

REIVINDICACIONES

1. Una célula vegetal de tabaco transgénica que comprende un RNA transgénico antisentido que tiene una secuencia complementaria a una porción de un polinucleótido con una secuencia con entre 96% y 100% de identidad con la sec. con núm. de ident.:2 en donde la cadena de RNA antisentido reduce la expresión o actividad de un polipéptido de nicotina N-desmetilasa en la célula que comprende una secuencia de acuerdo con la sec. con núm. de ident.:3 en comparación con una célula vegetal de tabaco control en donde la expresión o actividad de dicha nicotina N-desmetilasa no ha sido reducida.

2. La célula vegetal de tabaco transgénica de conformidad con la reivindicación 1, que comprende una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E4, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E4, preferentemente, en donde dicha nicotina desmetilasa CYP82E4 se selecciona del grupo que consiste en las secs. con núms. de ident.: 12 a 16, preferentemente, en donde dicha mutación da como resultado una modificación de dicha nicotina desmetilasa CYP82E4 y se produce en una posición seleccionada del grupo que consiste en los residuos de aminoácidos 329, 364, 376, 382, y 458 de la sec. con núm. de ident.: 5, preferentemente, en donde dicha mutación se selecciona del grupo que consiste en: a) una sustitución del codón de parada por el residuo de triptófano en la posición 329 de la sec. con núm. de ident.: 5; b) una sustitución de asparagina por el residuo de lisina en la posición 364 de la sec. con núm. de ident.: 5; c) una sustitución de metionina por el residuo de valina en la posición 376 de la sec. con núm. de ident.: 5; d) una sustitución de serina por el residuo de prolina en la posición 382 de la sec. con núm. de ident.: 5; y d) una sustitución de serina por el residuo de prolina en la posición 458 de la sec. con núm. de ident.: 5.

3. La célula vegetal de tabaco transgénica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, que comprende una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E5, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E5, preferentemente, en donde dicha nicotina desmetilasa CYP82E5 se selecciona de la sec. con núm. de ident.: 24 o 25, preferentemente, en donde dicha mutación da como resultado una modificación de dicha nicotina desmetilasa CYP82E5 y se produce en los residuos de aminoácidos 422 o 449 de la sec. con núm. de ident.: 17, preferentemente, en donde dicha mutación se selecciona del grupo que consiste en: a) un codón de parada sustituido por el residuo de triptófano en la posición 422 de la sec. con núm. de ident.: 17; y b) una leucina sustituida por el residuo de prolina en la posición 449 de la sec. con núm. de ident.: 17.

4. La célula vegetal de tabaco transgénica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E10, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o la función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E10, preferentemente, en donde dicha nicotina desmetilasa CYP82E10 se selecciona del grupo que consiste en las secs. con núms. de ident.: 32 a 35, preferentemente, en donde dicha mutación da como resultado una modificación de dicha nicotina desmetilasa CYP82E10 y se produce en una posición seleccionada del grupo que consiste en los residuos de aminoácidos 79, 107, 382, 419 de la sec. con núm. de ident.: 26, preferentemente, en donde dicha mutación se selecciona del grupo que consiste en: a) una sustitución de serina por el residuo de glicina en la posición 79 de la sec. con núm. de ident.: 26; b) una sustitución de serina por el residuo de prolina en la posición 107 de la sec. con núm. de ident.: 26; c) una sustitución de serina por el residuo de prolina en la posición 382 de la sec. con núm. de ident.: 26; y d) una sustitución de serina por el residuo de prolina en la posición 419 de la sec. con núm. de ident.: 26.

5. La célula vegetal de tabaco transgénica de conformidad con la reivindicación 1, que comprende además

(i) una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E4, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E4, preferentemente, en donde dicha nicotina desmetilasa CYP82E4 se selecciona del grupo que consiste en las secs. con núms. de ident.: 12 a 16, preferentemente, en donde dicha mutación da como resultado una modificación de dicha nicotina desmetilasa CYP82E4 y se produce en una posición seleccionada del grupo que consiste en los residuos de aminoácidos 329, 364, 376, 382, y 458 de la sec. con núm. de ident.:5, preferentemente, en donde dicha mutación se selecciona del grupo que consiste en: a) una sustitución del codón de parada por el residuo de triptófano en la posición 329 de la sec. con núm. de ident.: 5; b) una sustitución de asparagina por el residuo de lisina en la posición 364 de la sec. con núm. de ident.: 5; c) una sustitución de metionina por el residuo de valina en la posición 376 de la sec. con núm. de ident.: 5; d) una sustitución de serina por el residuo de prolina en la posición 382 de la sec. con núm. de ident.: 5; y d) una sustitución de serina por el residuo de prolina en la posición 458 de la sec. con núm. de ident.: 5; y

(ii) una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E5, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E5, preferentemente, en donde dicha nicotina desmetilasa CYP82E5 se selecciona de la sec. con núm. de ident.: 24 o 25, preferentemente, en donde dicha mutación da como resultado una modificación de dicha nicotina desmetilasa CYP82E5 y se produce en los residuos de aminoácidos 422 o 449 de la sec. con núm. de ident.: 17, en donde dicha mutación se selecciona del grupo que consiste en: a) un codón de parada sustituido por el residuo de triptófano en la posición 422 de la sec. con núm. de ident.: 17; y b) una

leucina sustituida por el residuo de prolina en la posición 449 de la sec. con núm. de ident.: 17; y

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

6. La célula vegetal de tabaco transgénica de conformidad con la reivindicación 1 , que comprende además:

(i) una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E4, una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E5 y una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E10, en donde dicha nicotina desmetilasa CYP82E4 comprende la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 13 (W329Stop), dicha nicotina desmetilasa CYP82E5 comprende la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 24 (W422Stop), y dicha nicotina desmetilasa CYP82E10 comprende la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 33 (G79S); o

(ii) una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E4, una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E5 y una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E10, en donde dicha nicotina desmetilasa CYP82E4 comprende la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 13 (W329Stop), dicha nicotina desmetilasa CYP82E5 comprende la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 24 (W422Stop), y dicha nicotina desmetilasa CYP82E10 comprende la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 34 (P107S); o

(iii) una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E4, una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E5 y una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E10, en donde dicha nicotina desmetilasa CYP82E4 comprende la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 13 (W329Stop), dicha nicotina desmetilasa CYP82E5 comprende la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 24 (W422Stop), y dichas nicotina desmetilasas CYP82E10 comprenden la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 35 (P382S).

(iv) una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E4, una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E5 y una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E10, en donde dicha nicotina desmetilasa CYP82E4 comprende la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 13 (W329Stop), dicha nicotina desmetilasa CYP82E5 comprende la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 24 (W422Stop), y dicha nicotina desmetilasa CYP82E10 comprende la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 32 (P419S).

7. La célula vegetal de tabaco transgénica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en donde dicha(s) mutación(es) es una mutación heterocigota u homocigota.

8. La célula vegetal de tabaco transgénica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicha célula vegetal tiene una conversión de nicotina a nornicotina menor del 1 %.
9. Una planta transgénica o un componente o parte de esta que comprende la célula vegetal de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
10. Material vegetal que incluye biomasa, semilla, tallo, flores u hojas a partir de la planta de conformidad con la reivindicación 9.
11. Un producto de tabaco que comprende la célula vegetal de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, al menos una parte de la planta de conformidad con la reivindicación 9 o el material vegetal de conformidad con la reivindicación 10.
12. Un método para preparar una planta de tabaco con niveles reducidos de nornicotina y/o NNN, dicho método comprende las etapas de:
- a) proporcionar una célula vegetal que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica una nicotina N-desmetilasa funcional y que tiene entre el 96 % y 100% de identidad de secuencia con la sec. con núm. de ident.:2;
 - b) insertar un RNA transgénico antisentido que tiene una secuencia complementaria a una porción de polinucleótidos en una célula vegetal de tabaco para crear una célula vegetal transgénica de tabaco; y
 - c) cultivar una planta a partir de la célula, medir el nivel de nornicotina y/o NNN en la planta de tabaco mutante, en donde una disminución en el nivel de nornicotina y/o NNN en la planta de tabaco mutante en comparación con una planta de tabaco

control es indicativo de que los niveles de nornicotina y/o NNN en dicha planta de tabaco mutante se han reducido.

13. El método de conformidad con la reivindicación 12, en donde la planta de tabaco en la etapa (b) es una planta de tabaco mutante, preferentemente, en donde dicha planta de tabaco mutante comprende una mutación en uno o más genes de nicotina N-desmetilasas adicionales.

14. El método de conformidad con la reivindicación 13, en donde dicha planta de tabaco mutante tiene una o más mutaciones adicionales en los genes que consisten en el grupo de CYP82E4, CYP82E5 o CYP82E10 o una combinación de dos o más de estos.

15. Un método para producir material vegetal curado con niveles reducidos de nornicotina en ellos en comparación con un material vegetal control o niveles reducidos de al menos NNN en ellos en comparación con un material vegetal control o una combinación de estos; el método comprende las etapas de:

(a) proporcionar una planta de conformidad con la reivindicación 9 o el material vegetal de conformidad con la reivindicación 10; y

(b) curar el material vegetal durante un período de tiempo de manera que los niveles de al menos nornicotina o NNN sean menores que en un material vegetal curado control.

16. Un método para producir material vegetal curado de conformidad con la reivindicación 16, en donde el material vegetal es hojas curadas o flores.