla 7). En cualquier caso, pese a su tremendo impacto en el contenido de nitrato en la hoja, la expresión constitutiva de la construcción S523D-NR no alteró significativamente los niveles de nicotina de la hoja.

Los resultados de los análisis de TSNA de las picaduras de tabaco se muestran en las Figuras 11A-11E. De manera similar a las observaciones que usan materiales de hoja superior curada (Tabla 7), se observaron reducciones importantes en cada una de las cuatro especies de TSNA usando material de hoja de plantas de bajo contenido de nitrato, pese a que se observaron algunas diferencias en la medida relativa de las reducciones correspondientes. La picadura derivada de plantas 35S:S523D-NR contenía 44%, 64%, 65% y 32% menos NNN, NNK, NAT y NAB, respectivamente, que la picadura hecha a partir

de plantas de control WT, con una reducción total de TSNA observada de 52%. Los niveles de TSNA totales eran algo mayores en el material de picadura en comparación con las hojas superiores curadas (comparar Tabla 7 y Figura 11), un resultado coherente con las observaciones anteriores de que la acumulación de TSNA es mayor en hojas de posiciones de tallo más bajas que las hojas de posición superior. En la Figura 11, los materiales de hoja de cada genotipo se agruparon de conformidad con cada una de las dos ubicaciones como se describe en la Figura 10. Los datos mostrados representan los promedios y error estándar combinados de dos replicaciones por ubicación para el contenido de TSNA de la picadura y tres replicaciones por ubicación para el contenido de TSNA en el humo principal. Los datos de TSNA del humo principal derivado de cigarrillos hechos con la picadura WT y 35S:S523D-NR también se muestran en la Figura 11. Sorprendentemente, la cantidad de la reducción de TSNA total atribuible al fenotipo de bajo nitrato es incluso mayor en el humo principal que la observada en la picadura correspondiente. El humo principal de cigarrillos 35S:S523D-NR mostró una reducción del 76% en el contenido total de TSNA en comparación con cigarrillos WT, en contraste con la reducción del 52% observada en su picadura de tabaco (Figura 11E). Las diferencias en la medida de la reducción en el contenido de TSNA entre las picaduras de tabaco 35S:S523D-NR y WT en contraste con su humo principal correspondiente son más pronunciadas para NNN y NAB. El contenido de NNN del tabaco de relleno no quemado de plantas 35S:S523D-NR fue 44% menor que el relleno WT pero el diferencial en el humo principal aumentó a 78% (Figura 11D). Asimismo, los niveles de NAB de plantas 35S:S523D-NR fueron 32% menores que WT en el relleno, en comparación con una reducción del 86% en el humo principal (Figura 11A). De las cuatro especies de TSNA medidas, NNK fue el único que no pudo mostrar una diferencia estadísticamente significativa en su reducción relativa en la picadura en contraste con el humo principal cuando los resultados de los cigarrillos WT y 35S:S523D-NR se compararon.

Tanto en el humo de picadura como principal, NNK se redujo en aproximadamente 67% en los cigarrillos hechos usando el tabaco 35S:S523D-NR de bajo nitrato en comparación con el control de tabaco WT (Figura 11C). La reducción relativa en los niveles de todas las especies TSNA, excepto NNK, fue incluso mayor en el humo principal de los cigarrillos de bajo nitrato que en la picadura no quemada correspondiente.

La reducción mediada por 35S:S523D-NR en los niveles de nitrato puede mitigar el problema de TSNA en productos de tabaco en dos niveles: (1) reduciendo la producción de TSNA dentro de la hoja curada *en sí misma* y (2) inhibiendo además los procesos por los cuales las TSNA aparecen en el humo principal.

EJEMPLO 6

La sobreexpresión de S523D-NR en un fondo de Burley adicional resulta en reducciones drásticas en la acumulación de nitrato en las hojas

Los vectores de expresión de planta que contienen las construcciones 35S:S523D-NR y E4:S523D-NR se usaron para transformar la planta de cultivo Burley TN90e4e5. Además de la generación de plantas que contienen las construcciones de 35S:S523D-NR y E4:S523D-NR individualmente, ambas construcciones se combinaron en la misma planta para determinar si se podrían obtener las reducciones adicionales en el nitrato más allá de las que se pueden lograr por una única construcción. Para obtener plantas T0 con cada transgén y combinación de transgenes, se empleó una estrategia de cotransformación. Para distinguir el complemento de transgenes en cada planta T0 recuperada, el genotipado a base de PCR se llevó a cabo usando un cebador 5' específico para las regiones de promotor 35S o E4, emparejado con un cebador 3' dirigido contra la región S523D-NR de la construcción. Como control de vector, los discos de hoja TN90e4e5 también se

transformaron con una construcción que contiene el gen reportero GUS en el control de transcripción del promotor E4.

Una vez que las plantas eran suficientemente grandes para transferirse al suelo, las siguientes líneas T0 se cultivaron hasta madurez en un invernadero: Control de vector E4:GUS (12 eventos); 35S:S523D-NR (10 eventos); E4:S523D-NR (11 eventos) y 35S:S523D-NR + E4:S523D-NR (7 eventos). Las plantas se cultivaron en una mezcla de suelo estándar fertilizada con Multicote 4, un fertilizador de liberación controlada (14-14-16 NPK + nutrientes menores). Justo antes del inicio de la floración, dos hojas de la sección media superior de cada planta se cosecharon, los nervios medios se retiraron y el resto de la lámina se secó a 65°C. En la misma fecha de cosecha, dos hojas adicionales se tomaron de la misma sección de cada planta y se trataron con etefón para inducir la senescencia como se describe por Jack et al. (Rec. Adv. Tob. Sci. 33:58-79 (2007)). Una vez que las hojas tratadas con etefón se habían vuelto completamente amarillas (7 - 8 días después del tratamiento), una porción de cada hoja se congeló para análisis de PCR en tiempo real (RT-PCR), mientras que el resto del tejido de hoja se secó totalmente para un análisis de nitrato posterior.

La Tabla 8 muestra el contenido de nitrato de las muestras de hoja verde y “con senescencia artificial” de las plantas T0 (es decir, plantas TN90 e4e5 T0). Las 12 plantas de control de vector E4:GUS independientes mostraron altos niveles de nitrato en sus hojas, variando de 3,938 a 12,730 partes por millón (ppm). En general, la concentración de nitrato en la hoja verde era muy similar a la observada en las hojas tratadas con etefón. A diferencia de los controles de E4:GUS, cinco de diez eventos T0 35S:S523D-NR independientes acumularon menos de 1000 ppm, con tres individuos acumulando 300 ppm o menos en las muestras verdes o tratadas con etefón. Los 11 individuos E4:S523D-NR mostraron alta acumulación de nitrato en la hoja verde (mayor que 3,987 ppm).

Tabla 8

	Hoja verde	Hoja tratada con etefón
<u>Construcción de transgén</u>	<u>NO3 (ppm)</u>	<u>NO3 (ppm)</u>
Control de vector 1-3	11,122	12,102
Control de vector 2-7	9,965	10,615
Control de vector 3-6	10,933	11,786
Control de vector 4-2	11,006	10,135
Control de vector 5-7	7,466	7,238
Control de vector 6-1	4,646	6,473
Control de vector 7-2	3,938	5,344
Control de vector 8-6	11,091	9,956
Control de vector 9-3	8,930	11,325
Control de vector 10-4	9,875	11,964
Control de vector 11-5	10,983	10,841
Control de vector 12-2	12,730	10,499
35S:S523D-NR 1-2	10,978	8,869
35S:S523D-NR 2-2	4,200	2,616
35S:S523D-NR 3-1	404	383
35S:S523D-NR 4-3	779	888
35S:S523D-NR 5-5	126	106
35S:S523D-NR 6-3	3,197	2,648

	Hoja verde	Hoja tratada con etefón
<u>Construcción de transgén</u>	<u>NO3 (ppm)</u>	<u>NO3 (ppm)</u>
35S:S523D-NR 7-4	162	136
35S:S523D-NR 8-5	188	300
35S:S523D-NR 9-6	10,751	10,034
35S:S523D-NR 10-5	8,241	8,659
E4:S523D-NR 1-4	9,487	3,299
E4:S523D-NR 3-4	10,549	3,052
E4:S523D-NR 4-1	8,853	3,886
E4:S523D-NR 5-3	9,725	4,043
E4:S523D-NR 6-2	6,795	2,517
E4:S523D-NR 7-1	3,987	1,804
E4:S523D-NR 8-2	7,670	3,437
E4:S523D-NR 9-7	6,797	2,859
E4:S523D-NR 10-3	4,938	3,218
E4:S523D-NR 11-2	9,685	3,993
E4:S523D-NR 12-3	8,470	4,334
35S+E4:S523D-NR 1-7	7,689	3,921
35S+E4:S523D-NR 3-3	7,348	3,808
35S+E4:S523D-NR 4-5	5,501	5,694

	Hoja verde	Hoja tratada con etefón
<u>Construcción de transgén</u>	<u>NO3 (ppm)</u>	<u>NO3 (ppm)</u>
35S+E4:S523D-NR 5-2	146	159
35S+E4:S523D-NR 7-7	6,686	2,256
35S+E4:S523D-NR 8-1	238	0
35S+E4:S523D-NR 9-5	8,522	9,680

En las hojas tratadas con etofén derivadas de las mismas plantas, sin embargo, se observó una reducción de 2 a 3 veces en los niveles de nitrato (Tabla 8). Se espera que el promotor E4 que controla la expresión de S523D-NR en estas plantas sea inactivo en hojas verdes, pero se vuelva altamente expresado durante el tratamiento con etefón, senescencia y curado al aire. Dos de las siete plantas T0 que contienen ambas construcciones 35S:S523D-NR y E4:S523D-NR mostraron niveles muy bajos de nitrato en la hoja verde (146 y 238 ppm). Los bajos niveles de nitrato en el tejido verde de estas plantas sugieren que la construcción 35S:S523D-NR se expresa activamente en estos dos individuos. En una de estas plantas (35S+E4:S523D-NR 5-2), los niveles de nitrato en las hojas verdes en contraste con las tratadas con etefón permanecieron casi iguales. En la otra planta (35S+E4:S523D-NR 8-1), sin embargo, el nitrato libre era indetectable en las hojas tratadas con etefón. La reducción máxima en la acumulación de nitrato se puede lograr combinando una construcción que impulsa una expresión constitutiva fuerte de S523D-NR con una construcción que media la expresión fuerte de senescencia/específica del curado de S523D-NR. Cabe destacar que no se observaron diferencias fenotípicas obvias entre las plantas T0 que poseen niveles excepcionalmente bajos de nitrato libre y los individuos T0 que muestran niveles normales de nitrato.

Debido a fenómenos como “efectos de posición” y silenciamiento génico, es común en cualquiera de los experimentos de transformación dados, observar una gran variabilidad en los niveles de acumulación de transcripción entre diferentes eventos T0. Los resultados de los ensayos de nitrato en las plantas T0 sugirieron que el transgén S523D-NR se expresaba de manera eficaz en algunos individuos pero no en otros (particularmente respecto de la construcción 35S:S523D-NR). Para evaluar eso, se llevó a cabo un análisis de RT-PCR en las muestras tratadas con etefón amarillas descritas anteriormente. El análisis RT-PCR que usa tejidos de hojas verdes se confundió por el hecho de que el ensayo no distinguió entre las transcripciones de *Nia2* endógenas y las transcripciones derivadas de S523D-NR (ya que sus regiones codificantes solo difieren en un único codón) y un alto nivel de transcripciones NR naturales se detectó en el tejido de hoja verde de las plantas de control. Por el contrario, una acumulación mínima de transcripción NR endógena se detectó en las hojas tratadas con etefón de senescencia artificial. La Figura 12 muestra los niveles de transcripciones NR relativos (normalizados a un gen 1 α de alargamiento de tabaco) en las hojas tratadas con etefón de cada planta T0 enumerada en la Tabla 8, junto con la concentración de nitrato correspondiente. En la Figura 12, los datos de RT-PCR (barras amarillas, escala a la izquierda) muestran la acumulación relativa de las transcripciones de NR (tanto NR endógena como S523D-NR) después de la normalización a una transcripción de referencia del factor 1 α de alargamiento de tabaco. Las casillas rojas indican la concentración de nitrato (escala a la derecha). La acumulación de transcripción NR endógena es relativamente baja y el contenido de nitrato es alto (mayor que 5,000 ppm) en todas las plantas de control de vector. En las plantas T0 que contienen solo la construcción 35S:S523D-NR hubo una muy buena correlación entre la acumulación de transcripción NR alta y el fenotipo de nitrato bajo. Todas la plantas T0 que poseían solo el transgén E4:S523D-NR mostraron un mayor nivel de acumulación de transcripción NR que los

controles de vector y sus niveles de nitrato correspondientes también fueron uniformemente menores. No es sorprendente que los niveles de nitrato no se reduzcan tanto en las plantas E4:S523D-NR en comparación con las plantas 35S:S523D-NR de alta expresión, ya que se esperaba la contribución de la enzima NR desregulada a la reducción de los grupos de nitrato solo después del tratamiento con etefón en las primeras plantas y no durante toda la vida de la planta como se esperaba para los últimos individuos. Una proporción sustancial de las transcripciones NR en las plantas 5-2 y 8-1 dentro de este grupo puede iniciarse desde la construcción 35S:S523D-NR, dado los niveles excepcionalmente bajos de nitrato observados tanto en las muestras de hojas verdes y tratadas con etefón de estas plantas (Tabla 8).

EJEMPLO 7

La sobreexpresión de S523D-NR en plantas T1 muestra una reducción drástica en la acumulación de nitrato en la hoja

Las plantas transgénicas T1 en el fondo TN90e4e5 (incluyendo controles, 1920 plantas) de bandejas flotantes se genotiparon y trasplantaron en dos ubicaciones de campo (diseño de campo totalmente aleatorio). Las muestras de tejido de hoja (lámina) de cada planta se recogieron para hacer un análisis de nitrato y las plantas se colocaron luego en una estructura de curado al aire para generar picadura para el análisis del humo del cigarrillo.

Los datos de nitrato de hojas verdes recogidas en la posición de tallo medio en dos ubicaciones de campo se presentan en las Tablas 9 y 10. Los datos mostraron en ambos casos una fuerte reducción de nitrato debido a la presencia del transgén.

Tabla 9. Efectos de construcciones de gen de nitrato reductasa desregulada en el contenido de NO₃N libre en hojas verdes de plantas transgénicas T1 en fertilización con 300 kg/ha N

REGWQ	Promedio	N	Línea	Genotipo
Agrupamiento	(ppm)		T1	
A	1357	40		Tipo salvaje
A	864	39	GH10-4	E4:GUS
B	22	27	GH8-1	35S:S523D-NR + E4:S523D-NR
B	20	35	GH3-1	35S:S523D-NR
B	18	34	GH5-2	35S:S523D-NR
B	18	39	GH8-5	35S:S523D-NR
B	15	36	GH5-2	35S:S523D-NR + E4:S523D-NR
B	15	34	GH8-1	35S:S523D-NR
B	14	36	C3-11	35S:S523D-NR
B	13	36	GH5-5	35S:S523D-NR

Los promedios con la misma letra no son significativamente diferentes en $\alpha=0.05$. Todas las líneas "GH" están en un fondo TN90e4e5; C3-11 es una línea en DH98-325-6#775 que se incluyó en el estudio de campo de 2013. Los logaritmos de los datos originales se usaron en los análisis, pero los promedios de los datos originales se muestran por conveniencia.

Tabla 10. Efectos de construcciones de gen de nitrato reductasa desregulada en el contenido de NO₃N libre en hojas curadas de plantas transgénicas T1 en fertilización con 300 kg/ha N

REGWQ	Prom				
Agrupamien-	edio	N	Línea T1	Genotipo	
to	(ppm)				
A	1698	40		Tipo salvaje	
A	1215	39	GH10-4	E4:GUS	
B	29	34	GH5-2	35S:S523D-NR	
B	28	36	C3-11	35S:S523D-NR	
B	21	36	GH5-5	35S:S523D-NR	
B	20	36	GH3-1	35S:S523D-NR	
B	20	38	GH8-5	35S:S523D-NR	
B	19	34	GH8-1	35S:S523D-NR	
B	17	29	GH8-1	35S:S523D-NR	+
				E4:S523D-NR	
B	15	34	GH5-2	35S:S523D-NR	+
				E4:S523D-NR	

Los promedios con la misma letra no son significativamente diferentes en $\alpha=0.05$. Todas las líneas "GH" están en un fondo TN90e4e5; C3-11 es una línea en DH98-325-6#775 que se incluyó en el estudio de campo de 2013. Los logaritmos de los datos originales se usaron en los análisis, pero los promedios de los datos originales se muestran por conveniencia.

Podemos concluir de este experimento que expresar el transgén 35S:S523D-NR en el fondo TN90e4e5 más vigoroso es solo igual de eficaz que reducir el contenido de nitrato en la hoja como se observó en la línea inferior DH98 325-6#775.

Algunas líneas (GH3-1, GH8-1 y GH8-5) se seleccionaron para analizar nitrato y alcaloides totales en las hojas curadas (posición de tallo media, volumen de polvo que representa las parcelas de tierra). Generalmente, como se observó antes, los alcaloides totales y la nicotina no se vieron afectados por la presencia del transgén (35S:S523D-NR). Sin embargo, en el fondo TN90e4e5, se observó una leve reducción (15%) en una línea, GH8-5 (Figura 13).

Como se esperaba de resultados anteriores, el nitrato de la hoja se redujo mucho (>95%) en la lámina debido a una asimilación de nitrato más activa. La adición de un transgén regulada por el promotor de senescencia E4 no afectó los datos, sugiriendo así que la actividad de la nitrato reductasa transgénica bajo el control del promotor constitutivo 35S es muy eficaz en hojas verdes (véase Tablas 9 y 10) y suficiente como para reducir el nitrato almacenado en la lámina de la hoja (Figura 14).

La picadura se produjo a partir de hojas curadas y se analizó para determinar TSNA. Cabe destacar que las TSNA se redujeron mucho (~72% para NNN, ~45% para NNK, ~76% para

NAT y ~78% para NAB), lo que indica que la reducción de nitrato en las hojas verdes afecta en gran medida la producción de TSNA en material de picadura (Figura 15).

Exactamente igual que para la línea inferior DH98 325-6#775 transformada con 35S:S523D-NR (véase Ejemplo 2), los cigarrillos se hicieron con el material analizado en la Figura 15 y

se fumaron. Las TSNA se determinaron en humo y los datos se informan en la Figura 16.

Las TSNA se redujeron incluso más en el humo (~90% para NNN, ~66% para NNK, ~88% para NAT y ~92% para NAB) que en la picadura, seguramente debido al impacto de la

menor nitrosación durante la pirólisis. Por lo tanto, en términos generales, esto indica que la

reducción de nitrato en hojas verdes por la sobreexpresión de una forma desregulada de nitrato reductasa reduce en gran medida la producción de TSNA en el humo de tabaco comercial, como TN90e4e5.

Se entiende que la descripción detallada que antecede y los ejemplos adjuntos son simplemente ilustrativos y no se deben considerar limitaciones del alcance de la invención, que se define únicamente por las reivindicaciones adjuntas y sus equivalentes.

Varios cambios y modificaciones a las modalidades descritas serán aparentes para los expertos en la técnica. Estos cambios y modificaciones, incluyendo, entre otros, los que se relacionan con las estructuras químicas, sustituyentes, derivados, intermedios, síntesis, composiciones, formulaciones o métodos de uso de la invención, se pueden hacer sin alejarse del espíritu y alcance de esta.

Para brindar detalles, varios aspectos de la invención se establecen en las siguientes cláusulas numeradas:

Cláusula 1. Un producto de tabaco con niveles reducidos de nitrosamina específica del tabaco (TSNA) que se genera a partir de una planta de tabaco, dicha planta de tabaco se modifica para comprender: (i) un polinucleótido que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que codifica una enzima nitrato reductasa desregulada; (ii)

un polipéptido codificado por el polinucleótido establecido en (i); (iii) un polipéptido que comprende, consiste o consiste esencialmente en una enzima nitrato reductasa desregulada o (iv) una construcción, vector o vector de expresión que comprende el polinucleótido establecido en (i) y donde la expresión o actividad de dicha nitrato reductasa está desregulada en comparación con una planta de tabaco no modificada de control.

Cláusula 2. Un producto de tabaco de conformidad con la cláusula 1, donde la enzima nitrato reductasa desregulada es una enzima nitrato reductasa que es constitutivamente activa.

Cláusula 3. Un producto de tabaco de conformidad con la cláusula 1 o 2, donde la secuencia que codifica una enzima nitrato reductasa desregulada codifica (i) un polipéptido de nitrato reductasa truncado; (ii) un polipéptido de nitrato reductasa que comprende una truncación en el extremo N; (iii) un polipéptido de nitrato reductasa que comprende una truncación de extremo N de 56 aminoácidos; (iv) un polipéptido de nitrato reductasa que comprende una sustitución de aminoácidos en una posición que corresponde a la posición 523 de la sec. con núm. de ident.: 4; o (v) un polipéptido de nitrato reductasa que comprende una sustitución de aminoácidos en una posición que corresponde a la posición 523 de la sec. con núm. de ident.: 4, donde el aminoácido en la posición 523 de la sec. con núm. de ident.: 4 se sustituye por un ácido aspártico.

Cláusula 4. Un producto de tabaco de conformidad con cualquiera de las cláusulas que anteceden, donde el polinucleótido que codifica una nitrato reductasa desregulada es un polinucleótido heterólogo que codifica un polipéptido de nitrato reductasa modificado.

Cláusula 5. Un producto de tabaco de conformidad con la cláusula 4, el polinucleótido heterólogo se enlaza a un promotor que no está asociado de manera natural con un gen de nitrato reductasa endógeno.

Cláusula 6. Un producto de tabaco de conformidad con la cláusula 5, donde el promotor es el promotor del virus del mosaico del coliflor 35S o el promotor CYP82E4.

Cláusula 7. Un producto de tabaco de conformidad con cualquiera de las cláusulas que anteceden, donde el polinucleótido que codifica una nitrato reductasa desregulada comprende una secuencia e polinucleótido de la sec. con núm. de ident.: 5 o la sec. con núm. de ident.: 7.

Cláusula 8. Un producto de tabaco de conformidad con cualquiera de las cláusulas 1 a 3, donde el polinucleótido que codifica una nitrato reductasa desregulada codifica un gen de nitrato reductasa endógena que se modificó por un sistema de edición de genomas o por un mutagén.

Cláusula 9. Un producto de tabaco de conformidad con la cláusula 8, donde el sistema de edición de genomas comprende un sistema basado en CRISPR/Cas diseñado, una nucleasa efectora similar al activador de la transcripción diseñada, una nucleasa de dedos de zinc diseñada o una meganucleasa diseñada.

Cláusula 10. Un producto de tabaco de conformidad con cualquiera de las cláusulas que anteceden, donde el tabaco es un tabaco Burley, oriental, oscuro, tipo cigarro y tabacos curados en atmósfera artificial.

Cláusula 11. Un producto de tabaco de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones que anteceden, que tiene niveles reducidos de nitrosamina específica del tabaco (TSNA) en comparación con un producto de tabaco derivado de una planta de tabaco de control en la que la enzima nitrato reductasa no se desreguló.

Cláusula 12. Un producto de tabaco de la cláusula 11, donde el nivel de TSNA total se mide en una hoja de la planta de tabaco, donde (a) la hoja es recién cosechada; (b) la hoja es curada, almacenada o procesada o (c) la hoja es curada al aire.

Cláusula 13. El producto de tabaco de la cláusula 11 o 12, donde el nivel de al menos una TSNA en el producto de tabaco se reduce en comparación con un nivel de control para al menos una TSNA, donde al menos una TSNA se selecciona del grupo que consiste en *N*-nitrosornicotina (NNN), 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK), *N*-nitrosoanabasina (NAB), *N*-nitrosoanatabina (NAT) y combinaciones de estas.

Cláusula 14. Un producto de tabaco de conformidad con cualquiera de las cláusulas 11 a 13, donde los niveles totales de TSNA se reducen en al menos 50%.

Cláusula 15. Un producto de tabaco de conformidad con la cláusula 11, donde los niveles de TSNA se miden en el humo obtenido de la combustión de hojas de la planta de tabaco.

Cláusula 16. Un producto de tabaco de conformidad con la cláusula 15, donde los niveles totales de TSNA se reducen en al menos 70%.

Cláusula 17. Un método para producir un producto de tabaco donde los niveles de TSNA medidos en el humo obtenido de la combustión de hojas de una planta de tabaco modificada se reducen en comparación con los niveles de TSNA medidos en el humo obtenido de la combustión de una planta de tabaco no modificada, que comprende: (a) modificar una planta de tabaco para que comprenda: (i) un polinucleótido que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que codifica una enzima nitrato reductasa desregulada; (ii) un polipéptido codificado por el polinucleótido establecido en (i); (iii) un polipéptido que comprende, consiste o consiste esencialmente en una enzima nitrato reductasa desregulada o (iv) una construcción, vector o vector de expresión que comprende el polinucleótido establecido en (i) y donde la expresión o actividad de dicha nitrato reductasa está desregulada en comparación con una planta de tabaco no modificada de control; (b) cosechar hojas de tabaco de dicha planta de tabaco modificada y (c) producir un producto de tabaco a partir de las hojas cosechadas.

Cláusula 18. El producto de tabaco de cualquiera de las cláusulas que anteceden, donde la planta de tabaco comprende además un gen de la vía de nornicotina modificado.

Cláusula 19. El producto de tabaco de la cláusula 18, donde el gen de la vía de nornicotina modificado comprende un gen de nicotina desmetilasa modificado o un gen citocromo P450.

5 Cláusula 20. El producto de tabaco de la cláusula 18 o 19, donde la planta de tabaco comprende un gen CYP82E4 modificado o un gen CYP82E10 modificado.

Cláusula 21. El producto de tabaco de la cláusula 20, donde el gen CYP82E4 modificado o un gen CYP82E10 modificado están inactivados.

10 Cláusula 22. El producto de tabaco de cualquiera de las cláusulas que anteceden, donde la planta de tabaco es una variedad seleccionada de un grupo que consiste en tabacos Burley, oriental, oscuro, tipo cigarro y curado en atmósfera artificial.

Cláusula 23. El producto de tabaco de cualquiera de las cláusulas que anteceden, donde el producto de tabaco es un material para fumar, rapé, tabaco de masticar, chicle, pastilla o solución de nicotina.

15 Cláusula 24. Un método para producir un producto de tabaco de cualquiera de las cláusulas 1 a 23, el método comprende: (a) introducir en una célula vegetal un polinucleótido aislado que codifica un gen de nitrato reductasa modificado o gen transportador de nitrato modificado; (b) regenerar la célula transformada para producir una planta transgénica y (c) producir un producto de tabaco a partir de una hoja de la planta transgénica.

20 Cláusula 25. Un método para producir un producto de tabaco de cualquiera de las cláusulas 1 a 23, el método comprende: (a) introducir en una célula vegetal un sistema de edición de genomas que se dirige a un gen de nitrato reductasa endógeno; (b) regenerar la célula transformada para producir una planta transgénica y (c) producir un producto de tabaco a partir de una hoja de la planta transgénica.

Cláusula 26. El método de la cláusula 25, donde el sistema de edición de genomas se une al gen de nitrato reductasa endógena y lo escinde para generar el gen de nitrato reductasa modificado.

Cláusula 27. El método de la cláusula 25 o 26, donde el sistema de edición de genomas comprende un sistema basado en CRISPR/Cas9 diseñado, una nucleasa efectora similar al activador de la transcripción diseñada, una nucleasa de dedos de zinc diseñada o una meganucleasa diseñada.

Cláusula 28. El método de cualquiera de las cláusulas 25 a 27, donde el sistema de edición de genomas se expresa transitoriamente en la planta de tabaco.

Cláusula 29. El método de cualquiera de las cláusulas 25 a 27, donde el sistema de edición de genomas se incorpora en el genoma de la planta de tabaco.

Cláusula 30. El método de cualquiera de las cláusulas 25 a 29, donde la planta de tabaco comprende además un gen de la vía de nornicotina modificado.

Cláusula 31. El método de la cláusula 30, donde el gen de la vía de nornicotina modificado comprende un gen de nicotina desmetilasa modificado o un gen citocromo P450.

Cláusula 32. El método de la cláusula 30 o 31, donde la planta de tabaco comprende un gen CYP82E4 modificado o un gen CYP82E10 modificado.

Cláusula 33. El método de la cláusula 32, donde el gen CYP82E4 modificado o gen CYP82E10 modificado están inactivados.

Cláusula 34. El método de cualquiera de las cláusulas 25 a 33, donde la célula vegetal es de una variedad de tabaco seleccionada del grupo que consiste en tabacos Burley, oriental, oscuro, tipo cigarro y curado en atmósfera artificial.

Cláusula 35. El método de cualquiera de las cláusulas 25 a 34, donde el producto de tabaco es un material para fumar, rapé, tabaco de masticar, chicle, pastilla o solución de nicotina.

Las siguientes secuencias de ácido nucleico y aminoácidos se describen en el listado de secuencias adjunto a la presente:

sec. con num. de ident.:1 – Región codificante de ADNc de Nia1

sec. con num. de ident.:2 – Secuencia de proteína predicha de Nia1p

5 sec. con num. de ident.:3 - Región codificante de ADNc de Nia2 (contiene un residuo Ser en la posición 523)

sec. con num. de ident.:4 – Secuencia de proteína predicha de Nia2p

sec. con num. de ident.:5 – Región codificante de ADNc de Nia2 S523D-NR

10 sec. con num. de ident.:6 – Secuencia de proteína predicha de S523D-NRp (contiene un residuo Asp en la posición 523)

sec. con num. de ident.:7 – Región codificante de ADNc de tr-NR