

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **3 014 919**

(51) Int. Cl.:

A01H 5/12 (2008.01)
C12N 9/00 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.09.2016 PCT/EP2016/070972**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **16.03.2017 WO17042162**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.09.2016 E 16760735 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2025 EP 3346826**

(54) Título: **Plantas con contenido de asparagina reducido**

(30) Prioridad:

09.09.2015 EP 15184528

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

28.04.2025

(73) Titular/es:

PHILIP MORRIS PRODUCTS S.A. (100.00%)
Quai Jeanrenaud 3
2000 Neuchâtel, CH

(72) Inventor/es:

BOVET, LUCIEN

(74) Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

Observaciones:

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

ES 3 014 919 T3

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

DESCRIPCIÓN

Plantas con contenido de asparagina reducido

5 Campo de la invención

La presente invención describe las secuencias de polinucleótidos de genes que codifican la asparagina sintetasa de *Nicotiana tabacum* y variantes, homólogos y fragmentos de estas. Se describen, además, las secuencias polipeptídicas codificadas de ese modo y variantes, homólogos y fragmentos de estas. Se describe, además, la modificación de la expresión de uno o más de estos genes o la actividad de la(s) proteína(s) codificada(s) por estos para modular los niveles de asparagina en una planta.

Antecedentes de la invención

15 La acrilamida es un compuesto químico de fórmula C3H5NO (el nombre IUPAC es prop-2-enamida) y han surgido preocupaciones respecto a su posible toxicidad. El origen de la acrilamida en el aerosol de artículos para fumar que comprenden tabaco puede ser el aminoácido asparagina que puede estar presente en el material de tabaco usado para la producción de dichos artículos para fumar. Por lo tanto, puede ser conveniente reducir los niveles de determinados aminoácidos, tal como asparagina, en plantas, especialmente aquellas plantas que se usan para la producción de tabaco.

20 El documento US2013/0068240 describe plantas de tabaco modificadas genéticamente y productos de tabaco que presentan una reducción en al menos un aminoácido de manera que, calentar y/o quemar el tabaco, genera niveles reducidos de un compuesto derivado de al menos un aminoácido en comparación con una planta de tabaco parental no modificada. Se describe la mutagenización de semillas con etil metano sulfonato (EMS) para obtener líneas de tabaco mutantes con niveles reducidos de asparagina y niveles reducidos de acrilamida en el humo de cigarrillos. Diversos mutantes con EMS se describen en el documento US2013/0068240. En hojas del tallo superior curadas con aire caliente, tres mutantes de EMS, a saber FC Up 10NH-5, FC Up 10NH-18 y FC-Up 10NH-23 mostraron: (i) una reducción del 71 %, del 30 % y del 62 % de asparagina, respectivamente; (ii) una reducción del 47 %, del 42 % y del 44 % de acrilamida en el humo de tabaco, respectivamente y (iii) una reducción del 38 %, un aumento del 111 % y una reducción del 19 % de nicotina en el tabaco del tallo superior curado con aire caliente, respectivamente. Por lo tanto, el máximo nivel de reducción de asparagina y acrilamida de 71 % y 47 %, respectivamente, se logró con el mutante FC Up 10NH-5. Sin embargo, en este mutante, los niveles de nicotina mostraron una reducción del 38 % en comparación con el control. En hojas de tallo medio curadas con aire caliente, tres mutantes de EMS, a saber FC 35 Mid10NH-5, FC Up 10NH-18 y FC-Up 10NH-23 mostraron: (i) una reducción del 6 %, un aumento del 531 % y una reducción del 29 % de asparagina, respectivamente; (ii) una reducción del 19 %, un aumento del 140 % y un aumento del 200 % de acrilamida en el humo de tabaco, respectivamente; y (iii) una reducción del 36 %, un aumento del 113 % y una reducción del 19 % de nicotina en el tabaco de tallo medio curado con aire caliente, respectivamente. Por lo tanto, el máximo nivel de reducción de acrilamida de 19 % se logró con FC Up 10NH-5 pero el nivel de asparagina se redujo solo en 6 % y el nivel de nicotina se redujo en 36 %.

40 El máximo nivel de reducción de asparagina y acrilamida de 71 % y 47 %, respectivamente, se encuentra en las hojas del tallo superior, curadas con aire caliente, de FC Up 10NH-5. Sin embargo, en este mutante los niveles de nicotina mostraron una reducción del 38 % en comparación con el control. En las hojas de tallo medio curadas con aire caliente de FC Up 10NH-5, el nivel de acrilamida se redujo en solo 19 %, el nivel de asparagina se redujo en solo 6 % y nuevamente hubo una reducción en los niveles de nicotina (de 36 %) en comparación con el control.

45 La reducción en el nivel de nicotina no es conveniente debido a que un consumidor del producto de tabaco deberá consumir más tabaco para recibir el mismo nivel de nicotina. También es evidente a partir de los resultados presentados en el documento US2013/0068240 que los niveles de asparagina, acrilamida y nicotina varían de manera amplia y aleatoria entre los diversos mutantes de EMS.

50 Es conveniente encontrar formas alternativas para reducir los niveles de asparagina en una planta y así minimizar la cantidad de acrilamida en el aerosol producido de una parte calentada o quemada de la planta. También es conveniente encontrar maneras de reducir adicionalmente la cantidad de acrilamida a niveles menores que los descritos en el documento US2013/0068240. También es conveniente mantener los niveles de nicotina en la planta. También es conveniente desarrollar métodos que puedan producir plantas con estas propiedades de manera uniforme. La presente invención busca abordar esta necesidad.

60 Sumario de la invención

65 La invención se define por las reivindicaciones adjuntas. Se han identificado seis genes de asparagina sintetasa de longitud completa en *Nicotiana tabacum* denominados *NtASN1-S* (SEQ ID NO: 1), *NtASN1-T* (SEQ ID NO: 3), *NtASN3-S* (SEQ ID NO: 9), *NtASN3-T* (SEQ ID NO: 11), *NtASN5-S* (SEQ ID NO: 5) y *NtASN5-T* (SEQ ID NO: 7). Se descubrió que los genes *ASN3-S* y *ASN3-T* solo tenían un bajo nivel de expresión durante el curado, mientras que se descubrió sorprendentemente que *NtASN1-S*, *NtASN1-T*, *NtASN5-S* y *NtASN5-T* tenían un alto nivel de expresión durante el

curado, por ejemplo, durante las primeras 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas de curado. Adecuadamente, los genes ASN3-S o ASN3-T o las proteínas codificadas por estos no se usan en la presente descripción. En la presente descripción se demuestra que reducir la expresión de *NtASN1* y/o *NtASN5* o la actividad de la(s) proteína(s) codificada(s) por estos contribuye a la reducción de los niveles de asparagina en las hojas curadas, tal como una hoja de tallo medio inferior curada. Esto a su vez resulta en niveles reducidos de acrilamida en el aerosol producido al calentar o quemar la hoja curada. A diferencia de los resultados obtenidos en el documento US2013/0068240, reducir la expresión de *NtASN1* o *NtASN5* no solo resulta en una reducción de la asparagina en las hojas, sino que también resulta en una reducción uniforme de la acrilamida en el aerosol. Esta reducción uniforme de los niveles de asparagina y acrilamida se acompaña de niveles de nicotina en las hojas curadas que son aproximadamente iguales, o mayores, que en una planta de control. Ventajosamente, se pueden obtener valores menores de aproximadamente 89 % de reducción de asparagina y aproximadamente 70 % de reducción de acrilamida esencialmente con un impacto mínimo o nulo sobre el contenido de nicotina en ciertas modalidades de la presente descripción.

Sin pretender limitarse por la teoría, también se ha determinado que la acrilamida producida en el aerosol del tabaco depende del grupo de asparagina que se genera durante el curado de las hojas. Por consiguiente, los niveles de acrilamida en el aerosol pueden modularse (por ejemplo, reducirse) mediante la reducción del grupo de asparagina que se genera durante el curado o secado mediante la modulación (por ejemplo, reducción) de la expresión o actividad de la asparagina sintetasa que está activa durante la fase temprana del curado o el secado. Se describen plantas con un contenido reducido de asparagina y presentan una reducción de la expresión o función de la asparagina sintetasa.

En modalidades, esto se logra mediante el uso de interferencia de ARN o mutación de las secuencias codificantes de la asparagina sintetasa descritas en la presente descripción que se expresan durante el curado o secado. La reducción de los niveles de asparagina reduce la cantidad de acrilamida presente en el aerosol. Cuando se aplica al tabaco, esto resulta en menores cantidades de acrilamida presente en el aerosol que inhala un consumidor de un artículo para fumar, que incluye un producto de tabaco calentado o quemado. Otras ventajas de la presente invención se describen en la presente descripción.

Algunas ventajas

En la presente descripción se muestra que la asparagina se produce de manera activa durante el curado. Se muestra que esta acumulación de asparagina lleva a la formación de acrilamida en el aerosol producido cuando el material vegetal curado se calienta o quema. Ventajosamente, *NtASN1-S*, *NtASN1-T*, *NtASN5-S* y *NtASN5-T* tienen alto nivel de expresión durante el curado, particularmente desde el inicio del curado. La reducción de la expresión de uno o más de estos genes puede resultar en menores niveles de acrilamida en el aerosol debido a que el nivel de asparagina puede reducirse durante todo el proceso de curado.

El impacto es limitado sobre los niveles de nicotina en las plantas modificadas descritas en la presente descripción, lo que es conveniente cuando se pretende usar las plantas modificadas para la producción de plantas de tabaco.

Los métodos descritos en la presente descripción resultan de manera regular en plantas en las que se reduce la acumulación de asparagina durante el curado o secado y también se reduce la formación de acrilamida en el aerosol.

El impacto es limitado sobre la biomasa de las hojas y el fenotipo, lo que es ventajoso al usar las plantas modificadas descritas en la presente descripción con fines comerciales.

La presente descripción permite crear plantas no modificadas genéticamente que pueden ser más aceptables para los consumidores.

La presente descripción no se restringe al uso de plantas mutantes de EMS como en el documento US2013/0068240. Una planta mutante de EMS puede tener menos potencial para brindar propiedades mejoradas a un cultivo después del mejoramiento. Una vez que comenzó el mejoramiento, la(s) característica(s) conveniente(s) de la planta mutante de EMS se pueden perder por diferentes razones. Por ejemplo, pueden necesitarse varias mutaciones, la mutación puede ser dominante o recesiva, y la identificación de una mutación puntual en un gen diana puede ser difícil de lograr. Por el contrario, la presente descripción explota el uso de determinados genes que se pueden manipular específicamente y/o inactivar para producir plantas con un fenotipo conveniente. La descripción puede aplicarse a otras variedades o cultivos de tabaco, ofreciendo de este modo una solución conveniente para reducir al menos la acrilamida.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra el contenido de aspartato (Asp), glutamina (Glu), asparagina (Asn) y aminoácidos (aa) libres totales en 3 tabacos Burley diferentes cultivados en el mismo campo (promedio de 5 réplicas de parcelas) y curados de manera simultánea. Los tres Burley son TN90 (A), Banket A1 (B) y Kentucky 14 (C).

La Figura 2 muestra el curso temporal de la evolución de asparagina, glutamina y aspartato durante el curado de las hojas de Burley.

La Figura 3 muestra la vía de la actividad de la asparagina sintetasa.

- La Figura 4 muestra la correlación que existe entre la presencia de asparagina en grados individuales de tabaco, Virginia (FC), Oriental (OR), Kasturi (KS) o Burley (BU) y una mezcla que comprende una combinación de Virginia (FC), Kasturi (KS) y Oriental (OR) (denominada RRP).
- La Figura 5 muestra los resultados obtenidos cuando se cultivó Swiss Burley Stella en Suiza y se curó en un granero con curado al aire durante 10 semanas (prácticas agrícolas clásicas, BU-AC) o en un horno de curado con aire caliente, exactamente como el tabaco Swiss Virginia (BU-FC). Despues del curado, la lámina de la hoja se molvió y se sometió a la determinación de asparagina (A). Se obtuvo un polvo homogeneizado del material de tabaco (menor o equivalente a 200 micras). El material de tabaco homogeneizado se usó en un artículo generador de aerosol esencialmente como se describe en el documento WO2013098405 para su uso con un dispositivo generador de aerosol. El artículo generador de aerosol se fumó mediante el uso de un régimen de fumar de Health-Canada para determinar el contenido de acrilamida en el aerosol (B).
- La Figura 6 muestra el árbol filogenético de las secuencias de aminoácidos deducidas de los genes de tabaco que corresponden a NtASN1-S, NtASN1-T, NtASN3-S, NtASN3-T, NtASN5-S, NtASN5-T en comparación con las proteínas de *Arabidopsis* AtASN1 (At3g47340), AtASN2 (At5g65010) y AtASN3 (At5g10240) y las proteínas de tomate Solyc06g007180 y Solyc04g055200.
- La Figura 7 muestra la expresión de los genes ASN durante el curado de tabaco Burley de Suiza (Stella) cultivado en Suiza en 2010. Se aisló el ARN de muestras de hojas (posición del tallo medio) recogidas en una forma dependiente del curso temporal en el campo (-4 h) y en los graneros de curado al aire hasta las 96 h de curado. La expresión génica en sondas específicas se determinó mediante el uso de análisis de micromatriz con chips de Affymetrix Tobarray.
- La Figura 8 muestra la expresión de genes ASN en tabaco Swiss Burley (Stella, A y C) y Swiss Virginia (Bright, ITB 683, B y B) después de 48 h de curado.
- La Figura 9 muestra la expresión después de la cosecha de ASN1, ASN5 (A) y ASN3 (B) después de 60 h de curado al aire en 4 hojas de Burley diferentes (posición del tallo inferior) cultivadas en un campo de Payerne en 2013.
- La Figura 10 muestra la expresión de ASN1, ASN5 (panel izquierdo) y ASN3 (panel derecho) en 8 tejidos recogidos de tabaco Burley maduro cultivado en el campo (flor inmadura (flor_Im; hoja en las posiciones de tallo inferior, _LS, media, _MS y superior, _US; pétalo, raíz, sépalo y tallo).
- La Figura 11 muestra el contenido de asparagina en plantas ARNi-ASN1 cultivadas en el invernadero bajo el control del promotor de MMV o E4 y los niveles del transcripto de ASN1 determinados después de 3 días de curado. La cantidad de asparagina se midió en las posiciones de las hojas en tallo medio inferior de 15 plantas de cada evento de transformación (A). La expresión relativa del transcripto de ASN1 se estimó por qPCR mediante el uso de ARN recogido después de 3 días de curado en 15 plantas de cada evento de transformación (B).
- La Figura 12 muestra el contenido de glutamina, aspartato, glutamato y nicotina en plantas ASN1-ARNi cultivadas en el invernadero bajo el control del promotor de MMV o E4. La cantidad de Gln (A), Asp (B), Glu (C) y nicotina (D) se midió en posiciones de la hoja en tallo medio inferior de 15 plantas de cada evento de transformación.
- La Figura 13 muestra el contenido de asparagina en plantas ARNi-ASN5 cultivadas en el invernadero bajo el control del promotor de MMV o E4 y los niveles del transcripto de ASN5 determinados después de 3 días de curado. La cantidad de asparagina se midió en las posiciones de las hojas en tallo medio inferior de 15 plantas de cada evento de transformación (A). La expresión relativa del transcripto de ASN5 se estimó por qPCR mediante el uso de ARN recogido después de 3 días de curado en 15 plantas de cada evento de transformación (B).
- La Figura 14 muestra el contenido de glutamina, aspartato, glutamato y nicotina en plantas ARNi-ASN5 cultivadas en el invernadero bajo el control de los promotores de MMV o E4. La cantidad de Gln (A), Asp (B), Glu (C) y nicotina (D) se midió en posiciones de la hoja en tallo medio inferior de 15 plantas de cada evento de transformación.
- La Figura 15 muestra la biomasa de las hojas de las líneas ARNi-ASN1 y -ASN5. Se recogieron cuatro hojas en la posición de tallo medio de 4 plantas de cada evento de transformación, se seleccionaron aleatoriamente y se pesaron. Se muestra el promedio del peso y la desviación estándar.
- La Figura 16 muestra la expresión de *CYP82E4* durante las etapas tempranas del curado al aire de Swiss Burley (Stella). Los transcriptos se determinaron mediante el uso de chips Tobarray Affymetrix basados en la sonda específica NTPMla1g2e2_st para citocromo P450 monooxigenasa CYP82E4.
- La Figura 17 muestra el porcentaje de la reducción de asparagina en las variantes de ASN. Los valores de porcentaje se calculan contra segregantes no transformados WT para cada línea variante.
- La Figura 18 muestra la biomasa de las hojas curadas (4) cosechadas en posición de tallo medio inferior.
- La Figura 19 muestra la determinación de acrilamida en el aerosol generado a partir de calentar un artículo formador de aerosol, como se describe en el documento WO2013/098405, fabricado de hojas ARNi-ASN1, ARNi-ASN5 y sus hojas de control correspondientes. Se determinó la asparagina en polvo fino de hojas ARNi-ASN1, ARNi-ASN5 y hojas de control (véase la Figura 11 y Figura 13) después de mezclar con 50 % de tabaco Virginia (A, C). La mezcla de tabaco se transformó en hoja moldeada y se calentó dentro de un artículo formador de aerosol. Despues se determinó la acrilamida en el aerosol (B, D).
- La Figura 20 muestra la determinación de acrilamida en el humo de un cigarrillo combustible fabricado de picadura de lámina de hoja de tallo medio de ARNi-ASN1 y su control correspondiente. Se determinó la asparagina (panel A) en picadura preparada a partir de hojas ARNi-ASN1 y control. Los cigarrillos combustibles se fumaron y se analizó la acrilamida en el humo.
- La Figura 21 muestra la determinación de acrilamida en el aerosol de un artículo generador de aerosol fabricado de hojas de mutante ASN1-S_parada y de control (segregantes no transformados WT). Se determinó la asparagina en polvo fino de hojas del mutante ASN1-S_parada y hojas de control despues de mezclar con 50 % de tabaco Virginia (A). La mezcla de tabaco se transformó en hoja moldeada y se generó aerosol a partir del artículo formador de aerosol. Despues se determinó la acrilamida en el aerosol (B).

La Figura 22 muestra ejemplos de vectores usados para generar plantas ARNi-ASN.

Definiciones

- 5 Los términos técnicos y expresiones usados dentro del alcance de esta solicitud generalmente tendrán el significado aplicado comúnmente para ellos en la técnica pertinente a la biología molecular y de plantas. Todas las definiciones de los términos siguientes se aplican a todo el contenido de esta solicitud. La palabra "que comprende" no excluye otros elementos o etapas, y los artículos indefinidos "un" o "una" no excluyen una pluralidad. Una sola etapa puede cumplir con las funciones de varias características enumeradas en las reivindicaciones. Los términos "alrededor de", "esencialmente" y "aproximadamente" en el contexto de un valor o intervalo numérico dado se refieren a un valor o intervalo que está dentro del 20 %, dentro del 10 %, o dentro del 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 % del valor o intervalo dado.
- 10 El término "aislado" se refiere a cualquier entidad que se toma de su ambiente natural, pero el término no implica ningún grado de purificación.
- 15 15 Un "vector de expresión" es un vehículo de ácido nucleico que comprende una combinación de componentes de ácido nucleico para permitir la expresión del ácido nucleico. Los vectores de expresión adecuados incluyen episomas capaces de una replicación extracromosómica tales como plásmidos de ácido nucleicos circulares biciatenarios; plásmidos de ácidos nucleicos lineales biciatenarios; y otros vectores de expresión equivalentes funcionalmente de cualquier origen. Un vector de expresión comprende al menos un promotor que se ubica corriente arriba y se une operativamente a un ácido nucleico, constructos de ácidos nucleicos o conjugado de ácido nucleico, como se define más abajo.
- 20 25 El término "constructo" se refiere a un fragmento de ácido nucleico biciatenario recombinante que comprende uno o más polinucleótidos. El constructo comprende una "cadena molde" con apareamiento de bases con una "cadena codificante o sentido" complementaria. Un constructo dado puede insertarse en un vector en dos orientaciones posibles, ya sea en la misma orientación (o sentido) o en la orientación inversa (o antisentido) con respecto a la orientación de un promotor que se ubica dentro de un vector, tal como un vector de expresión.
- 30 35 40 Un "vector" se refiere a un vehículo de ácido nucleico que comprende una combinación de componentes de ácidos nucleicos para permitir el transporte del ácido nucleico, constructos de ácidos nucleicos y conjugados de ácidos nucleicos y similares. Los vectores adecuados incluyen episomas capaces de una replicación extracromosómica tales como plásmidos de ácidos nucleicos circulares biciatenarios; plásmidos de ácidos nucleicos lineales biciatenarios; y otros vectores de cualquier origen.
- 45 50 55 60 65 Un "promotor" se refiere a un elemento/secuencia de ácido nucleico, que típicamente se ubica corriente arriba y se une operativamente a un fragmento de ADN biciatenario. Los promotores pueden derivarse totalmente de regiones próximas a un gen de interés natural, o pueden componerse de elementos diferentes derivados de promotores nativos diferentes o segmentos de ADN sintéticos. Los términos "homología, identidad o similitud" se refieren al grado de similitud de secuencias entre dos polipéptidos o entre dos moléculas de ácidos nucleicos comparadas mediante alineación de secuencias. El grado de homología entre dos secuencias de ácidos nucleicos discretas que se comparan es una función del número de nucleótidos idénticos, o coincidentes, en posiciones comparables. El por ciento de identidad puede determinarse mediante inspección visual y cálculos matemáticos. Alternativamente, el por ciento de identidad de dos secuencias de ácidos nucleicos puede determinarse al comparar la información de las secuencias mediante el uso de un programa informático tal como, ClustalW, BLAST, FASTA o Smith-Waterman. El porcentaje de identidad para dos secuencias puede tomar diferentes valores en dependencia de: (i) el método que se usó para alinear las secuencias, por ejemplo, ClustalW, BLAST, FASTA, Smith-Waterman (que se implementa en diferentes programas) o alineación estructural de la comparación 3D; y (ii) los parámetros que se usaron por el método de alineación, por ejemplo, alineación local frente a global, la matriz de puntuación por pares que se usó (por ejemplo, BLOSUM62, PAM250, Gonnet, etc.), y la penalización por espacios, por ejemplo, forma funcional y constantes. Después de realizar la alineación, existen diferentes formas de calcular el porcentaje de identidad entre las dos secuencias. Por ejemplo, uno puede dividir el número de identidades por: (i) la longitud de la secuencia más corta; (ii) la longitud de alineación; (iii) la longitud media de la secuencia; (iv) el número de posiciones sin espacio; o (iv) el número de posiciones equivalentes que excluye salientes. Además, se apreciará que el porcentaje de identidad también depende fuertemente de la longitud. Por lo tanto, cuanto más corto sea un par de secuencias, mayor será la identidad de secuencia que uno puede esperar que ocurra al azar. El popular programa de múltiples alineamientos ClustalW (*Nucleic Acids Research* (1994) 22, 4673-4680; *Nucleic Acids Research* (1997), 24, 4876-4882) es un modo adecuado para generar múltiples alineaciones de polipéptidos o polinucleótidos. Los parámetros adecuados para ClustalW pueden ser los siguientes: Para alineaciones de polinucleótidos: Penalización por apertura de espacio= 15,0, Penalización por extensión de espacio = 6,66 y Matriz = Identidad. Para alineaciones de polipéptidos: Penalización por apertura de espacio = 10,0, Penalización por extensión de espacio = 0,2, y Matriz = Gonnet. Para alineaciones de ADN y proteínas: ENDGAP = -1, y GAPDIST = 4. Los expertos en la técnica sabrán que puede ser necesario variar estos y otros parámetros para una alineación óptima de las secuencias. Adecuadamente, el cálculo del porcentaje de identidad se calcula entonces a partir de tal

alineación como (N/T), donde N es el número de posiciones en las que las secuencias comparten un residuo idéntico, y T es el número total de posiciones comparadas que incluyen espacios pero excluyen salientes.

Una "variante" significa una secuencia esencialmente similar. Una variante puede tener una función similar o una función esencialmente similar a una secuencia de tipo silvestre. Para la asparagina sintetasa, una función similar es al menos aproximadamente 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % de la función enzimática de tipo silvestre de convertir aspartato en asparagina en las mismas condiciones. Para la asparagina sintetasa, una función esencialmente similar es al menos aproximadamente 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de la función enzimática de tipo silvestre de convertir aspartato en asparagina en las mismas condiciones. Las variantes pueden tener una o más mutaciones favorables que dan como resultado que la enzima tenga un nivel reducido de la actividad de asparagina sintetasa en comparación con el polipéptido de tipo silvestre. Las variantes pueden tener una o más mutaciones favorables que dan como resultado la inactivación de su actividad asparagina sintetasa (es decir, 100 % de inhibición y, por lo tanto, un polipéptido no funcional). Una variante ilustrativa de ASN1-S de tipo silvestre es ASN1-S_W156* (SEQ ID NO 19 y 20) que tiene una mutación de parada favorable que da como resultado una reducción de aproximadamente 17 % en asparagina en comparación con el polipéptido ASN1-S de tipo silvestre. Una variante ilustrativa de ASN1-T de tipo silvestre es ASN1-T_W156* (SEQ ID NO 21 y 22) que tiene una mutación de parada favorable que da como resultado una reducción de aproximadamente 83 % en asparagina en comparación con el polipéptido ASN1-S de tipo silvestre. Una variante ilustrativa de ASN5-S de tipo silvestre es ASN5-S_Q66* (SEQ ID NO 23 y 24) que tiene una mutación de parada favorable que da como resultado una reducción de aproximadamente 44 % en asparagina en comparación con el polipéptido ASN1-S de tipo silvestre.

El término "planta" se refiere a cualquier planta o parte de una planta en cualquier etapa de su ciclo de vida o desarrollo, y sus progenies. En una modalidad, la planta es una "planta de tabaco", que se refiere a una planta que pertenece al género Nicotiana. En la presente descripción se describen especies preferidas de plantas de tabaco. Adecuadamente, la planta es una planta mutante, de origen no natural o transgénica en la que la expresión de uno o más genes o la actividad de una o más proteínas se modulan en comparación con una planta de control. Adecuadamente, la alteración que hace que una planta sea una planta mutante, de origen no natural o transgénica da como resultado la modulación de la expresión de uno o más genes o la modulación de la actividad de una o más proteínas. En ciertas modalidades, la alteración es una alteración genética o una modificación genética.

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

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

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

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

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

El término 'de origen no natural' como se usa en la presente descripción describe una entidad (por ejemplo, un polinucleótido, una mutación genética, un polipéptido, una planta, y una célula vegetal y material vegetal) que no se forma naturalmente o que no existe en la naturaleza. Dichas entidades de origen no natural o entidades artificiales pueden producirse, sintetizarse, iniciarse, modificarse, intervenirse, o manipularse mediante métodos que se describen en la presente descripción o que se conocen en la técnica. Dichas entidades de origen no natural o entidades artificiales pueden producirse, sintetizarse, iniciarse, modificarse, intervenirse, o manipularse por el hombre. Por lo tanto, a modo de ejemplo, una planta de origen no natural, una célula vegetal de origen no natural o material vegetal

- de origen no natural puede producirse mediante el uso de tecnologías de manipulación genética, tales como ARN antisentido, ARN de interferencia, meganucleasa y similares. A modo de ejemplo adicional, una planta de origen no natural, una célula vegetal de origen no natural o material vegetal de origen no natural puede producirse mediante introgresión de, o al transferir una o más mutaciones genéticas (por ejemplo uno o más polimorfismos) a partir de una primera planta o célula vegetal dentro de una segunda planta o célula vegetal (la cual puede ser en sí misma de origen natural), de manera que la planta, célula vegetal o material vegetal resultantes o la progenie de estas comprende una constitución genética (por ejemplo, un genoma, un cromosoma o un segmento de estos) que no se forma naturalmente o que no existe en la naturaleza. Por lo tanto, la planta, célula vegetal o material vegetal resultantes son artificiales o de origen no natural. En consecuencia, una planta o célula vegetal artificial o de origen no natural puede producirse mediante la modificación de una secuencia genética en una primera planta o célula vegetal de origen natural, incluso si la secuencia genética resultante se produce naturalmente en una segunda planta o célula vegetal que comprende un fondo genético diferente de la primera planta o célula vegetal.
- El término "modular" puede referirse a reducir, inhibir, aumentar o afectar de cualquier otra manera la expresión o actividad de un polipéptido. El término puede referirse, además, a reducir, inhibir, aumentar o afectar de cualquier otra manera la actividad de un gen que codifica un polipéptido lo cual puede incluir, pero no se limita a, modular la actividad transcripcional.
- El término "reducir" o "reducido", como se usa en la presente descripción, se refiere a una reducción de aproximadamente 10 % a aproximadamente 99 %, o una reducción de al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o al menos 100 % o más de una cantidad o una actividad, tal como, pero no se limita a, la actividad de un polipéptido, la actividad transcripcional y la expresión de proteínas.
- El término "inhibir" o "inhibido" como se usa en la presente descripción, se refiere a una reducción de aproximadamente 98 % a aproximadamente 100 %, o una reducción de al menos 98 %, al menos 99 %, pero particularmente de 100 %, de una cantidad o una actividad, tal como pero no se limitan a la actividad de un polipéptido, la actividad transcripcional y la expresión de proteínas.
- La transformación de una célula puede ser estable o transitoria. El término "transformación transitoria" o "transformada transitoriamente" o variaciones de estos se refiere a la introducción de uno o más polinucleótidos exógenos en una célula en ausencia de integración del polinucleótido exógeno en el genoma de la célula huésped. A diferencia del término "transformación estable" o "transformada de manera estable" se refiere a la introducción e integración de uno o más polinucleótidos exógenos en el genoma de una célula. El término "transformador estable" se refiere a una célula que integró de manera estable uno o más polinucleótidos exógenos en el ADN genómico u organelar. Debe entenderse que un organismo o su célula que se transformó con los ácidos nucleicos, constructos y/o vectores de la presente descripción pueden transformarse transitoriamente así como también de manera estable. En ciertas modalidades, se prefiere la transformación estable.
- El término "aumentar" o "aumentado" como se usa en la presente descripción, se refiere a un aumento de aproximadamente 5 % a aproximadamente 99 %, o un aumento de al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 100 % o más de una cantidad o una actividad, tal como, pero no se limita a, la actividad de un polipéptido, la actividad transcripcional y la expresión de proteínas.
- El término "esencialmente" como se usa en la presente descripción y cuando se usa en el contexto de una cantidad significa que la cantidad es al menos aproximadamente 10 %, al menos aproximadamente 9 %, al menos aproximadamente 8 %, al menos aproximadamente 7 %, al menos aproximadamente 6 %, al menos aproximadamente 5 %, al menos aproximadamente 4 %, al menos aproximadamente 3 %, al menos aproximadamente 2 %, al menos aproximadamente 1 % o al menos aproximadamente 0,1 % de la cantidad con la que se compara.
- El término "control" en el contexto de una planta control o célula vegetal control y similares significa una planta o célula vegetal en las cuales la expresión o actividad del gen o proteína de interés no se moduló y por tanto puede proporcionar una comparación o referencia con una planta o célula vegetal en las cuales se modificó la expresión o actividad de la enzima. Por tanto, en el contexto de la presente invención, el control no incluirá al menos una alteración genética que reduce la expresión o actividad de la asparagina sintetasa. La planta control o célula vegetal puede comprender un vector vacío. La planta control o célula vegetal puede corresponder a una planta de tipo silvestre o célula vegetal de tipo silvestre y similares. En todos estos casos, la planta de la presente descripción y la planta de control se cultivan y se cosechan con el uso de los mismos protocolos para propósitos comparativos. Los cambios en los niveles, relaciones, actividad o distribución de los genes o polipéptidos descritos en la presente descripción, o los cambios en el fenotipo de la planta, particularmente una reducción de la acumulación de asparagina y/o reducción de la acumulación de acrilamida y/o aumento de la acumulación de glutamina y/o aumento de la acumulación de ácido aspártico y/o aumento de la acumulación de ácido glutámico, pueden medirse comparando una planta de la presente con la planta de control, adecuadamente, cuando la planta de la presente y la planta de control se cultivaron y/o

cosecharon mediante el uso de los mismo protocolos. La planta control puede proporcionar un punto de referencia para medir los cambios en el fenotipo de la planta objeto. La medición de los cambios en el fenotipo puede medirse en cualquier momento en una planta, incluso durante el desarrollo de la planta, la senescencia o después del curado. La medición de los cambios en el fenotipo puede medirse en plantas que se cultivaron bajo cualquier condición, incluso a partir de plantas que se cultivaron en cámara de cultivo, invernadero, o en un campo. Los cambios en el fenotipo pueden medirse mediante la medición del contenido de asparagina y/o el contenido de glutamina y/o el contenido de ácido aspártico y/o el contenido de ácido glutámico (como se describe en Moldoveanu (2005)) y/o el contenido de acrilamida (como se describe en Papousek y otros, 2014 y/u Onoa y otros, 2003 y/o Método 8032A de la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos – Acrilamida mediante cromatografía gaseosa, revisión 1, diciembre 1996 y/o el contenido de nicotina (mediante el uso del método número 62 recomendado por el Centro de Cooperación para la Investigación Científica relacionada con el Tabaco (CORESTA), Determinación de nicotina en tabaco y productos de tabaco mediante análisis de cromatografía gaseosa (febrero 2005)) y pueden monitorearse antes y/o después del curado o secado mediante el uso de métodos conocidos en la técnica. Los análisis de aminoácidos libres se llevan a cabo mediante el uso de un método adaptado de Moldoveanu (2005).

15 Descripción detallada

En una modalidad, se proporciona un polinucleótido aislado que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia polinucleotídica que tiene al menos 60 % de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias descritas en la presente descripción, que incluyen cualquiera de los polinucleótidos mostrados en el listado de secuencias. Adecuadamente, el polinucleótido aislado comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que tiene al menos 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con estas. De manera más adecuada, el polinucleótido aislado comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que tiene al menos 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con estas. Las alineaciones de las secuencias descritas en la presente descripción se muestran en la Tabla 1.

30 En otra modalidad, se proporciona un polinucleótido aislado que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia polinucleotídica que tiene al menos 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:7 o SEQ ID NO:9 o SEQ ID NO:11. Adecuadamente, el polinucleótido aislado de la SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:7 o SEQ ID NO:9 o SEQ ID NO:11 comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que tiene al menos aproximadamente 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % o 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:7 o SEQ ID NO:9 o SEQ ID NO:11. De manera más adecuada, el polinucleótido aislado comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que tiene al menos 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:7 o SEQ ID NO:9 o SEQ ID NO:11.

45 De manera más adecuada, el polinucleótido aislado comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:1.

50 De manera más adecuada, el polinucleótido aislado comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que tiene al menos 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:7 o SEQ ID NO:9 o SEQ ID NO:11.

55 En otra modalidad, se proporciona un polinucleótido aislado que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia polinucleotídica que tiene al menos 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:19 o SEQ ID NO:21 o SEQ ID NO:23 con la condición de que dicho polinucleótido aislado comprenda la mutación que codifica el codón de parada en una posición equivalente a la posición establecida en la SEQ ID NO:19 o SEQ ID NO:21 o SEQ ID NO:23.

60 Adecuadamente, el polinucleótido aislado comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que tiene al menos aproximadamente 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:19 o SEQ ID NO:21 o SEQ ID NO:23. De manera más adecuada, el polinucleótido aislado comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que tiene al menos 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:19 o SEQ ID NO:21 o SEQ ID NO:23.

65 En otra modalidad, se proporciona un polinucleótido que comprende, consiste o consiste esencialmente en un

polinucleótido con homología sustancial (es decir, similitud de secuencias) o identidad sustancial con la SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:7 o SEQ ID NO:9 o SEQ ID NO:11.

- 5 En otra modalidad, se proporciona un polinucleótido que comprende, consiste o consiste esencialmente en un polinucleótido con homología sustancial (es decir, similitud de secuencia) o identidad sustancial con la SEQ ID NO:19 o SEQ ID NO:21 o SEQ ID NO:23 con la condición de que dicho polinucleótido aislado comprenda la mutación que codifica el codón de parada en una posición equivalente a la posición establecida en la SEQ ID NO:19 o SEQ ID NO:21 o SEQ ID NO:23.
- 10 En otra modalidad, se proporcionan variantes de polinucleótidos que tienen al menos aproximadamente 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 75 %, 78 %, 80 %, 85 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 % o 99,9 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:7 o SEQ ID NO:9 o SEQ ID NO:11. Adecuadamente, se proporcionan variantes de polinucleótidos que tienen al menos aproximadamente 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 78 %, 80 %, 85 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 % o 99,9 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:7 o SEQ ID NO:9 o SEQ ID NO:11.
- 15 20 Adecuadamente, se proporcionan variantes de polinucleótidos que tienen al menos aproximadamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 % o 99,9 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO:1.
- 25 Adecuadamente, se proporcionan variantes de polinucleótidos que tienen al menos aproximadamente 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 78 %, 80 %, 85 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 % o 99,9 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:7 o SEQ ID NO:9 o SEQ ID NO:11.
- 30 35 En otra modalidad, se proporcionan variantes de polinucleótidos que tienen al menos aproximadamente 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 75 %, 78 %, 80 %, 85 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 % o 99,9 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO:19 o SEQ ID NO:21 o SEQ ID NO:23 con la condición de que dichas variantes de polinucleótidos comprendan la mutación que codifica el codón de parada en una posición equivalente a la posición establecida en la SEQ ID NO:19 o SEQ ID NO:21 o SEQ ID NO:23. Adecuadamente, se proporcionan variantes de polinucleótidos que tienen al menos aproximadamente 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 78 %, 80 %, 85 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 % o 99,9 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO:19 o SEQ ID NO:21 o SEQ ID NO:23 con la condición de que dichas variantes de polinucleótidos comprendan la mutación que codifica el codón de parada en una posición equivalente a la posición establecida en la SEQ ID NO:19 o SEQ ID NO:21 o SEQ ID NO:23.
- 40 45 En otra modalidad, se proporcionan fragmentos de la SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:7 o SEQ ID NO:9 o SEQ ID NO:11 con homología sustancial (es decir, similitud de secuencias) o identidad sustancial con estas 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 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % o 100 % de identidad de secuencia con los fragmentos correspondientes de la SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:7 o SEQ ID NO:9 o SEQ ID NO:11.
- 50 En otra modalidad, se proporcionan fragmentos de la SEQ ID NO:1 con homología sustancial (es decir, similitud de secuencias) o identidad sustancial con esta que tienen al menos aproximadamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % o 100 % de identidad de secuencia con el fragmento correspondiente de la SEQ ID NO:1.
- 55 60 En otra modalidad, se proporcionan fragmentos de la SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:7 o SEQ ID NO:9 o SEQ ID NO:11 con homología sustancial (es decir, similitud de secuencias) o identidad sustancial con estas 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 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % o 100 % de identidad de secuencia con los fragmentos correspondientes de la SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:7 o SEQ ID NO:9 o SEQ ID NO:11.
- 65 Adecuadamente, se proporcionan fragmentos de variantes de polinucleótidos de la SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:7 o SEQ ID NO:9 o SEQ ID NO:11 con homología sustancial (es decir, similitud de secuencias) o identidad sustancial con estas que tienen al menos aproximadamente 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 78 %, 80 %, 85 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 % o 99,9 % de identidad de secuencia con los fragmentos correspondientes de la SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:7 o SEQ ID NO:9 o SEQ ID NO:11.

- 5 Adecuadamente, se proporcionan fragmentos de variantes de polinucleótidos de la SEQ ID NO:1 con homología sustancial (es decir, similitud de secuencias) o identidad sustancial con esta que tienen al menos aproximadamente 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 78 %, 80 %, 85 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 % 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 % o 99,9 % de identidad de secuencia con los fragmentos correspondientes de la SEQ ID NO:1.
- 10 Adecuadamente, se proporcionan fragmentos de variantes de polinucleótidos de la SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO.:5 o SEQ ID NO:7 o SEQ ID NO:9 o SEQ ID NO:11 con homología sustancial (es decir, similitud de secuencias) o identidad sustancial con estas que tienen al menos aproximadamente 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 78 %, 80 %, 85 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 % 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 % o 99,9 % de identidad de secuencia con los fragmentos correspondientes de la SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO.:5 o SEQ ID NO:7 o SEQ ID NO:9 o SEQ ID NO:11.
- 15 En otra modalidad, se proporcionan fragmentos de polinucleótidos de la SEQ ID NO:19 o SEQ ID NO:21 o SEQ ID NO:23 con homología sustancial (es decir, similitud de secuencia) o identidad sustancial con estas que tienen al menos aproximadamente 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 78 %, 75 %, 80 %, 85 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 % 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % o 100 % de identidad de secuencia con los fragmentos correspondientes de la SEQ ID NO:19 o SEQ ID NO:21 o SEQ ID NO:23 con la condición de que dichos fragmentos comprendan la mutación que codifica el codón de parada en una posición equivalente a la posición establecida en la SEQ ID NO:19 o SEQ ID NO:21 o SEQ ID NO:23. Adecuadamente, se proporcionan fragmentos de polinucleótidos de la SEQ ID NO:19 o SEQ ID NO:21 o SEQ ID NO:23 con homología sustancial (es decir, similitud de secuencia) o identidad sustancial con estas que tienen al menos aproximadamente 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 78 %, 80 %, 85 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 % 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 % o 99,9 % de identidad de secuencia con los fragmentos correspondientes de la SEQ ID NO:19 o SEQ ID NO:21 o SEQ ID NO:23 con la condición de que dichos fragmentos comprendan la mutación que codifica el codón de parada en una posición equivalente a la posición establecida en la SEQ ID NO:19 o SEQ ID NO:21 o SEQ ID NO:23.
- 20 En otra modalidad, se proporcionan polinucleótidos que comprenden un grado de identidad o similitud suficiente o sustancial con la SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:7 o SEQ ID NO:9 o SEQ ID NO:11 que codifica un polipéptido que funciona como una asparagina sintetasa. Adecuadamente, el(los) polinucleótido(s) descrito(s) en la presente descripción codifica(n) una proteína con actividad de asparagina sintetasa que es al menos aproximadamente 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % o más de la actividad de la proteína establecida en la SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:6 o SEQ ID NO:8 o SEQ ID NO:10 o SEQ ID NO:12.
- 25 En otra modalidad, se proporcionan polinucleótidos que comprenden un grado de identidad o similitud suficiente o sustancial con la SEQ ID NO:19 o SEQ ID NO:21 o SEQ ID NO:23 que codifican un polipéptido que funciona como una asparagina sintetasa con la condición de que dichos polinucleótidos comprendan la mutación que codifica el codón de parada en una posición equivalente a la posición establecida en la SEQ ID NO:19 o SEQ ID NO:21 o SEQ ID NO:23. Adecuadamente, el(los) polinucleótido(s) descrito(s) en la presente descripción codifica(n) una proteína con actividad de asparagina sintetasa que es al menos aproximadamente 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % o más de la actividad de la proteína establecida en la SEQ ID NO:19 o SEQ ID NO:21 o SEQ ID NO:23.
- 30 En otra modalidad, se modula la expresión de un polinucleótido que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que codifica una asparagina sintetasa y que tiene al menos 72 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:7.
- 35 Para determinar si un polipéptido es una asparagina sintetasa funcional, se puede usar el ensayo descrito por Romagni y Dayan (2000) *J Agric Food Chem.* Mayo;48(5):1692-6. En otra modalidad, se proporcionan polinucleótidos que comprenden un grado de identidad o similitud suficiente o sustancial con la SEQ ID NO:19 o SEQ ID NO:21 o SEQ ID NO:23 que codifican un polipéptido que funciona como una asparagina sintetasa con la condición de que dichos polinucleótidos comprendan la mutación que codifica el codón de parada en una posición equivalente a la posición establecida en la SEQ ID NO:19 o SEQ ID NO:21 o SEQ ID NO:23. Adecuadamente, el(los) polinucleótido(s) descrito(s) en la presente descripción codifica(n) una proteína con actividad de asparagina sintetasa que es al menos aproximadamente 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % o más de la actividad de la proteína establecida en la SEQ ID NO:19 o SEQ ID NO:21 o SEQ ID NO:23.
- 40 En ciertas modalidades, se modula la expresión de un polinucleótido que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que codifica una asparagina sintetasa y que tiene al menos 72 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:7.
- 45 En ciertas modalidades, se modula la expresión de un polinucleótido que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que codifica una asparagina sintetasa y que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:1.
- 50 En ciertas modalidades, se modula la expresión de un polinucleótido que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que codifica una asparagina sintetasa y que tiene al menos 72 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:7.
- 55 En ciertas modalidades, se modula la expresión de un polinucleótido que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que codifica una asparagina sintetasa y que tiene al menos 72 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:7.
- 60 En ciertas modalidades, se modula la expresión de un polinucleótido que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que codifica una asparagina sintetasa y que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:1.

En ciertas modalidades, se modula la expresión de un polinucleótido que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que codifica una asparagina sintetasa y que tiene al menos 72 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:7.

- 5 En ciertas modalidades, se modula la expresión de un polinucleótido que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que codifica una asparagina sintetasa y que tiene al menos 72 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:3. En ciertas modalidades, se modula la expresión de un polinucleótido que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que codifica una asparagina sintetasa y que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:1 y al menos 72 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:3. En ciertas modalidades, se modula la expresión de un polinucleótido que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que codifica una asparagina sintetasa y que tiene al menos 72 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:7. En ciertas modalidades, se modula la expresión de un polinucleótido que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que codifica una asparagina sintetasa y que tiene al menos 72 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:5 y/o SEQ ID NO:7. En ciertas modalidades, se modula la expresión de un polinucleótido que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que codifica una asparagina sintetasa y que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:1 y al menos 72 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:5 y/o SEQ ID NO:7. En ciertas modalidades, se modula la expresión de un polinucleótido que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que codifica una asparagina sintetasa y que tiene al menos 72 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:1 y/o SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:7. En ciertas modalidades, se modula la expresión de un polinucleótido que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que codifica una asparagina sintetasa y que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:1 y/o al menos 72 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:7.
- 25 En ciertas modalidades, se modula la expresión de un polinucleótido que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que codifica la asparagina sintetasa y que tiene al menos 72 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:19 y SEQ ID NO:21 y SEQ ID NO:23 con la condición de que dichos polinucleótidos comprendan la mutación que codifica el codón de parada en una posición equivalente a la posición establecida en la SEQ ID NO:19 o SEQ ID NO:21 o SEQ ID NO:23.
- 30 En ciertas modalidades, se modula la expresión de un polinucleótido que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que codifica la asparagina sintetasa y que tiene al menos 72 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:19 o SEQ ID NO:21 o SEQ ID NO:23 con la condición de que dichos polinucleótidos comprendan la mutación que codifica el codón de parada en una posición equivalente a la posición establecida en la SEQ ID NO:19 o SEQ ID NO:21 o SEQ ID NO:23.
- 35 En ciertas modalidades, se modula la expresión de un polinucleótido que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que codifica la asparagina sintetasa y que tiene al menos 72 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:19 y SEQ ID NO:21 con la condición de que dichos polinucleótidos comprendan la mutación que codifica el codón de parada en una posición equivalente a la posición establecida en la SEQ ID NO:19 y SEQ ID NO:21.
- 40 En ciertas modalidades, se modula la expresión de un polinucleótido que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que codifica la asparagina sintetasa y que tiene al menos 72 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:21 y SEQ ID NO:23 con la condición de que dichos polinucleótidos comprendan la mutación que codifica el codón de parada en una posición equivalente a la posición establecida en la SEQ ID NO:21 y SEQ ID NO:23.
- 45 En ciertas modalidades, se modula la expresión de un polinucleótido que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que codifica la asparagina sintetasa y que tiene al menos 72 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:19 y SEQ ID NO:21 y/o SEQ ID NO:23 con la condición de que dichos polinucleótidos comprendan la mutación que codifica el codón de parada en una posición equivalente a la posición establecida en la SEQ ID NO:21 y SEQ ID NO:23.
- 50 En ciertas modalidades, se modula la expresión de un polinucleótido que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que codifica la asparagina sintetasa y que tiene al menos 72 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:19 y SEQ ID NO:21 y/o SEQ ID NO:23 con la condición de que dichos polinucleótidos comprendan la mutación que codifica el codón de parada en una posición equivalente a la posición establecida en la SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:21 y SEQ ID NO:23.
- 55 En ciertas modalidades, se modula la expresión de un polinucleótido que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que codifica la asparagina sintetasa y que tiene al menos 72 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:19 y/o SEQ ID NO:21 y SEQ ID NO:23 con la condición de que dichos polinucleótidos comprendan la mutación que codifica el codón de parada en una posición equivalente a la posición establecida en la SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO:21 y SEQ ID NO:23.
- 60 Un polinucleótido como se describe en la presente descripción puede incluir un polímero de nucleótidos, que puede ser ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN) modificados o no modificados. En consecuencia, un polinucleótido puede ser, sin limitación, un ADN genómico, ADN complementario (ADNc), ARNm, o ARN antisentido o un fragmento(s) de estos. Además, un polinucleótido puede ser ADN de una sola cadena o de doble cadena, ADN que es una mezcla de regiones de una sola cadena y de doble cadena, una molécula híbrida que comprende ADN y ARN, o una molécula híbrida con una mezcla de regiones de una sola cadena y de doble cadena o un fragmento(s)
- 65

- de estas. Adicionalmente, el polinucleótido puede componerse de regiones de triple cadena que comprenden ADN, ARN, o ambos o un(os) fragmento(s) de estos. Un polinucleótido puede contener una o más bases modificadas, tales como fosfatoato, y puede ser un ácido nucleico peptídico. Generalmente, los polinucleótidos pueden ensamblarse a partir de fragmentos aislados o clonados de ADNc, ADN genómico, oligonucleótidos, o nucleótidos individuales, o una combinación de los anteriores. Aunque las secuencias 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, complementarias completamente), lo que incluye los complementos inversos de estas.
- 5
- 10 Un polinucleótido como se describe en la presente descripción contendrá generalmente enlaces fosfodiéster, aunque en algunos casos, se incluyen análogos de polinucleótidos que pueden tener cadenas principales alternativas, que comprenden, por ejemplo, enlaces fosforamidato, fosforotioato, fosforoditioato, u O-metilfosforoamidita; y cadenas principales y enlaces de polinucleótidos peptídicos. Otros análogos de polinucleótidos incluyen los que tienen cadenas principales positivas; cadenas principales no iónicas, y cadenas principales sin ribosa. Las modificaciones de la cadena principal de ribosa-fosfato pueden realizarse por una variedad de razones, por ejemplo, para aumentar la estabilidad y el tiempo de vida media de tales moléculas en ambientes fisiológicos o como sondas en un biochip. Pueden obtenerse mezclas de polinucleótidos y análogos de origen natural; alternativamente, mezclas de diferentes análogos de polinucleótidos, y pueden obtenerse mezclas de polinucleótidos y análogos de origen natural.
- 15
- 20 Se conoce una variedad de análogos de polinucleótidos, que incluye, por ejemplo, enlaces fosforamidato, fosforotioato, fosforoditioato, O-metilfosforoamidita y cadenas principales y enlaces de polinucleótidos peptídicos. Otros análogos de polinucleótidos incluyen los que tienen cadenas principales positivas, cadenas principales no iónicas y cadenas principales sin ribosa. Se incluyen además polinucleótidos que contienen uno o más azúcares carbocílicos.
- 25
- 30 Otros análogos incluyen polinucleótidos peptídicos que son análogos de polinucleótidos peptídicos. Estas cadenas principales son esencialmente no iónicas en condiciones neutras, a diferencia de la cadena principal de fosfodiéster altamente cargada de los polinucleótidos de origen natural. Esto puede resultar en ventajas. En primer lugar, la cadena principal de polinucleótidos peptídicos puede mostrar una mejor cinética de hibridación. Los polinucleótidos peptídicos tienen cambios más grandes en la temperatura de fusión por los pares de bases no apareados vs. los perfectamente apareados. El ADN y el ARN muestran típicamente una caída de 2-4 °C en la temperatura de fusión para un error de apareamiento interno. Con la cadena principal de polinucleótido peptídico no iónica, la caída es cercana a 7-9 °C. De manera similar, debido a su naturaleza no iónica, la hibridación de las bases unidas a estas cadenas principales es relativamente insensible a la concentración de sales. Adicionalmente, los polinucleótidos peptídicos no deben degradarse o se degradan en una menor extensión por las enzimas celulares, y así pueden ser más estables.
- 35
- 40 Entre los usos de los polinucleótidos descritos, y fragmentos de estos, está el uso de fragmentos como sondas en ensayos de hibridación de ácidos nucleicos o cebadores para su uso en ensayos de amplificación de ácidos nucleicos. Dichos fragmentos comprenden generalmente al menos aproximadamente 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 o más nucleótidos contiguos de una secuencia de ADN. En otras modalidades, un fragmento de ADN comprende al menos aproximadamente 10, 15, 20, 30, 40, 50 o 60 o más nucleótidos contiguos de una secuencia de ADN. Así, en un aspecto, se proporciona además un método para detectar un polinucleótido que codifica una proteína con actividad de asparagina sintetasa o que codifica una enzima asparagina sintetasa que comprende el uso de las sondas o cebadores o ambos. Los ejemplos de cebadores se exponen en las SEQ ID NO: 13 a 16. Por consiguiente, un aspecto adicional, se refiere a un cebador oligonucleotídico que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia de nucleótidos con al menos 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 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % o 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 16. También se describen métodos para usar estos cebadores para detectar un polinucleótido que codifica una proteína con actividad de asparagina sintetasa y usos de estos.
- 45
- 50 Los parámetros básicos que afectan la elección de las condiciones de hibridación para polinucleótidos y la guía para proyectar las condiciones adecuadas se describen en Sambrook, J., E. F. Fritsch, y T. Maniatis (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.). Mediante el uso del conocimiento del código genético en combinación con las secuencias de aminoácidos que se describen en la presente descripción, pueden prepararse conjuntos de oligonucleótidos degenerados. Tales oligonucleótidos son útiles como cebadores, por ejemplo, en las reacciones en cadena de la polimerasas (PCR), en donde los fragmentos de ADN se aíslan y se amplifican. En ciertas modalidades, pueden usarse cebadores degenerados como sondas para las genotecas. Dichas genotecas incluirían, pero no se limitan a, librerías de ADNc, librerías genómicas, e incluso librerías de ADN o etiquetas de secuencias de expresión electrónicas. Las secuencias homólogas identificadas mediante este método podrían usarse después como sondas para identificar homólogos de las secuencias identificadas en la presente descripción.
- 55
- 60 Además, son de uso potencial los polinucleótidos y oligonucleótidos (por ejemplo, cebadores o sondas) que hibridan en condiciones de rigurosidad reducidas, típicamente condiciones moderadamente rigurosas, y comúnmente condiciones altamente rigurosas para el(es) polinucleótido(s) como se describe en la presente descripción. Los parámetros básicos que afectan la elección de las condiciones de hibridación y la guía para idear las condiciones
- 65

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

Como se entenderá por el experto en la técnica, un ADN lineal tiene dos orientaciones posibles: la dirección 5' a 3' y la dirección 3' a 5'. Por ejemplo, si una secuencia de referencia se ubica en la dirección 5' a 3', y si una segunda secuencia se ubica en la dirección 5' a 3' dentro de la misma molécula/cadena de polinucleótido, entonces la secuencia de referencia y la segunda secuencia se orientan en la misma dirección, o tienen la misma orientación. Típicamente, una secuencia promotora y un gen de interés bajo la regulación del promotor dado se ubican en la misma orientación. Sin embargo, con respecto a la secuencia de referencia ubicada en la dirección 5' a 3', si una segunda secuencia se ubica en la dirección 3' a 5' dentro de la misma molécula/cadena de polinucleótido, entonces la secuencia de referencia y la segunda secuencia se orientan en la dirección antisentido, o tienen orientación antisentido. Dos secuencias que tienen orientaciones antisentido entre sí pueden describirse alternativamente como que tienen la misma orientación, si la secuencia de referencia (dirección 5' a 3') y la secuencia complementaria inversa de la secuencia de referencia (secuencia de referencia ubicada en 5' a 3') se ubican dentro de la misma molécula/cadena de polinucleótido. Las secuencias que se exponen en la presente descripción se muestran en la dirección 5' a 3'.

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

El polipéptido codificado por un polinucleótido recombinante puede ser un polipéptido natural, o puede ser heterólogo a la célula. En algunos casos, el constructo recombinante contiene un polinucleótido que modula la expresión, unido operativamente a una región reguladora. En la presente descripción se describen ejemplos de regiones regulatorias adecuadas.

Se proporcionan además, vectores que contienen constructos de polinucleótidos recombinantes tales como los que se describen en la presente descripción. Las cadenas principales de vectores adecuadas incluyen, por ejemplo, las que se usan rutinariamente en la técnica tales como plásmidos, virus, cromosomas artificiales, cromosomas artificiales bacterianos, cromosomas artificiales de levadura o cromosomas artificiales de bacteriófago. Los vectores de expresión

5 adecuados incluyen, sin limitarse a, plásmidos y vectores virales derivados de, por ejemplo, bacteriófago, baculovirus, y retrovirus. Numerosos vectores y sistemas de expresión están disponibles comercialmente. Los vectores pueden incluir, por ejemplo, orígenes de replicación, regiones de unión al armazón o marcadores. Un gen marcador puede conferir un fenotipo seleccionable en una célula vegetal. Por ejemplo, un marcador puede conferir resistencia a biocidas, tal como resistencia a un antibiótico (por ejemplo, kanamicina, G418, bleomicina, o higromicina), o a un herbicida (por ejemplo, glifosato, clorosulfuron o fosfinotricina). Adicionalmente, un vector de expresión puede incluir 10 una secuencia etiqueta diseñada para facilitar la manipulación o detección (por ejemplo, purificación o localización) del polipéptido expresado. Las secuencias etiquetas, tales como luciferasa, beta-glucuronidasa, proteína fluorescente verde, glutatión S-transferasa, polihistidina, secuencias de c-myc o hemaglutinina típicamente se expresan como una fusión con el polipéptido codificado. Dichas etiquetas pueden insertarse en cualquier lugar dentro del polipéptido, lo 15 que incluye lo mismo en el carboxilo terminal que en el amino terminal.

Una planta o célula vegetal puede transformarse al tener el polinucleótido recombinante integrado en su genoma para convertirse en transformada de manera estable. La planta o célula vegetal que se describe en la presente descripción puede transformarse de manera estable. Las células transformadas de manera estable típicamente retienen el 20 polinucleótido introducido con cada división celular. Una planta o célula vegetal puede transformarse transitoriamente de manera que el polinucleótido recombinante no se integra en su genoma. Las células transformadas transitoriamente pierden típicamente todo o alguna porción del polinucleótido recombinante introducido con cada división celular, de manera que el polinucleótido recombinante introducido no puede detectarse en las células hijas después de un número suficiente de divisiones celulares. También se contempla el uso de la edición del genoma.

25 Un número de métodos están disponibles en la técnica para transformar una célula vegetal, todos los cuales se abarcan en la presente descripción, que incluyen biolística, técnicas con cañón de genes, transformación mediada por Agrobacterium, transformación mediada por vectores virales y electroporación. El sistema de Agrobacterium para la integración de ADN foráneo en cromosomas de plantas se ha estudiado, modificado, y explotado extensamente para 30 la ingeniería genética de plantas. Las moléculas de ADN recombinante desnudo que comprenden secuencias de ADN que corresponden a la proteína objetivo purificada unida operativamente, en la orientación sentido o antisentido, a secuencias regulatorias, están unidas a secuencias de T-ADN apropiadas mediante métodos convencionales. Estas se introducen en protoplastos mediante técnicas con polietilenglicol o mediante técnicas de electroporación, las cuales son estándar. Alternativamente, tales vectores que comprenden moléculas de ADN recombinante que codifican la 35 proteína objetivo purificada se introducen en células de Agrobacterium vivas, las que después transfieren el ADN dentro de las células vegetales. La transformación mediante ADN desnudo sin secuencias acompañantes del vector de T-ADN puede llevarse a cabo mediante la fusión de protoplastos con liposomas que contienen ADN o mediante electroporación. Puede usarse además, el ADN desnudo no acompañado por secuencias del vector de T-ADN, para transformar células mediante microproyectiles inertes, de alta velocidad.

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

45 La elección de incluir regiones regulatorias en un constructo recombinante depende de varios factores, que incluyen, pero no se limitan a, eficiencia, selectividad, inducibilidad, nivel de expresión deseado, y expresión preferencial en células o tejidos. Para un experto en la técnica es un asunto de rutina modular la expresión de una secuencia codificante mediante la selección y ubicación apropiada de las regiones regulatorias con relación a la secuencia codificante. La transcripción de un polinucleótido puede modularse de manera similar. Algunas regiones regulatorias adecuadas inician la transcripción solo, o predominantemente, en ciertos tipos celulares. Los métodos para identificar 50 y caracterizar regiones regulatorias en ADN genómico de plantas se conocen en la técnica.

55 Ejemplos de promotores incluyen promotores específicos de tejidos que se reconocen por factores específicos de tejidos presentes en diferentes tejidos o tipos celulares (por ejemplo, promotores específicos de la raíz, promotores específicos de brotes, promotores específicos de xilema), o presentes durante diferentes etapas del desarrollo, o presentes en respuesta a diferentes condiciones ambientales. Ejemplos de promotores incluyen promotores constitutivos que pueden activarse en la mayoría de los tipos celulares sin requerir inductores específicos. Ejemplos de promotores para controlar la producción de polipéptidos de ARNi incluyen los promotores del virus del mosaico de la coliflor 35S (CaMV/35S), SSU, OCS, lib4, usp, STLS1, B33, nos o los promotores de ubiquitina o faseolina. Los expertos en la técnica son capaces de generar variaciones múltiples de promotores recombinantes.

60 Los promotores específicos de tejidos son elementos de control transcripcional que solo son activos en células o tejidos particulares en momentos específicos durante el desarrollo de la planta, tal como en tejidos vegetativos o tejidos reproductivos. La expresión específica de tejidos puede ser ventajosa, por ejemplo, cuando se prefiere la expresión de polinucleótidos en ciertos tejidos. Los ejemplos de promotores específicos de tejidos bajo control del desarrollo 65 incluyen promotores que pueden iniciar la transcripción solo (o solo fundamentalmente) en ciertos tejidos, tales como tejidos vegetativos, por ejemplo, raíces u hojas, o tejidos reproductivos, tales como frutos, óvulos, semillas, polen,

pistilos, flores, o cualquier tejido embrionario. Los promotores específicos de tejidos reproductivos pueden ser, por ejemplo, específicos de anteras, específicos de óvulos, específicos de embriones, específicos del endospermo, específicos del tegumento, específicos de la cubierta de semillas y de semillas, específicos del polen, específicos de pétalos, específicos de sépalos, o sus combinaciones.

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

10 15 Los ejemplos de promotores específicos de la senescencia incluyen un promotor de tomate activo durante la maduración de los frutos, la senescencia y la abscisión de las hojas, un promotor de maíz de un gen que codifica una cisteína proteasa, el promotor de 82E4 y el promotor de genes SAG.

20 En ciertas modalidades, se prefiere un promotor específico de la senescencia. Adecuadamente, el promotor puede ser un promotor de E4. Se ha informado que el promotor de E4 es un promotor adecuado de la senescencia del tabaco mediante el uso de GUS como gen indicador en *Plant Mol Biol.* (2008) Mar;66(4):415-27. Otro ejemplo de promotor es el promotor de SAG12 como se describe en *Plant Cell.* (1999) junio;11(6):1073-80.

25 30 35 Otros ejemplos son los promotores específicos de anteras. Pueden seleccionarse promotores con preferencia por la raíz conocidos por los expertos en la técnica. Los promotores con preferencia por las semillas incluyen tanto los promotores específicos de semillas (los promotores activos durante el desarrollo de la semilla tales como los promotores de proteínas de almacenamiento en las semillas) y promotores de la germinación de semillas (los promotores activos durante la germinación de las semillas). Dichos promotores con preferencia por las semillas incluyen, pero no se limitan a, Cim1 (mensaje inducido por citoquinina); cZ19B1 (zeína de 19 kDa de maíz); milps (mio-inositol-1-fosfato sintasa); mZE40-2, conocido además como Zm-40; nuc1c; y celA (celulosa sintasa). Gama-zeína es un promotor específico del endospermo. Glob-1 es un promotor específico del embrión. Para las dicotiledóneas, los promotores específicos de semillas incluyen, pero no se limitan a, beta-faseolina de frijol, napin, β-conglicinina, lectina de frijol de soja, cruciferina, y similares. Para las monocotiledóneas, los promotores específicos de semillas incluyen, pero no se limitan a, un promotor de zeína de 15 kDa de maíz, un promotor de zeína de 22 kDa, un promotor de zeína de 27 kDa, un promotor de g-zeína, un promotor de gamma-zeína de 27 kDa (tal como el promotor gzw64A, ver el número de acceso al Genbank S78780), un promotor cero, un promotor de shrunken 1, un promotor de shrunken 2, un promotor de globulina 1 (ver el número de acceso al Genbank L22344), un promotor de ltp2, promotor de cim1, promotores end1 y end2 de maíz, promotor de nuc1, promotor de Zm40, eep1 y eep2; promotor de tioredoxina H, lec1; promotor de mlip15, promotor de PCNA2; y el promotor de shrunken 2.

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

45 50 Adicionalmente a los promotores de plantas, otros promotores adecuados pueden derivarse de un origen bacteriano (por ejemplo, el promotor de octopina sintasa, el promotor de nopalina sintasa y otros promotores derivados de plásmidos Ti), o pueden derivarse de promotores virales (por ejemplo, promotores de ARN 35S y 19S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), promotores constitutivos del virus del mosaico del tabaco, promotores 19S y 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), o el promotor 35S del virus del mosaico de la escrofularia). En ciertas modalidades, se prefiere un promotor del virus del mosaico Mirabilis (MMV). En ciertas modalidades, se prefiere un promotor de 35S.

55 60 En otro aspecto, se proporciona un polipéptido aislado que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia polipeptídica que tiene al menos 60 % de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias polipeptídicas descritas en la presente descripción, que incluyen cualquiera de los polipéptidos mostrados en el listado de secuencias. Adecuadamente, el polipéptido aislado comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que tiene al menos 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % o 100 % de identidad de secuencia con estas.

65 En una modalidad, el polipéptido aislado comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que tiene al menos 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % o 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:6 o SEQ ID NO:8 o SEQ ID NO:10 o SEQ ID NO:12. En otra modalidad, el polipéptido aislado comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que tiene al menos aproximadamente 78 %, 79 %, 80 %, 85 %,

87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 % 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % o 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:6 o SEQ ID NO:8 o SEQ ID NO:10 o SEQ ID NO:12.

5 En una modalidad, el polipéptido aislado comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que tiene al menos 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 85 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 % 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % o 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:20 o SEQ ID NO:22 o SEQ ID NO:24 con la condición de que dicho polipéptido comprende la mutación del codón de parada en una posición equivalente a la posición establecida en SEQ ID NO:20 o SEQ ID NO:22 o SEQ ID NO:24.

10 En otra modalidad, el polipéptido aislado comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que tiene al menos 78 %, 79 %, 80 %, 85 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 % 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % o 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:20 o SEQ ID NO:22 o SEQ ID NO:24 con la condición de que dicho polipéptido comprenda la mutación del codón de parada en una posición equivalente a la posición establecida en la SEQ ID NO:20 o SEQ ID NO:22 o SEQ ID NO:24. En otra modalidad, se proporciona una variante de polipéptido que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos codificada por una variante de polinucleótido con al menos aproximadamente 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 85 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 % 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:6 o SEQ ID NO:8 o SEQ ID NO:10 o SEQ ID NO:12.

15 En otra modalidad, se proporciona una variante de polipéptido que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos codificada por una variante de polinucleótido con al menos aproximadamente 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 85 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 % 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:20 o SEQ ID NO:22 o SEQ ID NO:24 con la condición de que dicho polipéptido comprenda la mutación de codón de parada en una posición equivalente a la posición establecida en la SEQ ID NO:20 o SEQ ID NO:22 o SEQ ID NO:24. En otra modalidad, se proporcionan fragmentos del polipéptido de la SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:6 o SEQ ID NO:8 o SEQ ID NO:10 o SEQ ID NO:12 o fragmentos de la SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:6 o SEQ ID NO:8 o SEQ ID NO:10 o SEQ ID NO:12 que tienen al menos aproximadamente 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 85 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 % 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % de identidad de secuencia con los fragmentos correspondientes de la SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:6 o SEQ ID NO:8 o SEQ ID NO:10 o SEQ ID NO:12.

20 En otra modalidad, se proporcionan fragmentos del polipéptido de la SEQ ID NO:20 o SEQ ID NO:22 o SEQ ID NO:24 o fragmentos de la SEQ ID NO:20 o SEQ ID NO:22 o SEQ ID NO:24 que tienen al menos aproximadamente 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 85 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % o 100 % de identidad de secuencia con los fragmentos correspondientes de la SEQ ID NO:20 o SEQ ID NO:22 o SEQ ID NO:24 con la condición de que dicho polipéptido comprenda la mutación de codón de parada en una posición equivalente a la posición establecida en la SEQ ID NO:20 o SEQ ID NO:22 o SEQ ID NO:24. En ciertas modalidades, se modula la actividad de un polipéptido que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que codifica una asparagina sintetasa y que tiene al menos 78 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:6 o SEQ ID NO:8. En ciertas modalidades, se modula la actividad de un polipéptido que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que codifica una asparagina sintetasa y que tiene al menos 78 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:6 y SEQ ID NO:8. En ciertas modalidades, se modula la actividad de un polipéptido que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que codifica una asparagina sintetasa y que tiene al menos 78 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:4. En ciertas modalidades, se modula la actividad de un polipéptido que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que codifica una asparagina sintetasa y que tiene al menos 78 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:6 y SEQ ID NO:8. En ciertas modalidades, se modula la actividad de un polipéptido que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que codifica una asparagina sintetasa y que tiene al menos 78 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:6 y/o SEQ ID NO:8. En ciertas modalidades, se modula la actividad de un polipéptido que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que codifica una asparagina sintetasa y que tiene al menos 78 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:2 y/o SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:6 y SEQ ID NO:8.

25 En ciertas modalidades, se modula la actividad de un polipéptido que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que codifica la asparagina sintetasa y que tiene al menos 78 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:20 o SEQ ID NO:22 o SEQ ID NO:24 con la condición de que dicho polipéptido comprenda la mutación

de codón de parada en una posición equivalente a la posición establecida en la SEQ ID NO:20 o SEQ ID NO:22 o SEQ ID NO:24.

- 5 En ciertas modalidades, se modula la actividad de un polipéptido que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que codifica la asparagina sintetasa y que tiene al menos 78 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:20 y SEQ ID NO:22 y SEQ ID NO:24 con la condición de que dicho polipéptido comprenda la mutación de codón de parada en una posición equivalente a la posición establecida en la SEQ ID NO:20 y SEQ ID NO:22 y SEQ ID NO:24.
- 10 En ciertas modalidades, se modula la actividad de un polipéptido que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que codifica la asparagina sintetasa y que tiene al menos 78 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:20 y SEQ ID NO:22 con la condición de que dicho polipéptido comprenda la mutación de codón de parada en una posición equivalente a la posición establecida en la SEQ ID NO:20 y SEQ ID NO:22.
- 15 En ciertas modalidades, se modula la actividad de un polipéptido que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que codifica la asparagina sintetasa y que tiene al menos 78 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:22 y SEQ ID NO:24 con la condición de que dicho polipéptido comprenda la mutación de codón de parada en una posición equivalente a la posición establecida en la SEQ ID NO:22 y SEQ ID NO:24.
- 20 En ciertas modalidades, se modula la actividad de un polipéptido que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que codifica la asparagina sintetasa y que tiene al menos 78 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:20 y SEQ ID NO:24 con la condición de que dicho polipéptido comprenda la mutación de codón de parada en una posición equivalente a la posición establecida en la SEQ ID NO:20 y SEQ ID NO:24.
- 25 En ciertas modalidades, se modula la actividad de un polipéptido que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que codifica la asparagina sintetasa y que tiene al menos 78 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:20 y SEQ ID NO:22 y/o SEQ ID NO:24 con la condición de que dicho polipéptido comprenda la mutación de codón de parada en una posición equivalente a la posición establecida en la SEQ ID NO:20 y SEQ ID NO:22 y/o SEQ ID NO:24.
- 30 En ciertas modalidades, se modula la actividad de un polipéptido que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que codifica la asparagina sintetasa y que tiene al menos 78 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:20 y/o SEQ ID NO:22 y SEQ ID NO:24 con la condición de que dicho polipéptido comprenda la mutación de codón de parada en una posición equivalente a la posición establecida en la SEQ ID NO:20 y/o SEQ ID NO:22 y/o SEQ ID NO:24.
- 35 En ciertas modalidades, se modula la actividad de un polipéptido que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que codifica la asparagina sintetasa y que tiene al menos 78 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:20 y/o SEQ ID NO:22 y/o SEQ ID NO:24 con la condición de que dicho polipéptido comprenda la mutación de codón de parada en una posición equivalente a la posición establecida en la SEQ ID NO:20 y/o SEQ ID NO:22 y/o SEQ ID NO:24. El polipéptido puede incluir fragmentos de secuencias que comprenden un grado suficiente o sustancial de identidad o similitud para funcionar como una asparagina sintetasa. Los fragmentos del(de los) polipéptido(s) típicamente retienen parte o toda la actividad de la secuencia de longitud completa, tal como al menos aproximadamente 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % o 100 % de la actividad.
- 40 Como se analiza en la presente descripción, los polipéptidos incluyen, además, mutantes producidos mediante la introducción de cualquier tipo de alteraciones (por ejemplo, inserciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos; cambios en los estados de glicosilación; cambios que afectan el replegamiento o isomerizaciones, estructuras tridimensionales, o estados de autoasociación) siempre y cuando tengan aún alguna o toda su función o actividad como una asparagina sintetasa. Adecuadamente, la función o actividad como una asparagina sintetasa se modula, reduce o inhibe. Adecuadamente, la función o actividad como una asparagina sintetasa se inhibe de manera que la actividad de asparagina sintetasa no es detectable.
- 45 Los polipéptidos incluyen variantes producidas al introducir cualquier tipo de alteraciones (por ejemplo, inserciones, delecciones, o sustituciones de aminoácidos; cambios en estados de glicosilación; cambios que afectan el replegamiento o isomerizaciones, estructuras tridimensionales, o estados de autoasociación), las que pueden modificarse genéticamente deliberadamente o aislarse de manera natural. La variante puede tener alteraciones que producen un cambio silente y resultan en una proteína funcionalmente equivalente. Las sustituciones de aminoácidos deliberadas pueden realizarse sobre la base de la similitud en polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofilicidad y la naturaleza anfipática de los residuos siempre y cuando se retenga la actividad de unión secundaria de la sustancia. Por ejemplo, los aminoácidos cargados negativamente incluyen ácido aspártico y ácido glutámico; los aminoácidos cargados positivamente incluyen lisina y arginina; y los aminoácidos con grupos principales polares no cargados que tienen valores de hidrofilicidad similar incluyen leucina, isoleucina, valina, glicina, alanina, asparagina, glutamina, serina, treonina, fenilalanina, y tirosina. Las sustituciones conservadoras pueden realizarse, por ejemplo de conformidad con la Tabla más abajo. Los aminoácidos en el mismo bloque en la segunda columna y preferentemente en la misma línea en la tercera columna pueden sustituirse entre sí:
- 50
- 55
- 60

65	ALIFÁTICO	No polar	Gly Ala Pro Ile Leu Val
		Polar - sin carga	Cys Ser Thr Met Asn Gly

	Polar - cargado	Asp Glu
		Lys Arg
AROMÁTICO		His Phe Trp Tyr

- 5 El polipéptido puede ser una proteína madura o una proteína inmadura o una proteína derivada a partir de una proteína inmadura. Los polipéptidos pueden estar en forma lineal o cíclica mediante el uso de métodos conocidos. Los polipéptidos típicamente comprenden al menos 10, al menos 20, al menos 30, o al menos 40, o al menos 50, o al menos 100, o al menos 200, o al menos 300, o al menos 400, o al menos 500 o al menos 600 aminoácidos contiguos.
- 10 También se describe un polipéptido codificado por la SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:6 o SEQ ID NO:8 o SEQ ID NO:10 o SEQ ID NO:12 o SEQ ID NO: 20 o SEQ ID NO:22 o SEQ ID NO:24 que tiene 100 % de identidad de secuencia con estas o un polipéptido que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia establecida en la SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:6 o SEQ ID NO:8 o SEQ ID NO:10 o SEQ ID NO:12 o SEQ ID NO: 20 o SEQ ID NO:22 o SEQ ID NO:24.
- 15 Un polipéptido puede prepararse mediante el cultivo de células huéspedes transformadas o recombinantes en condiciones de cultivo adecuadas para expresar un polipéptido. El polipéptido expresado resultante puede purificarse después a partir de dicho cultivo mediante el uso de procesos de purificación conocidos. La purificación del polipéptido puede incluir una columna de afinidad que contiene agentes que unirán al polipéptido; una o más etapas de columna sobre tales resinas de afinidad; una o más etapas que implican cromatografía con interacciones hidrofóbicas; o cromatografía de inmunofijación. Alternativamente, el polipéptido puede expresarse, además, en una forma que facilitará la purificación. Por ejemplo, puede expresarse como un polipéptido de fusión, tal como los del polipéptido de unión a maltosa, glutatión-5-transferasa, etiqueta de histidina o tioredoxina. Los kits para la expresión y purificación de polipéptidos de fusión están disponibles comercialmente. El polipéptido puede etiquetarse con un epítopo y posteriormente purificarse mediante el uso de un anticuerpo específico dirigido a tal epítopo. Puede emplearse una o más etapas de cromatografía líquida, tal como cromatografía líquida de alto rendimiento en fase reversa, para purificar más aún el polipéptido. Algunas o todas las etapas de purificación anteriores, en varias combinaciones, pueden emplearse para proporcionar un polipéptido recombinante esencialmente homogéneo. El polipéptido purificado de esta manera puede estar esencialmente libre de otros polipéptidos y en la presente descripción se define como un "polipéptido esencialmente purificado"; tales polipéptidos purificados incluyen polipéptidos, fragmentos, variantes, y similares. La expresión, aislamiento, y purificación de los polipéptidos y fragmentos pueden llevarse a cabo mediante cualquier técnica adecuada, lo que incluye, pero no se limita a, los métodos descritos en la presente descripción.
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
- Es posible usar, además, una columna de afinidad tal como un anticuerpo monoclonal generado contra los polipéptidos, para purificar por afinidad los polipéptidos expresados. Estos polipéptidos pueden eliminarse de una columna de afinidad mediante el uso de técnicas convencionales, por ejemplo, en un tampón de elución con alto contenido de sales y después separarse mediante diáfragma en un tampón con bajo contenido de sales para su uso o al cambiar el pH u otros componentes en dependencia de la matriz de afinidad usada, o eliminarse de manera competitiva mediante el uso del sustrato de origen natural del resto de afinidad.
- Se describen polinucleótidos o composiciones proteicas aislados o esencialmente purificados. Un polinucleótido o proteína, o porción biológicamente activa de estos, "aislado" o "purificado" está esencialmente o sustancialmente libre de componentes que normalmente acompañan o interactúan con el polinucleótido o proteína como se encuentra en su ambiente natural. Por tanto, un polinucleótido o proteína aislado o purificado está esencialmente libre de otro material celular o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas recombinantes, o esencialmente libre de precursores químicos u otras sustancias químicas cuando se sintetiza químicamente. De manera óptima, un polinucleótido "aislado" está libre de secuencias (de manera óptima, secuencias codificantes de proteínas) que flanquean naturalmente al polinucleótido (por ejemplo, secuencias localizadas en los extremos 5' y 3' del polinucleótido) en el ADN genómico del organismo del cual se deriva el polinucleótido. Por ejemplo, en diversas modalidades, el polinucleótido aislado puede contener menos de aproximadamente 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb o 0,1 kb de secuencia de nucleótidos que flanquean naturalmente el polinucleótido en el ADN genómico de la célula de la que se deriva el polinucleótido. Una proteína que está esencialmente libre de material celular incluye preparaciones proteicas que tienen menos de aproximadamente 30 %, 20 %, 10 %, 5 %, o 1 % (en peso seco) de proteína contaminante.
- Un polipéptido puede producirse, además, mediante síntesis química convencional conocida. Los métodos para construir los polipéptidos o fragmentos de estos por medios sintéticos se conocen por los expertos en la técnica. Las secuencias polipeptídicas construidas sintéticamente, en virtud de compartir características conformacionales o estructurales primarias, secundarias o terciarias con los polipéptidos naturales pueden poseer propiedades biológicas en común con esos, que incluyen la actividad biológica.

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

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

- 5 10 Más específicamente, los polipéptidos, fragmentos, variantes, polipéptidos de fusión, y similares contienen determinantes antigenicos o epitopos que provocan la formación de anticuerpos. Estos determinantes antigenicos o epitopos pueden ser lineales o conformacionales (discontinuos). Los epitopos lineales se componen de una sola sección de aminoácidos del polipéptido, mientras que los epitopos conformacionales o discontinuos se componen de secciones de aminoácidos de diferentes regiones de la cadena del polipéptido que quedan en una proximidad cercana tras el plegamiento del polipéptido. Los epitopos pueden identificarse mediante cualquiera de los métodos conocidos en la técnica. Adicionalmente, los epitopos de los polipéptidos pueden usarse como reactivos de investigación, en ensayos, y para purificar anticuerpos de unión específica a partir de sustancias tales como sueros policlonales o sobrenadantes a partir de hibridomas cultivados. Dichos epitopos o variantes de estos pueden producirse mediante el uso de técnicas conocidas en la técnica tales como síntesis en fase sólida, escisión química o enzimática de un polipéptido, o con el uso de la tecnología de ADN recombinante.

15 20 Tanto los anticuerpos policlonales como monoclonales para los polipéptidos pueden prepararse mediante técnicas convencionales. Las líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos monoclonales específicos para los polipéptidos también se abarcan en la presente descripción. Dichos hibridomas pueden producirse e identificarse mediante técnicas convencionales. Para la producción de anticuerpos, pueden inmunizarse diversos animales huéspedes mediante inyección con un polipéptido, fragmento, variante, o mutantes de estos. Dichos animales huéspedes pueden incluir, pero no se limitan a, conejos, ratones, y ratas, por nombrar algunos. Pueden usarse varios adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica. En dependencia de la especie hospedera, tales adyuvantes incluyen, pero no se limitan a, adyuvante de Freund (completo e incompleto), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensoactivas tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones oleosas, hemocianina de lapa californiana, dinitrofenol, y adyuvantes potencialmente útiles en humanos tales como BCG (bacilo de Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*. Los anticuerpos monoclonales pueden recuperarse mediante técnicas convencionales. Dichos anticuerpos monoclonales pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina lo que incluye IgG, IgM, IgE, IgA, IgD, y cualquier subclase de estas.

- 25 30 35 Los anticuerpos pueden usarse, además, en ensayos para detectar la presencia de los polipéptidos o fragmentos, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Los anticuerpos pueden emplearse además en la purificación de polipéptidos o fragmentos mediante cromatografía de inmunoafinidad.
- 40 45 50 55 60 Se describen, además, fragmentos de polinucleótidos y polipéptidos codificados de esta manera. Los fragmentos de un polinucleótido pueden codificar fragmentos de proteína que retienen la actividad biológica de la proteína nativa. Alternativamente, los fragmentos de un polinucleótido que son útiles como sondas de hibridación o cebadores de PCR generalmente no codifican fragmentos proteicos que retienen la actividad biológica. Además, los fragmentos de la secuencia de nucleótidos descrita incluyen aquellos que pueden ensamblarse dentro de constructos recombinantes como se analiza en la presente descripción. Los fragmentos de una secuencia polinucleotídica puede variar de al menos aproximadamente 25 nucleótidos, aproximadamente 50 nucleótidos, aproximadamente 75 nucleótidos, aproximadamente 100 nucleótidos, aproximadamente 150 nucleótidos, aproximadamente 200 nucleótidos, aproximadamente 250 nucleótidos, aproximadamente 300 nucleótidos, aproximadamente 400 nucleótidos, aproximadamente 500 nucleótidos, aproximadamente 600 nucleótidos, aproximadamente 700 nucleótidos, aproximadamente 800 nucleótidos, aproximadamente 900 nucleótidos, aproximadamente 1000 nucleótidos, aproximadamente 1100 nucleótidos, aproximadamente 1200 nucleótidos, aproximadamente 1300 nucleótidos, aproximadamente 1500 nucleótidos, aproximadamente 2000 nucleótidos, aproximadamente 3000 nucleótidos, aproximadamente 4000 nucleótidos, aproximadamente 5000 nucleótidos, aproximadamente 6000 nucleótidos, aproximadamente 7000 nucleótidos, aproximadamente 8000 nucleótidos, aproximadamente 9000 nucleótidos, aproximadamente 10 000 nucleótidos, aproximadamente 15 000 nucleótidos, aproximadamente 20 000 nucleótidos y hasta el polinucleótido de longitud completa que codifica los polipéptidos descritos en la presente descripción. Los fragmentos de una secuencia polipeptídica pueden variar de al menos aproximadamente 25 aminoácidos, aproximadamente 50 aminoácidos, aproximadamente 75 aminoácidos, aproximadamente 100 aminoácidos, aproximadamente 150 aminoácidos, aproximadamente 200 aminoácidos, aproximadamente 250 aminoácidos, aproximadamente 300 aminoácidos, aproximadamente 400 aminoácidos, aproximadamente 500 aminoácidos, aproximadamente 600 aminoácidos y hasta el polipéptido de longitud completa descrito en la presente descripción.

65 70 Se debe entender que reducir la expresión o actividad de la(s) asparagina sintetasa(s) descritas en la presente descripción puede lograrse por varios medios. De conformidad con ciertas modalidades, reducir la expresión de la(s) asparagina sintetasa(s) puede llevarse a cabo a nivel genómico y/o transcripcional mediante el uso de una variedad de moléculas que interfieren con la transcripción y/o traducción que incluyen, pero no se limitan a, moléculas

antisentido, de ARNip, ribozima o ADNzima. También se puede usar la inserción de una o más mutaciones en al menos un gen, que incluyen eliminaciones, inserciones, mutaciones específicas del sitio, nucleasas de dedos de zinc y similares. De conformidad con otras modalidades, la expresión se puede inhibir a nivel de proteína mediante el uso de antagonistas o enzimas que escinden el polipéptido y similares.

- 5 En un aspecto, se describe una planta mutante o parte de esta que comprende al menos una mutación y (i) un polinucleótido que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que codifica la asparagina sintetasa y que tiene al menos 72 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:7; (ii) un polipéptido codificado por el polinucleótido establecido en (i); (iii) un polipéptido que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que codifica la asparagina sintetasa y que tiene al menos 78 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:6 o SEQ ID NO:8; o (iv) un constructo, vector o vector de expresión que comprende el polinucleótido aislado establecido en (i), en donde la al menos una mutación reduce la expresión o actividad de la asparagina sintetasa en comparación con una planta de control que no comprende la al menos una mutación. En otro aspecto, se describe una planta mutante o parte de esta que comprende al menos una mutación y (i) un polinucleótido que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que codifica la asparagina sintetasa y que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:1 o al menos 72 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:7; (ii) un polipéptido codificado por el polinucleótido establecido en (i); (iii) un polipéptido que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que codifica la asparagina sintetasa y que tiene al menos 78 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:6 o SEQ ID NO:8; o (iv) un constructo, vector o vector de expresión que comprende el polinucleótido aislado establecido en (i), en donde la al menos una mutación reduce la expresión o actividad de la asparagina sintetasa en comparación con una planta de control que no comprende la al menos una mutación.
- 10 20 25 30 35 40
- Por tanto, la planta o célula vegetal puede comprender una o más mutaciones en *NtASN1-S* (SEQ ID NO: 1) y/o *NtASN1-T* (SEQ ID NO: 3) y/o *NtASN3-S* (SEQ ID NO: 9) y/o *NtASN3-T* (SEQ ID NO: 11) y/o *NtASN5-S* (SEQ ID NO: 5) y/o *NtASN5-T* (SEQ ID NO: 7) en donde dicha mutación resulta en una expresión reducida o función reducida de dicho gen o proteína codificada por estos. Una planta o célula vegetal puede comprender una o más mutaciones en *NtASN1-S* (SEQ ID NO: 1) o *NtASN1-T* (SEQ ID NO: 3) o *NtASN5-S* (SEQ ID NO: 5) o *NtASN5-T* (SEQ ID NO: 7) como se describe, en donde dicha mutación resulta en una expresión reducida o función reducida de dicho gen o proteína codificada por estos. Una planta o célula vegetal puede comprender una o más mutaciones (por ejemplo, mutaciones sin sentido o similares como se describe en la presente descripción) en *NtASN1-S* (SEQ ID NO: 1) y *NtASN1-T* (SEQ ID NO: 3) o *NtASN5-S* (SEQ ID NO: 5) y *NtASN5-T* (SEQ ID NO: 7) como se describe, en donde dicha mutación resulta en una expresión reducida o función reducida de dicho gen o proteína codificada por estos. La expresión o función del(de los) mutante(s) puede modularse, inhibirse o reducirse. Además de las una o más mutaciones que se describen en la presente descripción, la planta mutante o célula vegetal puede tener una o más mutaciones adicionales en uno o más de otros genes o polipéptidos. En ciertas modalidades, los mutantes pueden tener una o más mutaciones adicionales en uno o más de otros genes o polipéptidos. Los mutantes de *NtASN1-S*, *NtASN1-T*, *NtASN5-S* y *ASN5-T* se describen en la presente descripción. En ciertas modalidades, la una o más mutaciones están en el dominio de glutaminasa.

Se identifican tres mutaciones de parada en las copias de *ASN1-S* (*ASN1-S_W156** - SEQ ID NO 19 y 20), *ASN1-T* (*ASN1-T_W156** - SEQ ID NO 21 y 22) y *ASN5-S* (*ASN5-S_Q66** - SEQ ID NO 23 y 24), pero no en la copia de *ASN5-T*. Como no se identificaron mutaciones de parada en *ASN5-T*, se identificó una mutación de no parada como un posible candidato. Hubo una clara tendencia a la reducción de la asparagina en *ASN1-S_W156**, *ASN1-T_W156** y *ASN5-S_Q66** en comparación con sus segregantes WT correspondientes pero no para *ASN5-T_G59D*. La reducción más fuerte se observó para *ASN1-T_W156** (83 %), después para *ASN5-S_Q66** (44 %) y finalmente para *ASN1-S_W156** (17 %). La línea *ASN5-T_G59D* mostró un leve aumento en la asparagina. Las mutaciones de parada en *ASN1-S* y *ASN5-S* no tuvieron impacto en la biomasa y el tamaño de la planta. De conformidad con Canales y otros, 2012, las mutaciones en todos los genes de *Nt-ASN* se ubican en el dominio de glutaminasa que libera amoníaco de la glutamina; el dominio de sintetasa se ubica en *Nt-ASN* desde el aminoácido R211 a la región de consenso D451.

Dicha planta o célula vegetal mutante puede ser heterocigota u homocigota para la(s) mutación(ones). Dicha planta o célula vegetal mutante pueden ser heterocigotas para al menos una mutación y homocigotas para al menos una mutación diferente. Adecuadamente, la planta o célula vegetal mutante es homocigota para la(s) mutación(ones).

El mutante puede tener una mutación (por ejemplo, una mutación sin sentido que da como resultado un codón de parada) en una posición equivalente a la posición de aminoácidos 156 de la SEQ ID NO: 2. Un ejemplo de dicho mutante es *ASN1-S_W156** como se describe en la presente descripción.

60 65 El mutante puede tener una mutación (por ejemplo, una mutación sin sentido que da como resultado un codón de parada) en una posición equivalente a la posición de aminoácidos 156 de la SEQ ID NO: 4. Un ejemplo de dicho mutante es *ASN1-T_W156** como se describe en la presente descripción.

El mutante puede tener una mutación (por ejemplo, una mutación sin sentido que da como resultado un codón de parada) en una posición equivalente a la posición de aminoácidos 66 de la SEQ ID NO: 6. Un ejemplo de dicho mutante es ASN1-S_Q66* como se describe en la presente descripción.

5 Se contemplan, además, combinaciones de estas mutaciones. Dichas combinaciones pueden incluir la combinación de ASN1-S_W156* y ASN1-T_W156*; o la combinación de ASN1-S_W156* y ASN5-S_Q66*; o la combinación de ASN1-T_W156* y ASN5-S_Q66*; o la combinación de ASN1-S_W156*, ASN1-T_W156* y ASN5-S_Q66*.

10 En otro aspecto, se proporciona un método para reducir el nivel de asparagina en una planta o en un material vegetal derivado de la planta, dicho método comprende introducir en el genoma de dicha planta una o más mutaciones que reducen la expresión de al menos un gen de asparagina sintetasa, en donde dicho al menos un gen de asparagina sintetasa codifica *NtASN1-S*, *NtASN1-T*, *NtASN5-S* o *Nt ASN5-T*. Adecuadamente, además de la(s) mutación(ones) en *NtASN1-S*, *NtASN1-T*, *NtASN5-S* o *NtASN5-T*, también pueden introducirse una o más mutaciones en al menos un alelo de al menos uno, dos o tres o más genes de asparagina sintetasa adicionales. También se contemplan mutaciones en *NtASN1-S* y *NtASN1-T* o *NtASN5-S* y *NtASN5-T*.

15 También se proporciona un método para identificar una planta con niveles reducidos de asparagina, dicho método comprende tamizar una muestra de ácido nucleico de una planta de interés para determinar la presencia de una o más mutaciones en *NtASN1-S*, *NtASN1-T*, *NtASN5-S* o *ASN5-T*. Adecuadamente, dicho método comprende además analizar dicha muestra de ácido nucleico, u otra muestra de ácido nucleico de dicha planta de interés, para determinar la presencia de una mutación en *NtASN1-S*, la presencia de una mutación en *NtASN1-T*, o la presencia de una mutación en *NtASN5-S*, o la presencia de una mutación en *NtASN5-T*.

20 25 También se describe una planta o célula vegetal que es heterocigota u homocigota para una o más mutaciones en un gen que codifica *NtASN1-S*, *NtASN1-T*, *NtASN5-S* o *NtASN5-T*, en donde dicha(s) mutación(ones) resulta(n) en una expresión reducida del gen o función reducida de la proteína codificada por este.

30 35 En algunas modalidades, la(s) mutación(ones) favorable(s) se introduce(n) en una planta o célula vegetal con el uso de un enfoque de mutagénesis, y la mutación introducida se identifica o se selecciona con el uso de métodos conocidos por los expertos en la técnica tales como análisis de transferencia Southern, secuenciación de ADN, análisis por PCR o análisis fenotípico. Las mutaciones que afectan la expresión génica o que interfieren con la función de la proteína codificada pueden determinarse con el uso de métodos que son muy conocidos en la técnica. Las mutaciones por inserción en los exones de genes resultan usualmente en mutantes nulos. Las mutaciones en residuos conservados pueden ser particularmente efectivas para inhibir o reducir la función metabólica de la proteína codificada.

40 45 50 También se describen métodos para obtener polinucleótidos y polipéptidos mutantes. Cualquier planta de interés, que incluye una célula vegetal o material vegetal puede modificarse genéticamente por varios métodos conocidos por inducir mutagénesis, que incluyen mutagénesis dirigida a un sitio, mutagénesis dirigida a oligonucleótido, mutagénesis dirigida químicamente, mutagénesis dirigida por radiación, mutagénesis que utiliza bases modificadas, mutagénesis que utiliza ADN híbrido con brechas, mutagénesis por ruptura de la doble cadena, mutagénesis que utiliza cepas huéspedes deficientes en la reparación, mutagénesis por síntesis génica total, barajado de ADN y otros métodos equivalentes.

55 60 65 Las variantes de polipéptidos mutantes pueden usarse para crear plantas mutantes, de origen no natural o transgénicas (por ejemplo, plantas mutantes, de origen no natural, transgénicas, creadas por el hombre o modificadas por ingeniería genética) o células vegetales que comprenden una o más variantes de polipéptidos mutantes. Adecuadamente, las variantes de polipéptidos mutantes retienen la actividad del polipéptido no mutado. La actividad de la variante de polipéptido mutante puede ser mayor, menor o aproximadamente igual a la del polipéptido no mutado.

70 75 80 Las mutaciones en las secuencias de nucleótidos y polipéptidos que se describen en la presente descripción pueden incluir mutaciones artificiales o mutaciones sintéticas o mutaciones modificadas genéticamente. Las mutaciones en las secuencias de nucleótidos y polipéptidos que se describen en la presente descripción pueden ser mutaciones que se obtienen o pueden obtenerse mediante un proceso que incluye una etapa de manipulación *in vitro* o *in vivo*. Las mutaciones en las secuencias de nucleótidos y polipéptidos que se describen en la presente descripción pueden ser mutaciones que se obtienen o pueden obtenerse mediante un proceso que incluye la intervención del hombre. A modo de ejemplo, el proceso puede incluir mutagénesis mediante el uso de sustancias químicas que se añaden exógenamente, tales como compuestos orgánicos mutagénicos, teratogénicos, o carcinogénicos, por ejemplo, metanosulfonato de etilo (EMS), que producen mutaciones aleatorias en el material genético. A modo de ejemplo adicional, el proceso puede incluir una o más etapas de ingeniería genética, tal como una o más de las etapas de ingeniería genética que se describen en la presente descripción o sus combinaciones. A modo de ejemplo adicional, el proceso puede incluir una o más etapas de cruce de plantas.

85 La actividad de uno o más polipéptidos de asparagina sintetasa en una planta se reduce o se inhibe de conformidad con la presente descripción si la actividad de conversión es estadísticamente menor que la actividad de conversión del mismo polipéptido(s) de asparagina sintetasa en una planta que no se ha modificado para inhibir la actividad de conversión de ese polipéptido de asparagina sintetasa y que se ha cultivado y cosechado con el uso de los mismos

protocolos. La actividad del polipéptido de asparagina sintetasa en una planta se considera eliminada cuando no es detectable mediante los métodos de ensayo descritos en la presente descripción. Los métodos para determinar la actividad de un polipéptido de asparagina sintetasa se describen en la presente descripción.

- 5 Además de la mutagénesis, las composiciones que pueden modular la expresión o la actividad de uno o más de los polinucleótidos o polipéptidos descritos en la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, polinucleótidos específicos de secuencias que pueden interferir con la transcripción de uno o más genes endógenos; polinucleótidos específicos de secuencias que pueden interferir con la traducción de transcritos de ARN (por ejemplo, ARN bicatenario, ARNip, ribozimas); polipéptidos específicos de secuencias que pueden interferir con la estabilidad de una o más proteínas; polinucleótidos específicos de secuencias que pueden interferir con la actividad enzimática de una o más proteínas o la actividad de unión de una o más proteínas con respecto a los sustratos o proteínas reguladoras; anticuerpos que presentan especificidad por una o más proteínas; compuestos de molécula pequeña que pueden interferir con la estabilidad de una o más proteínas o la actividad enzimática de una o más proteínas o la actividad de unión de una o más proteínas; proteínas con dedos de zinc que se unen a uno o más polinucleótidos; y meganucleasas que tienen actividad hacia uno o más polinucleótidos. En la técnica se conocen bien las tecnologías de edición de genes, las tecnologías de edición genética y las tecnologías de edición de genomas.

Un método de edición de genes implica el uso de nucleasas efectoras similares a activadores de la transcripción (TALEN) que inducen rupturas de la doble cadena, a lo que las células pueden responder con mecanismos de reparación. La unión de extremos no homólogos conecta nuevamente el ADN de cada lado de una ruptura de la doble cadena donde existe muy poco o ningún solapamiento de secuencias para la hibridación. Este mecanismo de reparación induce errores en el genoma por medio de inserción o eliminación, o reordenamiento cromosómico. Cualquiera de estos errores puede volver no funcionales a los productos génicos codificados en esa ubicación. Otro método de edición de genes implica el uso del sistema CRISPR/Cas bacteriano. Las bacterias y arqueas exhiben elementos cromosómicos denominados repeticiones palindrómicas cortas interespaciadas agrupadas regularmente (CRISPR) que son parte de un sistema inmunitario adaptativo que protege contra ADN invasor viral y plasmídico. En los sistemas CRISPR tipo II, los ARN de CRISPR (crARN) funcionan con crARN transactivador (tracrARN) y proteínas asociadas a CRISPR (Cas) para introducir rupturas de la doble cadena en un ADN objetivo. La escisión del objetivo mediante Cas9 requiere apareamiento de bases entre los crARN y tracrARN así como apareamiento de bases entre los crARN y el ADN objetivo. El reconocimiento del objetivo se facilita por la presencia de un motivo corto denominado un motivo adyacente al protoespaciador (PAM) que conforma a la secuencia NGG. Este sistema puede emplearse para la edición de genomas. Cas9 normalmente se programa mediante un ARN doble que consiste en el crARN y tracrARN. Sin embargo, los componentes núclicos de estos ARN pueden combinarse en un solo "ARN guía" híbrido para el direccionamiento de Cas9. El uso de una guía de ARN no codificante para dirigirse al ADN para una escisión específica de un sitio promete ser significativamente más directo que las tecnologías existentes, tales como TALEN. Mediante el uso de la estrategia CRISPR/Cas, el redireccionamiento del complejo de nucleasas sólo requiere la introducción de una nueva secuencia de ARN y no hay necesidad de rediseñar la especificidad de los factores de transcripción de proteínas.

40 La tecnología antisentido es otro método que se conoce bien y que puede usarse para modular la expresión de un polipéptido. Un polinucleótido del gen a reprimir se clona y se une operativamente a una región reguladora y una secuencia de terminación de la transcripción de manera que la cadena antisentido de ARN se transcribe. El constructo recombinante se transforma después en una célula vegetal y se produce la cadena de ARN antisentido. El polinucleótido no necesita ser la secuencia completa del gen a reprimir, pero típicamente será complementaria esencialmente a al menos una porción de la cadena sentido del gen a reprimir.

45 Un polinucleótido puede transcribirse en una ribozima, o ARN catalítico, que afecta la expresión de un ARNm. Las ribozimas pueden diseñarse para aparearse específicamente con virtualmente cualquier ARN objetivo y escindir la cadena principal de fosfodiéster en una ubicación específica, de esta manera inactivan funcionalmente el ARN objetivo. Los polinucleótidos heterólogos pueden codificar ribozimas diseñadas para escindir transcritos de ARNm particulares, lo que impide así la expresión de un polipéptido. Las ribozimas cabeza de martillo son útiles para destruir ARNm particulares, aunque pueden usarse varias ribozimas que escinden ARNm en secuencias de reconocimiento específicas de sitio. Las ribozimas cabeza de martillo escinden ARNm en ubicaciones determinadas por regiones flanqueantes que forman pares de bases complementarios con el ARNm objetivo. El único requerimiento es que el ARN objetivo contenga una secuencia de nucleótidos 5'-UG-3'. La construcción y producción de ribozimas cabeza de martillo se conoce en la técnica. Las secuencias de ribozimas cabeza de martillo pueden incorporarse en un ARN estable tal como un ARN de transferencia (ARNt) para aumentar la eficacia de escisión *in vivo*.

50 En una modalidad, el polinucleótido específico de secuencia que puede interferir con la traducción de transrito(s) de ARN es ARN de interferencia. La interferencia por ARN o el silenciamiento por ARN es un proceso conservado evolutivamente mediante el cual los ARNm específicos pueden dirigirse para la degradación enzimática. Un ARN bicatenario (ARN de doble cadena) se introduce o se produce por una célula (por ejemplo, virus de ARN bicatenario, o polinucleótidos de ARN de interferencia) para iniciar la vía del ARN de interferencia. El ARN bicatenario puede convertirse en múltiples dúplex de ARN pequeño de interferencias de 21-23 pb de longitud por las ARNasas III, que son endonucleasas específicas de ARN bicatenario. Los ARN pequeño de interferencias pueden reconocerse posteriormente mediante complejos de silenciamiento inducidos por ARN que promueven el desenrollamiento de ARN

- pequeño de interferencia a través de un proceso dependiente de ATP. La cadena antisentido desenrollada del ARN pequeño de interferencia guía los complejos de silenciamiento inducidos por ARN activados al ARNm objetivo que comprende una secuencia complementaria a la cadena antisentido del ARN pequeño de interferencia. El ARNm objetivo y la cadena antisentido pueden formar una hélice en forma A, y el surco mayor de la hélice en forma A puede 5 reconocerse por los complejos de silenciamiento inducidos por ARN activados. El ARNm objetivo puede escindirse mediante complejos de silenciamiento inducidos por ARN activados en un sitio único definido por el sitio de unión del extremo 5' de la cadena del ARN pequeño de interferencia. El complejo de silenciamiento inducido por ARN activado puede reciclararse para catalizar otro evento de escisión. Un ejemplo de una secuencia codificante de *NtASN1-S* que se 10 puede usar para silenciar las copias de *NtASN1-S* y *NtASN1-T* se muestra en la SEQ ID NO: 17. Por lo tanto, un aspecto adicional se refiere a la secuencia de nucleótidos establecida en la SEQ ID NO: 17 o una secuencia que tiene al menos 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 80 %, 85 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 % 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad de secuencia con esta. Un ejemplo de una secuencia codificante de *NtASN5-T* que se puede 15 usar para silenciar las copias de *NtASN1-S* y *NtASN1-T* se muestra en la SEQ ID NO: 18. Por lo tanto, un aspecto adicional se refiere a la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 17. Por lo tanto, un aspecto adicional se refiere a la secuencia de nucleótidos establecida en la SEQ ID NO: 18 o una secuencia que tiene al menos 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 80 %, 85 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 % 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad de secuencia con esta. También se contemplan métodos de silenciamiento génico mediante el uso de estas secuencias codificantes y usos de estas.
- 20 Los vectores de expresión de ARN de interferencia pueden comprender constructos de ARN de interferencia que codifican polinucleótidos de ARN de interferencia que muestran actividad de interferencia de ARN mediante la reducción del nivel de expresión de los ARNm, pre-ARNm, o variantes de ARN relacionadas. Ejemplos de constructos se muestran en la Figura 22. Los vectores de expresión pueden comprender un promotor ubicado corriente arriba y unido operativamente a un constructo de ARN de interferencia, como se describe adicionalmente en la presente descripción. Los vectores de expresión de ARN de interferencia pueden comprender un promotor de núcleo mínimo adecuado, un constructo de ARN de interferencia de interés, una región regulatoria corriente arriba (5'), una región regulatoria corriente abajo (3'), que incluye señales de terminación de la transcripción y poliadenilación, y otras 25 secuencias conocidas para los expertos en la técnica, tales como diversos marcadores de selección.
- 30 Los polinucleótidos pueden producirse en varias formas, que incluyen estructuras biconexas (es decir, una molécula de ARN biconexa que comprende una cadena antisentido y una cadena sentido complementaria), estructuras biconexas similares a horquillas, o estructuras monocatenarias (es decir, una molécula de ARNmc que comprende solo una cadena antisentido). Las estructuras pueden comprender un híbrido, híbrido asimétrico, horquilla o estructura secundaria de horquilla asimétrica, que tiene cadenas sentido y antisentido autocomplementarias. El ARN de 35 interferencia biconexo puede convertirse enzimáticamente en ARN pequeño de interferencias biconexos. Una de las cadenas del dúplex de ARN pequeño de interferencia puede aparearse con una secuencia complementaria dentro del ARNm objetivo y variantes de ARN relacionadas. Los dúplex ARN pequeño de interferencia/ARNm se reconocen por el complejo de silenciamiento inducido por ARN que puede escindir los ARN en múltiples sitios de una manera dependiente de la secuencia, lo que da como resultado la degradación del ARNm objetivo y variantes del ARN 40 relacionadas.
- Las moléculas de ARN biconexo pueden incluir moléculas de ARN pequeño de interferencia, ensambladas a partir de un solo oligonucleótido en una estructura de tallo-lazo, en donde las regiones sentido y antisentido autocomplementarias de la molécula de ARN pequeño de interferencia se unen por medio de un enlazador(es) basado(s) en un polinucleótido o no, así como también ARN circular monocatenario que tiene dos o más estructuras de lazo y un tallo que comprende las cadenas sentido y antisentido autocomplementarias, en donde el ARN circular 45 puede procesarse ya sea *in vivo* o *in vitro* para generar una molécula activa de ARN pequeño de interferencia capaz de mediar la interferencia de ARN.
- 50 Se contempla, además, el uso de moléculas pequeñas de ARN en horquilla. Ellas comprenden una secuencia antisentido específica además de la secuencia complementaria inversa (sentido), típicamente separadas por un espaciador o secuencia en lazo. La escisión del espaciador o lazo proporciona una molécula de ARN monocatenario y su complemento inverso, de manera que pueden aparearse para formar una molécula de ARN biconexo (opcionalmente con etapas de procesamiento adicionales que pueden resultar en la adición o eliminación de uno, dos, tres o más nucleótidos a partir del extremo 3' o el extremo 5' de cualquiera de las cadenas o de ambas). El espaciador puede ser de una longitud suficiente para permitir que las secuencias antisentido y sentido se aparen y formen una estructura biconexa (o tallo) antes de la escisión del espaciador (y, opcionalmente, etapas de procesamiento posteriores que pueden resultar en la adición o eliminación de uno, dos, tres, cuatro, o más nucleótidos a partir del extremo 3' o el extremo 5' de cualquiera de las cadenas o de ambas). La secuencia del espaciador es típicamente una 55 secuencia de nucleótidos no relacionada que se ubica entre dos regiones complementarias de secuencias de nucleótidos las cuales, cuando se aparen en un polinucleótido biconexo, comprenden un ARN de horquilla pequeño. La secuencia del espaciador comprende generalmente entre aproximadamente 3 y aproximadamente 100 nucleótidos.
- 60 65 Cualquier polinucleótido de ARN de interés puede producirse al seleccionar una adecuada composición de secuencias, tamaño del lazo, y longitud del tallo para producir el dúplex en horquilla. Un intervalo adecuado para diseñar las

longitudes del tallo de un dúplex en horquilla, incluye las longitudes del tallo de al menos aproximadamente 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleótidos – tales como aproximadamente 14-30 nucleótidos, aproximadamente 30-50 nucleótidos, aproximadamente 50-100 nucleótidos, aproximadamente 100-150 nucleótidos, aproximadamente 150-200 nucleótidos, aproximadamente 200-300 nucleótidos, aproximadamente 300-400 nucleótidos, aproximadamente 400-500 nucleótidos, aproximadamente 500-600 nucleótidos, y aproximadamente 600-700 nucleótidos. Un intervalo adecuado para diseñar las longitudes del lazo de un dúplex en horquilla, incluye las longitudes del lazo de aproximadamente 4-25 nucleótidos, aproximadamente 25-50 nucleótidos, o más largas si la longitud del tallo del dúplex en horquilla es sustancial. En ciertas modalidades, una molécula de ARN bicatenario o de ARNm es de entre aproximadamente 15 y aproximadamente 40 nucleótidos en longitud. En otra modalidad, la molécula de ARN pequeño de interferencia es una molécula de ARN bicatenario o ARNm entre aproximadamente 15 y aproximadamente 35 nucleótidos en longitud. En otra modalidad, la molécula de ARN pequeño de interferencia es una molécula de ARN bicatenario o ARNm entre aproximadamente 17 y aproximadamente 30 nucleótidos en longitud. En otra modalidad, la molécula de ARN pequeño de interferencia es una molécula de ARN bicatenario o ARNm entre aproximadamente 19 y aproximadamente 25 nucleótidos en longitud. En otra modalidad, la molécula de ARN pequeño de interferencia es una molécula de ARN bicatenario o ARNm entre aproximadamente 21 a aproximadamente 23 nucleótidos en longitud. En ciertas modalidades, las estructuras de horquillas con regiones híbridas más largas que 21 nucleótidos pueden promover un efectivo silenciamiento dirigido por el ARN pequeño de interferencia, independientemente de la secuencia y la longitud del lazo. Ejemplos de secuencias codificantes usadas para la interferencia de ARN se exponen en las SEQ ID No: 17 y 18.

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

En una modalidad, se selecciona que las secuencias de ARNm objetivo sean entre aproximadamente 14 y aproximadamente 30 nucleótidos de longitud que cumplan uno o más de los criterios anteriores. En otra modalidad, se selecciona que las secuencias objetivos sean entre aproximadamente 16 y aproximadamente 30 nucleótidos de longitud que cumplan con uno o más de los criterios anteriores. En una modalidad adicional, se selecciona que las secuencias objetivos sean entre aproximadamente 19 y aproximadamente 30 nucleótidos de longitud que cumplan con uno o más de los criterios anteriores. En otra modalidad, se selecciona que las secuencias objetivos sean entre aproximadamente 19 y aproximadamente 25 nucleótidos de longitud que cumplan con uno o más de los criterios anteriores.

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

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

La secuencia antisentido específica de la molécula de ARN pequeño de interferencia puede exhibir variabilidad al diferir (por ejemplo, por sustitución de nucleótidos, lo que incluye transición o transversión) en uno, dos, tres, cuatro o más nucleótidos de la secuencia del ARNm objetivo. Cuando tales sustituciones de nucleótidos están presentes en la cadena antisentido de una molécula de ARN bicatenario, el nucleótido complementario en la cadena sentido con el cual el nucleótido sustituto típicamente formaría apareamiento de bases por enlace de hidrógeno puede o no estar sustituido de manera correspondiente. Se contemplan además las moléculas de ARN bicatenario en las que se producen una o más sustituciones de nucleótidos en la secuencia sentido pero no en la cadena antisentido. Cuando la secuencia antisentido de una molécula de ARN pequeño de interferencia comprende uno o más errores de apareamiento entre la secuencia de nucleótidos del ARN pequeño de interferencia y la secuencia de nucleótidos objetivo, como se describió anteriormente, los errores de apareamiento pueden encontrarse en el extremo 3' terminal, el extremo 5' terminal o en la porción central de la secuencia antisentido.

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

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

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

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

Cuando se determina el porcentaje de identidad de la molécula de ARN de interferencia que comprende uno o más salientes con respecto a la secuencia de ARNm objetivo, el(s) saliente(s) puede(n) tomarse en cuenta o no. Por ejemplo, los nucleótidos de un saliente en 3' y hasta 2 nucleótidos de los extremos 5' o 3' terminales de la doble cadena pueden modificarse sin una pérdida significativa de la actividad de la molécula de ARN pequeño de interferencia.

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

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

Los nucleótidos en una o en ambas de las dos cadenas simples pueden modificarse para modular la activación de enzimas celulares, tales como, por ejemplo, sin limitación, ciertas nucleasas. Las técnicas para reducir o inhibir la activación de enzimas celulares se conocen en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, modificaciones 2'-amino, modificaciones 2'-fluoro, modificaciones 2'-alquilo, modificaciones a la cadena principal no cargada, modificaciones morfolino, modificaciones 2'-O-metil, y fosforamidato. Así, al menos un grupo 2'-hidroxilo de los nucleótidos en un ARN

bicatenario se reemplaza por un grupo químico. Además, al menos un nucleótido puede modificarse para formar un nucleótido bloqueado. Tal nucleótido bloqueado contiene un puente de metileno o etileno que conecta el oxígeno 2' de la ribosa con el carbono 4' de la ribosa. La introducción de un nucleótido bloqueado en un oligonucleótido mejora la afinidad por secuencias complementarias y aumenta la temperatura de fusión en varios grados.

- 5 Los ligandos pueden conjugarse con una molécula de ARN de interferencia, por ejemplo, para aumentar su absorción celular. En ciertas modalidades, un ligando hidrofóbico se conjuga a la molécula para facilitar la permeación directa de la membrana celular. Estos enfoques se han usado para facilitar la permeación celular de oligonucleótidos antisentido. En ciertos casos, la conjugación de un ligando catiónico a oligonucleótidos resulta frecuentemente en una 10 resistencia mejorada a las nucleasas. Los ejemplos representativos de ligandos catiónicos incluyen propilamonio y dimetilpropilamonio. Los oligonucleótidos antisentido pueden retener su afinidad alta de unión al ARNm cuando el ligando catiónico está disperso en todo el oligonucleótido.
- 15 Las moléculas y polinucleótidos descritos en la presente descripción puede prepararse mediante el uso de técnicas de síntesis en fase sólida bien conocidas. Cualquier otro medio conocido en la técnica para dicha síntesis puede emplearse alternativa o adicionalmente.
- 20 Diversas modalidades se dirigen a vectores de expresión que comprenden uno o más de los polinucleótidos o uno o más constructos de ARN de interferencia descritos en la presente descripción. Ejemplos de constructos se muestran en la Figura 21.
- 25 Diversas modalidades se dirigen a vectores de expresión que comprenden uno o más polinucleótidos o uno o más constructos de ARN de interferencia que codifican uno o más polinucleótidos de ARN de interferencia descritos en la presente descripción que pueden autohibridar para formar una estructura de horquilla, en la que el constructo comprende (a) uno o más de los polinucleótidos descritos en la presente descripción; (b) una segunda secuencia que codifica un elemento espaciador que forma un lazo de la estructura de horquilla; y (c) una tercera secuencia que comprende una secuencia complementaria inversa a la primera secuencia, ubicada en la misma orientación que la primera secuencia, en donde la segunda secuencia se ubica entre la primera secuencia y la tercera secuencia, y la segunda secuencia está unida operativamente a la primera secuencia y a la tercera secuencia.
- 30 30 Las secuencias descritas pueden utilizarse para construir varios polinucleótidos que no forman estructuras en horquilla. Por ejemplo, un ARN bicatenario puede formarse al (1) transcribir una primera cadena del ADN al unirse operativamente a un primer promotor, y (2) transcribir la secuencia complementaria inversa de la primera cadena del fragmento de ADN al unirse operativamente a un segundo promotor. Cada cadena del polinucleótido puede 35 transcribirse a partir del mismo vector de expresión, o a partir de vectores de expresión diferentes. El ARN híbrido que tiene actividad de interferencia del ARN puede convertirse enzimáticamente a ARN pequeños de interferencia para modular los niveles de ARN.
- 40 Así, diversas modalidades se dirigen a vectores de expresión que comprenden uno o más polinucleótidos o constructos de ARN de interferencia descritos en la presente descripción que codifican polinucleótidos de ARN de interferencia que pueden autohibridar, en los que el constructo comprende (a) uno o más de los polinucleótidos descritos en la presente descripción; y (b) una segunda secuencia que comprende una secuencia complementaria (por ejemplo, complementaria inversa) a la primera secuencia, ubicada en la misma orientación que la primera secuencia.
- 45 45 Se proporcionan varias composiciones y métodos para modular los niveles de expresión endógena de uno o más de los polipéptidos descritos en la presente descripción (o cualquiera de sus combinaciones como se describe en la presente descripción) al promover la cosupresión de la expresión génica. El fenómeno de cosupresión se produce como un resultado de introducir múltiples copias de un transgén en una célula vegetal huésped. La integración de múltiples copias de un transgén puede dar como resultado la expresión modulada del transgén y el gen objetivo 50 endógeno. El grado de cosupresión depende del grado de identidad de secuencias entre el transgén y el gen objetivo endógeno. El silenciamiento tanto del gen endógeno como del transgén puede producirse por metilación extensa de los loci silenciados (es decir, el promotor endógeno y el gen endógeno de interés) que puede impedir la transcripción. Alternativamente, en algunos casos, la cosupresión del gen endógeno y el transgén puede producirse mediante 55 silenciamiento génico post transcripcional, en la cual pueden producirse los transcritos pero el aumento de las tasas de degradación impide la acumulación de transcritos. El mecanismo para la cosupresión mediante silenciamiento génico post transcripcional parece asemejarse a la interferencia por ARN, en que el ARN parece ser tanto un cebador importante como un objetivo en estos procesos, y puede mediarse al menos en parte por la misma maquinaria molecular, a través posiblemente de la degradación de los ARNm guiada por ARN.
- 60 60 La cosupresión de ácidos nucleicos puede lograrse mediante la integración de múltiples copias del ácido nucleico o fragmentos de este, como transgenes, en el genoma de una planta de interés. La planta huésped puede transformarse con un vector de expresión que comprende un promotor unido operativamente al ácido nucleico o fragmentos de este. Diversas modalidades se dirigen a vectores de expresión para promover la cosupresión de genes endógenos que comprenden un promotor unido operativamente a un polinucleótido.

- Diversas modalidades se dirigen a métodos para modular el nivel de expresión de uno o más de los polinucleótidos descritos en la presente descripción (o cualquiera de sus combinaciones como se describe en la presente descripción) mediante la integración de múltiples copias del(de los) polinucleótido(s) en un genoma de planta, que comprenden: transformar una célula vegetal hospedera con un vector de expresión que comprende un promotor unido operativamente a un polinucleótido.
- Se proporcionan diversas composiciones y métodos para modular el nivel de expresión génica endógena al modular la traducción de ARNm. Una célula vegetal hospedera puede transformarse con un vector de expresión que comprende: un promotor unido operativamente a un polinucleótido, ubicado en orientación antisentido con respecto al promotor para permitir la expresión de polinucleótidos de ARN que tienen una secuencia complementaria a una porción de ARNm.
- Diversos vectores de expresión para modular la traducción de ARNm pueden comprender: un promotor unido operativamente a un polinucleótido en el que la secuencia se ubica en orientación antisentido con respecto al promotor. Las longitudes de los polinucleótidos de ARN antisentido pueden variar, y pueden ser de aproximadamente 15-20 nucleótidos, aproximadamente 20-30 nucleótidos, aproximadamente 30-50 nucleótidos, aproximadamente 50-75 nucleótidos, aproximadamente 75-100 nucleótidos, aproximadamente 100-150 nucleótidos, aproximadamente 150-200 nucleótidos y aproximadamente 200-300 nucleótidos.
- Además, el direccionamiento a los genes puede lograrse por inactivación mediante la introducción de transposones (por ejemplo, elementos IS) en los genomas de plantas de interés. Estos elementos genéticos móviles pueden introducirse por fecundación sexual cruzada y los mutantes por inserción pueden tamizarse para determinar la pérdida de la actividad de proteína. El gen interrumpido en una planta parental puede introducirse en otras plantas mediante el cruzamiento de la planta parental con una planta no sujeta a mutagénesis inducida por transposones mediante, por ejemplo, fertilización cruzada sexual. Puede usarse cualquier técnica de mejoramiento estándar conocida por los expertos en la técnica. En una modalidad, uno o más genes pueden inactivarse mediante la inserción de uno o más transposones. Las mutaciones pueden dar como resultado la interrupción homocigótica de uno o más genes, la interrupción heterocigótica de uno o más genes, o una combinación de ambas interrupciones homocigóticas y heterocigóticas si se interrumpe más de un gen. Los elementos transponibles adecuados incluyen retrotransposones, retroposones, y elementos similares a SINE. Tales métodos se conocen por los expertos en la técnica.
- Alternativamente, el direccionamiento a los genes puede ser por inactivación al introducir ribozimas derivadas a partir de un número de ARN circulares pequeños que son capaces de autoescisión y replicación en plantas. Estos ARN pueden replicarse lo mismo solos (ARN viroides) o con un virus auxiliar (ARN satélites). Los ejemplos de ARN adecuados incluyen los derivados del viroide del veteado marrón rojizo del aguacate y ARN satélites derivados de virus de la mancha de anillo del tabaco, virus del veteado transitorio de la alfalfa, virus del moteado del tabaco suave, virus del moteado nodoso de flor del género Solanum, y virus del moteado del trébol subterráneo. Diversas ribozimas específicas de ARN objetivo se conocen por los expertos en la técnica.
- Como se describe en la presente descripción, la expresión de uno o más polipéptidos puede modularse por medios no transgénicos, tales como la creación de una o más mutaciones en uno o más genes, como se analiza en la presente descripción. Los métodos que introducen una mutación de manera aleatoria en una secuencia génica pueden incluir mutagénesis química, mutagénesis por EMS y mutagénesis por radiación. Los métodos que introducen una o más mutaciones dirigidas en una célula incluyen pero no se limitan a, la tecnología de edición de genomas, particularmente la mutagénesis mediada por nucleasas con dedos de zinc, y lesiones locales inducidas por direccionamiento en genomas (TILLING), recombinación homóloga, mutagénesis dirigida por oligonucleótidos, y mutagénesis mediada por meganucleasas. En una modalidad, se usa TILLING. Esta es una tecnología de mutagénesis que puede usarse para generar y/o identificar polinucleótidos que codifican polipéptidos con modificación de la expresión y/o actividad. El método de TILLING permite, además, la selección de plantas que portan dichos mutantes. El método de TILLING combina la mutagénesis de alta densidad con métodos de tamizaje de alta productividad. Los métodos para TILLING se conocen bien en la técnica (ver McCallum y otros (2000) *Nat Biotechnol* 18: 455-457 y Stemple (2004) *Nat Rev Genet* 5(2): 145-50).
- Algunos ejemplos no limitantes de mutaciones son delecciones, inserciones y mutaciones sin sentido de al menos un nucleótido, polimorfismos de un solo nucleótido y una repetición de una secuencia simple. Después de la mutación, puede realizarse el cribado para identificar delecciones que crean codones de parada prematuros o de cualquier otra manera genes no funcionales. Después de la mutación, puede realizarse el tamizaje para identificar mutaciones que crean genes funcionales capaces de expresarse a niveles elevados. El cribado de mutantes puede llevarse a cabo mediante secuenciación, o mediante el uso de una o más sondas o cebadores específicos para el gen o proteína. También pueden crearse mutaciones específicas en los polinucleótidos que puedan dar como resultado una expresión génica modulada, una estabilidad modulada del ARNm, o una estabilidad modulada de la proteína. Dichas plantas se refieren en la presente descripción como plantas "de origen no natural" o "mutantes". Típicamente, las plantas mutantes o de origen no natural incluirán al menos una porción de ácido nucleico foráneo o sintético o creado por el hombre (por ejemplo, ADN o ARN) que no estaba presente en la planta antes de manipularla. El ácido nucleico extraño puede ser un solo nucleótido, dos o más nucleótidos, dos o más nucleótidos contiguos o dos o más nucleótidos no

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

- 5 Las plantas o células vegetales mutantes o de origen no natural pueden tener cualquier combinación de una o más mutaciones en uno o más genes lo que da como resultado la modulación de los niveles de proteína. Por ejemplo, las plantas o células vegetales mutantes o de origen no natural pueden tener una sola mutación en un solo gen; múltiples mutaciones en un solo gen; una sola mutación en dos o más o tres o más o cuatro o más genes; o múltiples mutaciones en dos o más o tres o más o cuatro o más genes. En la presente descripción se describen ejemplos de tales mutaciones. A manera de ejemplo adicional, las plantas o células vegetales mutantes o de origen no natural pueden tener una o más mutaciones en una porción específica del(de los) gen(es), tal como en una región del gen que codifica un sitio activo de la proteína o una porción de esta. A manera de ejemplo adicional, las plantas o células vegetales mutantes o de origen no natural pueden tener una o más mutaciones en una región fuera de uno o más genes, tal como en una región corriente arriba o corriente abajo del gen que regula siempre y cuando ellas modulen la actividad o expresión del(de los) gen(es). Los elementos corriente arriba pueden incluir promotores, potenciadores o factores de transcripción. Algunos elementos, tales como los potenciadores, pueden ubicarse corriente arriba o corriente abajo del gen que regulan. No es necesario que el(los) elemento(s) se ubique(n) cerca del gen que regulan ya que algunos elementos se han encontrado ubicados varios cientos de miles de pares de bases corriente arriba o corriente abajo del gen que regulan. Las plantas o células vegetales mutantes o de origen no natural pueden tener una o más mutaciones ubicadas dentro de los primeros 100 nucleótidos del(de los) gen(es), dentro de los primeros 200 nucleótidos del(de los) gen(es), dentro de los primeros 300 nucleótidos del(de los) gen(es), dentro de los primeros 400 nucleótidos del(de los) gen(es), dentro de los primeros 500 nucleótidos del(de los) gen(es), dentro de los primeros 600 nucleótidos del(de los) gen(es), dentro de los primeros 700 nucleótidos del(de los) gen(es), dentro de los primeros 800 nucleótidos del(de los) gen(es), dentro de los primeros 900 nucleótidos del(de los) gen(es), dentro de los primeros 1000 nucleótidos del(de los) gen(es), dentro de los primeros 1100 nucleótidos del(de los) gen(es), dentro de los primeros 1200 nucleótidos del(de los) gen(es), dentro de los primeros 1300 nucleótidos del(de los) gen(es), dentro de los primeros 1400 nucleótidos del(de los) gen(es) o dentro de los primeros 1500 nucleótidos del(de los) gen(es). Las plantas o células vegetales mutantes o de origen no natural pueden tener una o más mutaciones ubicadas dentro del primer, segundo, tercero, cuarto, quinto, sexto, séptimo, octavo, noveno, décimo, decimoprimer, decimosegundo, decimotercero, decimocuarto o decimoquinto conjunto de 100 nucleótidos del(de los) gen(es) o sus combinaciones.
- 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65
- Se describen plantas o células vegetales mutantes o de origen no natural (por ejemplo, plantas o células vegetales mutantes, de origen no natural o transgénicas y similares, como se describe en la presente descripción) que comprenden las variantes de polipéptidos mutantes.
- En una modalidad, se produce mutagénesis en semillas de plantas y después se cultivan para obtener plantas mutantes de la primera generación. Después, se deja que las plantas de la primera generación se autopolinicen y las semillas de la planta de la primera generación se cultivan para obtener plantas de la segunda generación, que después se tamizan 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 para crear las plantas mutantes. Sin embargo, el tipo de material vegetal que se somete a mutagénesis puede afectar cuando el ácido nucleico vegetal se analiza en busca de mutaciones. Por ejemplo, cuando el polen se somete a mutagénesis antes de la polinización de una planta sin mutaciones, las semillas que resultan de esa polinización se cultivan para obtener plantas de la primera generación. Cada célula de las plantas de la primera generación contendrá mutaciones creadas en el polen; por lo tanto, estas plantas de la primera generación pueden cribarse después en busca de mutaciones en lugar de esperar hasta la segunda generación.
- Los mutágenos que crean principalmente mutaciones puntuales y delecciones, inserciones, transversiones, y/o transiciones cortas, que incluye mutágenos químicos o radiación, pueden usarse para crear las mutaciones. Los mutágenos incluyen, pero no se limitan a, metanosulfonato de etilo, metanosulfonato de metilo, N-etil-N-nitrosourea, trietilmelamina, N-metil-N-nitrosourea, procarbazina, clorambucilo, ciclofosfamida, sulfato de dietilo, monómero de acrilamida, melfalán, mostaza de nitrógeno, vincristina, dimetilnitrosamina, N-metil-N'-nitro-nitrosoguanidina, nitrosoguanidina, 2-aminopurina, 7,12 dimetil-benzo(a)antraceno, óxido de etileno, hexametilfosforamida, bisulfán, diepoxialcanos (diepoxicostano, diepoxibutano y similares), dihidrocloruro de 2-metoxi-6-cloro-9[3-(etil-2-cloro-ethyl)aminopropilamino]acridina y formaldehído.
- Además, se contemplan las mutaciones espontáneas en el locus que pueden no haberse causado directamente por el mutágeno siempre y cuando resulten en el fenotipo deseado. Los agentes mutagénicos adecuados pueden incluir además, por ejemplo, radiación ionizante, tales como rayos X, rayos gamma, radiación con neutrones rápidos y radiación UV. Cualquier método de preparación de ácidos nucleicos de plantas, conocido por los expertos en la técnica, puede usarse para preparar el ácido nucleico de plantas para el cribado de mutaciones.
- El ácido nucleico que se preparó a partir de plantas individuales, células vegetales, o material vegetal opcionalmente puede mezclarse para un cribado expedito para mutaciones en la población de plantas que se origina del tejido, células o material vegetal que se sometió a mutagénesis. Pueden cribarse una o más generaciones posteriores de plantas,

células vegetales o material vegetal. El tamaño del grupo mezclado opcionalmente depende de la sensibilidad del método de cribado usado.

- Después que las muestras de ácidos nucleicos se mezclan opcionalmente, pueden someterse a técnicas de amplificación específicas de polinucleótidos, tales como la reacción en cadena de la polimerasa. Cualquiera de uno o más cebadores o sondas específicos para el gen o las secuencias inmediatamente adyacentes al gen pueden utilizarse para amplificar las secuencias dentro de la muestra de ácidos nucleicos mezclada opcionalmente. Ejemplos de cebadores oligonucleotídicos se exponen en la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16. Adecuadamente, las SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 14 se usan en combinación para detectar *NtAsn-1*. Adecuadamente, las SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16 se usan en combinación para detectar *NtAsn-5*. Adecuadamente, el uno o más cebadores o sondas se diseñan para amplificar las regiones del locus donde es más probable que surjan mutaciones útiles. Con la máxima preferencia, el cebador se diseña para detectar mutaciones dentro de regiones del polinucleótido. Adicionalmente, se prefiere que el(los) cebador(es) y sonda(s) eviten sitios polimórficos conocidos con el objetivo de facilitar el tamizaje en busca de mutaciones puntuales. Para facilitar la detección de los productos de amplificación, el uno o más cebadores o sondas pueden marcarse con el uso de cualquier método de marcaje convencional. El(los) cebador(es) o la(s) sonda(s) puede(n) diseñarse en base a las secuencias que se describen en la presente descripción mediante el uso de métodos que se comprenden bien en la técnica.
- Para facilitar la detección de los productos de amplificación, el(los) cebador(es) o la(s) sonda(s) pueden marcarse mediante el uso de cualquier método de marcaje convencional. Estos pueden diseñarse a partir de las secuencias que se describen en la presente descripción mediante el uso de métodos que se comprenden bien en la técnica. Los polimorfismos pueden identificarse por medios que se conocen en la técnica y algunos se describen en la literatura.
- En un aspecto adicional se proporciona un método para preparar una planta mutante. El método implica proporcionar al menos una célula de una planta que comprende un gen que codifica un polinucleótido funcional descrito en la presente descripción (o cualquiera de sus combinaciones como se describe en la presente descripción). Seguidamente, la al menos una célula de la planta se trata en condiciones efectivas para modular la actividad del(de los) polinucleótido(s) descrito(s) en la presente descripción. La al menos una célula vegetal mutante se propaga después en una planta mutante, donde la planta mutante tiene un nivel modulado de polipéptido(s) descrito(s) (o cualquiera de sus combinaciones como se describe en la presente descripción) en comparación con el de una planta de control. En una modalidad de este método para crear una planta mutante, la etapa de tratamiento implica someter la al menos una célula a un agente mutagénico químico como se describió anteriormente y en condiciones efectivas para obtener al menos una célula vegetal mutante. En otra modalidad de este método, la etapa de tratamiento implica someter al menos una célula a una fuente de radiación en condiciones efectivas para obtener al menos una célula vegetal mutante. El término "planta mutante" incluye plantas mutantes en las cuales el genotipo se modifica en comparación con una planta control, convenientemente por medios diferentes a la ingeniería genética o modificación genética.
- En ciertas modalidades, la planta mutante, célula vegetal mutante o material vegetal mutante pueden comprender una o más mutaciones que se han producido naturalmente en otra planta, célula vegetal o material vegetal y confieren un rasgo deseado. Esta mutación puede incorporarse (por ejemplo, por introgresión) en otra planta, célula vegetal o material vegetal (por ejemplo, una planta, célula vegetal o material vegetal con un fondo genético diferente a la planta a partir de la cual se derivó la mutación) para crear una mutación que es de origen no natural en esa planta para conferir el rasgo a la misma. Por lo tanto, a modo de ejemplo, una mutación que se produjo naturalmente en una primera planta puede introducirse en una segunda planta, tal como una segunda planta con un fondo genético diferente a la primera planta. Por lo tanto la persona experta es capaz de buscar e identificar una planta que porta naturalmente en su genoma uno o más alelos mutantes de los genes que se describen en la presente descripción que confieren un rasgo deseado. Como se describe en la presente descripción pero no se reivindica, el(los) alelo(s) mutante(s) que se produce(n) naturalmente pueden transferirse a la segunda planta mediante varios métodos que incluyen fitomejoramiento, retrocruzamiento e introgresión para producir líneas, variedades o híbridos que tienen una o más mutaciones en los genes descritos en la presente descripción. Las plantas que muestran un rasgo deseado pueden cribarse de una mezcla de plantas mutantes. Adecuadamente, la selección se lleva a cabo al utilizar el conocimiento de las secuencias de nucleótidos como se describe en la presente descripción. Consecuentemente, es posible cribar en busca de un rasgo genético en comparación con un control. Tal enfoque de cribado puede implicar la aplicación de técnicas convencionales de amplificación y/o hibridación de ácidos nucleicos como se discute en la presente descripción. Por tanto, un aspecto adicional se refiere a un método para identificar una planta mutante que comprende las etapas de: (a) proporcionar una muestra que comprende ácido nucleico de una planta; y (b) determinar la secuencia de ácido nucleico del polinucleótido, en donde una diferencia en la secuencia del polinucleótido en comparación con la secuencia polinucleotídica de una planta de control es indicativo de que dicha planta es una planta mutante. En otro aspecto se proporciona un método para identificar una planta mutante que acumula niveles reducidos de asparagina en comparación con una planta de control, que comprende las etapas de: (a) proporcionar una muestra de una planta que se quiere tamizar; (b) determinar si dicha muestra comprende una o más mutaciones en uno o más de los polinucleótidos descritos en la presente descripción; y (c) determinar al menos el contenido de asparagina de dicha planta.

- En otro aspecto se proporciona un método para preparar una planta mutante que tiene niveles reducidos de asparagina en comparación con una planta de control que comprende las etapas de: (a) proporcionar una muestra de una primera planta; (b) determinar si dicha muestra comprende una o más mutaciones en uno o más de los polinucleótidos descritos en la presente descripción que resultan en niveles reducidos de asparagina y (c) transferir la una o más mutaciones a una segunda planta. La(s) mutación(es) puede(n) transferirse a la segunda planta con el uso de varios métodos que se conocen en la técnica, tales como mediante ingeniería genética, manipulación genética, introgresión, retrocruzamiento y similares. Como se describe en la presente descripción pero no se reivindica, la primera planta puede ser una planta de origen natural. Como se describe en la presente descripción pero no se reivindica, la segunda planta puede tener un fondo genético diferente a la primera planta.
- En otro aspecto se proporciona un método para preparar una planta mutante que tiene niveles reducidos de asparagina en comparación con una planta de control que comprende las etapas de: (a) proporcionar una muestra de una primera planta; (b) determinar si dicha muestra comprende una o más mutaciones en uno o más de los polinucleótidos descritos en la presente descripción que resultan en niveles reducidos de asparagina; y (c) introgresar la una o más mutaciones de la primera planta a una segunda planta. En una modalidad, la etapa de introgresión comprende el mejoramiento de plantas, opcionalmente que incluye el retrocruzamiento y similares. Como se describe en la presente descripción pero no se reivindica, la primera planta es una planta de origen natural. En una modalidad, la segunda planta tiene un fondo genético diferente a la primera planta. En una modalidad, la primera planta no es un cultivar o un cultivar élite. En una modalidad, la segunda planta es un cultivar o un cultivar élite.
- Un aspecto adicional se refiere a una planta mutante (que incluye un cultivar o planta mutante de cultivar élite) obtenida o que puede obtenerse mediante los métodos descritos en la presente descripción. En ciertas modalidades, la "planta mutante" puede tener una o más mutaciones localizadas solo en una región específica de la planta, tal como dentro de la secuencia del uno o más polinucleótido(s) que se describen en la presente descripción. De conformidad con esta modalidad, la secuencia genómica restante de la planta será la misma o esencialmente la misma que la planta antes de la mutagénesis.
- En ciertas modalidades, las plantas mutantes pueden tener una o más mutaciones localizadas en más de una región de la planta, tal como dentro de la secuencia de uno o más de los polinucleótidos descritos en la presente descripción y en una o más regiones adicionales del genoma. De conformidad con esta modalidad, la secuencia genómica restante de la planta mutante no será la misma o no será esencialmente la misma que la planta antes de la mutagénesis. En ciertas modalidades, las plantas mutantes pueden no tener una o más mutaciones en uno o más, dos o más, tres o más, cuatro o más o cinco o más exones del(de los) polinucleótido(s) descrito(s) en la presente descripción; o pueden no tener una o más mutaciones en uno o más, dos o más, tres o más, cuatro o más o cinco o más intrones del(de los) polinucleótido(s) descrito(s) en la presente descripción; o pueden no tener una o más mutaciones en un promotor del(de los) polinucleótido(s) descrito(s) en la presente descripción; o pueden no tener una o más mutaciones en la región no traducida en 3' del(de los) polinucleótido(s) descrito(s) en la presente descripción; o pueden no tener una o más mutaciones en la región no traducida en 5' del(de los) polinucleótido(s) descrito(s) en la presente descripción; o pueden no tener una o más mutaciones en la región codificante del(de los) polinucleótido(s) descrito(s) en la presente descripción; o pueden no tener una o más mutaciones en la región no codificante del(de los) polinucleótido(s) descrito(s) en la presente descripción; o cualquier combinación de dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más; o seis o más de estas partes de estas.
- En un aspecto adicional se proporciona un método para identificar una planta, una célula vegetal o material vegetal que comprende una mutación en un gen que codifica un polinucleótido descrito en la presente descripción que comprende: (a) someter una planta, una célula vegetal o material vegetal a mutagénesis; (b) obtener una muestra de ácido nucleico de dicha planta, célula vegetal o material vegetal o descendientes de estos; y (c) determinar la secuencia de ácido nucleico del gen que codifica un polinucleótido descrito en la presente descripción o una variante o un fragmento de este, en donde una diferencia en dicha secuencia es indicativa de una o más mutaciones en ella.
- Las proteínas de dedos de zinc también pueden usarse para modular la expresión o la actividad de uno o más de los polinucleótidos descritos en la presente descripción. En diversas modalidades, una secuencia de ADN genómico que comprende una parte o toda la secuencia codificante del polinucleótido se modifica por mutagénesis mediada por nucleasas con dedos de zinc. En la secuencia de ADN genómico se busca un sitio único para la unión de proteínas con dedos de zinc. Alternativamente, en la secuencia de ADN genómico se buscan dos sitios únicos para la unión de proteínas de dedos de zinc, en donde ambos sitios están en cadenas opuestas y muy juntos, por ejemplo, separados por 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más pares de bases. En consecuencia, se proporcionan proteínas con dedos de zinc que se unen a los polinucleótidos.
- Una proteína con dedos de zinc puede modificarse genéticamente para que reconozca un sitio objetivo seleccionado en un gen. Una proteína con dedos de zinc puede comprender cualquier combinación de motivos derivados de dominios con dedos de zinc de unión al ADN, naturales, y dominios con dedos de zinc de unión al ADN, no naturales, mediante truncado o expansión o un proceso de mutagénesis dirigida a un sitio acoplado con un método de selección tal como, pero no se limitan a, selección por presentación en fagos, selección de dos híbridos en bacterias o selección de un híbrido en bacterias. El término "dominio con dedos de zinc de unión al ADN, no natural" se refiere a un dominio de dedos de zinc de unión al ADN que se une a una secuencia de tres pares de bases dentro del ácido nucleico

objetivo y que no se produce en la célula u organismo que comprende el ácido nucleico que se modificará. En la técnica se conocen métodos para el diseño de proteínas con dedos de zinc que se unen a secuencias de nucleótidos específicas que son únicas para un gen objetivo.

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

10 15 En otras modalidades, puede seleccionarse una proteína con dedos de zinc para unirse a una secuencia reguladora de un polinucleótido. Más específicamente, la secuencia regulatoria puede comprender un sitio de iniciación de la transcripción, un codón de iniciación, una región de un exón, un límite de un exón-intrón, un terminador, o un codón de parada. En consecuencia, la descripción proporciona una planta o células vegetales mutantes, de origen no natural o transgénicas, producidas por mutagénesis mediada por nucleasas de dedos de zinc en la cercanía de uno o más polinucleótidos descritos en la presente descripción, o dentro de ellos, y métodos para obtener dicha planta o célula vegetal por mutagénesis mediada por nucleasas de dedos de zinc. Los métodos para suministrar una proteína con dedos de zinc y una nucleasa con dedos de zinc a una planta son similares a los descritos más abajo para el suministro de meganucleasa.

20 25 30 En otro aspecto, se describen métodos para producir plantas mutantes, de origen no natural o transgénicas o modificadas genéticamente de cualquier otra manera, mediante el uso de meganucleasas, tales como I-Crel. Las meganucleasas de origen natural, así como las meganucleasas recombinantes, pueden usarse para provocar de manera específica una ruptura de la doble cadena en un solo sitio o en relativamente pocos sitios en el ADN genómico de una planta para permitir la interrupción de uno o más polinucleótidos descritos en la presente descripción. La meganucleasa puede ser una meganucleasa diseñada genéticamente con propiedades de reconocimiento al ADN alteradas. Las proteínas meganucleasas pueden suministrarse a las células vegetales mediante una variedad de mecanismos diferentes conocidos en la técnica.

35 40 La descripción abarca, además, el uso de meganucleasas para inactivar un polinucleótido(s) descrito(s) en la presente descripción (o cualquiera de sus combinaciones como se describe en la presente descripción) en una célula vegetal o planta. Particularmente, la descripción proporciona un método para inactivar un polinucleótido en una planta mediante el uso de una meganucleasa que comprende: a) proporcionar una célula vegetal que comprende un polinucleótido como se describe en la presente descripción; (b) introducir una meganucleasa o un constructo que codifica una meganucleasa en dicha célula vegetal; y (c) permitir que la meganucleasa inactive esencialmente el(los) polinucleótido(s)

45 50 55 60 Las meganucleasas pueden usarse para escindir sitios de reconocimiento de meganucleasas dentro de las regiones codificantes de un polinucleótido. Dicha escisión resulta frecuentemente en la delección de ADN en el sitio de reconocimiento de la meganucleasa después de la reparación mutagénica del ADN por unión de extremos no homólogos. Dichas mutaciones en la secuencia codificante de genes son suficientes típicamente para inactivar el gen. Este método para modificar una célula vegetal implica, primero, el suministro de un casete de expresión de meganucleasa a una célula vegetal con el uso de un método de transformación adecuado. Para lograr la mayor eficiencia, es conveniente unir el casete de expresión de la meganucleasa a un marcador de selección y seleccionar las células transformadas exitosamente en presencia de un agente de selección. Este enfoque resultará en la integración del casete de expresión de meganucleasa en el genoma, sin embargo, podría no ser conveniente si es probable que la planta requiera aprobación regulatoria. En dichos casos, el casete de expresión de meganucleasa (y el gen marcador de selección unido) puede segregarse en posteriores generaciones de plantas mediante el uso de técnicas de mejoramiento convencionales. Alternativamente, las células vegetales pueden transformarse inicialmente con un casete de expresión de meganucleasa que carece de un marcador de selección y pueden cultivarse en medios que carecen de un agente de selección. En tales condiciones, una fracción de las células tratadas adquirirá el casete de expresión de meganucleasa y expresará la meganucleasa diseñada genéticamente de manera transitoria sin integrar el casete de expresión de meganucleasa en el genoma. Debido a que no tiene en cuenta la eficiencia de transformación, este último procedimiento de transformación requiere que se examine un mayor número de células tratadas para obtener la modificación deseada del genoma. El enfoque anterior puede aplicarse, además, para modificar una célula vegetal cuando se usa una proteína con dedos de zinc o nucleasa con dedos de zinc.

65 Después del suministro del casete de expresión de meganucleasa, las células vegetales se cultivan, inicialmente, en condiciones que son típicas para el procedimiento de transformación particular que se usó. Esto puede significar cultivar las células transformadas en los medios a temperaturas por debajo de 26 °C, frecuentemente en la oscuridad. Dichas condiciones estándar pueden usarse durante un período de tiempo, preferentemente 1-4 días, para permitir

que la célula vegetal se recupere del proceso de transformación. En cualquier punto después de este período de recuperación inicial, puede aumentarse la temperatura de cultivo para estimular la actividad de la meganucleasa diseñada genéticamente para escindir y mutar el sitio de reconocimiento de la meganucleasa.

- 5 Para ciertas aplicaciones, puede ser conveniente eliminar de manera precisa el polinucleótido del genoma de la planta. Dichas aplicaciones son posibles mediante el uso de un par de meganucleasas diseñadas genéticamente, cada una de las cuales escinde un sitio de reconocimiento de meganucleasa a cada lado de la delección deseada. Pueden usarse, además, las nucleasas efectoras TAL (TALEN) que pueden reconocer y unirse a un gen e introducir una ruptura de la doble cadena en el genoma. Así, en otro aspecto, se contemplan métodos para producir plantas mutantes, de origen 10 no natural o transgénicas o modificadas genéticamente de cualquier otra manera como se describe en la presente descripción mediante el uso de nucleasas efectoras TAL.

Los genes que se han identificado como implicados en la síntesis de asparagina durante el curado en la variedad Burley de *Nicotinia tabacum* pueden aplicarse a otras plantas y otras variedades de plantas. Por tanto, la presente 15 descripción probablemente pueda reproducirse en otras plantas y aplicarse para el fitomejoramiento con líneas variantes.

Las plantas adecuadas para su uso en la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas y sistemas de células vegetales, que incluyen especies de una de las siguientes familias: 20 Acanthaceae, Alliaceae, Alstroemeriaceae, Amaryllidaceae, Apocynaceae, Arecaceae, Asteraceae, Berberidaceae, Bixaceae, Brassicaceae, Bromeliaceae, Cannabaceae, Caryophyllaceae, Cephalotaxaceae, Chenopodiaceae, Colchicaceae, Cucurbitaceae, Dioscoreaceae, Ephedraceae, Erythroxylaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Lamiaceae, Linaceae, Lycopodiaceae, Malvaceae, Melanthiaceae, Musaceae, Myrtaceae, Nyssaceae, Papaveraceae, Pinaceae, Plantaginaceae, Poaceae, Rosaceae, Rubiaceae, Salicaceae, Sapindaceae, Solanaceae, Taxaceae, 25 Theaceae, o Vitaceae.

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

Las especies adecuadas pueden incluir *Panicum* spp., *Sorghum* spp., *Misanthus* spp., *Saccharum* spp., *Erianthus* spp., *Populus* spp., *Andropogon gerardii* (tallo azul grande), *Pennisetum purpureum* (espadaña), *Phalaris arundinacea* (herba cinta), *Cynodon dactylon* (grama), *Festuca arundinacea* (festuca alta), *Spartina pectinata* (herba cuerda de las praderas), *Medicago sativa* (alfalfa), *Arundo donax* (cañabrava), *Secale cereale* (centeno), *Salix* spp. (sauce), *Eucalyptus* spp. (eucalipto), *Triticosecale* (híbrido de trigo y centeno triticale), bambú, *Helianthus annuus* (girasol), *Carthamus tinctorius* (cártamo), *Jatropha curcas* (jatrofa), *Ricinus communis* (ricino), *Elaeis guineensis* (palma), *Linum usitatissimum* (lino), *Brassica juncea*, *Beta vulgaris* (remolacha), *Manihot esculenta* (mandioca), *Lycopersicon esculentum* (tomate), *Lactuca sativa* (lechuga), *Musyclyce alca* (banana), *Solanum tuberosum* (patata), *Brassica oleracea* (brócoli, coliflor, col de Bruselas), *Camellia sinensis* (té), *Fragaria ananassa* (fresa), *Theobroma cacao* (cacao), *Coffea cyclisea* (café), *Vitis vinifera* (uva), *Ananas comosus* (piña), *Capsicum annum* (pimiento), *Allium cepa* (cebolla), *Cucumis melo* (melón), *Cucumis sativus* (pepino), *Cucurbita maxima* (calabacín), *Cucurbita moschata* (calabacín), *Spinacea oleracea* (espinaca), *Citrullus lanatus* (sandía), *Abelmoschus esculentus* (quimbombó), *Solanum melongena* (berenjena), *Rosa* spp. (rosa), *Dianthus caryophyllus* (clavel), *Petunia* spp. (petunia), *Poinsettia pulcherrima* (flor de pascua), *Lupinus albus* (altramuz blanco), *Uniola paniculata* (avena), *agróstide* (*Agrostis* spp.), *Populus tremuloides* (álaro temblón), *Pinus* spp. (pino), *Abies* spp. (abeto), *Acer* spp. (arce), *Hordeum vulgare* (cebada), *Poa pratensis* (herba verdiazul), *Lolium* spp. (césped inglés) y *Phleum pratense* (Timothy), *Panicum virgatum* (pasto varilla), *Sorghum* (sorgo, hierba del sudán), *Misanthus giganteus* (misanthus), *Saccharum* sp. (caña energética), *Populus balsamifera* (álamo), *Zea mays* (maíz), *Glycine max* (frijol de soya), *Brassica napus* (canola), *Triticum aestivum* (trigo), *Gossypium hirsutum* (algodón), *Oryza sativa* (arroz), *Helianthus annuus* (girasol), *Medicago sativa* (alfalfa), *Beta vulgaris* (remolacha), o *Pennisetum glaucum* (mijo perlado).

60 Diversas modalidades se dirigen a plantas o células vegetales mutantes, de origen no natural o transgénicas, que se modifican para modular los niveles de expresión génica lo que produce de esta manera una planta o célula vegetal, tal como una planta de tabaco o célula vegetal de tabaco, en la que el nivel de expresión de un polipéptido se modula dentro de los tejidos de interés en comparación con un control. Las composiciones y los métodos que se describen 65 pueden aplicarse a cualquier especie del género *Nicotiana*, lo que incluye *N. rustica* y *N. tabacum* (por ejemplo, LA B21, LN KY171, TI 1406, Basma, Galpao, Perique, Beinhart 1000-1, y Petico). Otras especies incluyen *N. acaulis*, *N. acuminata*, *N. africana*, *N. alata*, *N. ameghinoi*, *N. amplexicaulis*, *N. arentsii*, *N. attenuata*, *N. azambujae*, *N. benavidesii*, *N. benthamiana*, *N. bigelovii*, *N. bonariensis*, *N. cavicola*, *N. clevelandii*, *N. cordifolia*, *N. corymbosa*, *N.*

5 *debneyi*, *N. excelsior*, *N. forgetiana*, *N. fragrans*, *N. glauca*, *N. glutinosa*, *N. goodspeedii*, *N. gossei*, *N. hybrid*, *N. ingulba*, *N. kawakamii*, *N. knightiana*, *N. langsdorffii*, *N. linearis*, *N. longiflora*, *N. maritima*, *N. megalosiphon*, *N. miersii*,
N. noctiflora, *N. nudicaulis*, *N. obtusifolia*, *N. occidentalis*, *N. occidentalis* subsp. *hesperis*, *N. otophora*, *N. paniculata*,
N. pauciflora, *N. petunioides*, *N. plumbaginifolia*, *N. quadrivalvis*, *N. raimondii*, *N. repanda*, *N. rosulata*, *N. rosulata*
subsp. ingulba, *N. rotundifolia*, *N. setchellii*, *N. simulans*, *N. solanifolia*, *N. spegazzinii*, *N. stocktonii*, *N. suaveolens*, *N.*
sylvestris, *N. thyrsiflora*, *N. tomentosa*, *N. tomentosiformis*, *N. trigonophylla*, *N. umbratica*, *N. undulata*, *N. velutina*, *N.*
wigandiodoides, y *N. x sanderae*.

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

15 Las variedades particularmente útiles de *Nicotiana tabacum* incluyen los tabacos tipo Burley, tipo oscuro, tipo curado en atmósfera artificial, y tipo Oriental. Los ejemplos no limitantes de variedades o cultivares son: BD 64, CC101, CC 200, CC 27, CC 301, CC 400, CC 500, CC 600, CC 700, CC 800, CC 900, Coker 176, Coker 319, Coker 371 dorado, Coker 48, CD 263, DF911, tabaco Galpao DT 538 LC, GL 26H, GL 350, GL 600, GL 737, GL 939, GL 973, HB 04P, HB 04P LC, HB3307PLC, Híbrido 403LC, Híbrido 404LC, Híbrido 501 LC, K 149, K 326, K 346, K 358, K394, K 399, K 730, KDH 959, KT 200, KT204LC, KY10, KY14, KY 160, KY 17, KY 171, KY 907, KY907LC, KY14xL8 LC, Crittenden pequeño, McNair 373, McNair 944, msKY 14xL8, Hoja estrecha Madole, Hoja estrecha Madole LC, NBH 98, N-126, N-777LC, N-7371LC, NC 100, NC 102, NC 2000, NC 291, NC 297, NC 299, NC 3, NC 4, NC 5, NC 6, NC7, NC 606, NC 71, NC 72, NC 810, NC BH 129, NC 2002, Neal Smith Madole, OXFORD 207, PD 7302 LC, PD 7309 LC, PD 7312 LC, tabaco 'Perique', PVH03, PVH09, PVH19, PVH50, PVH51, R 610, R 630, R 7-11, R 7-12, RG 17, RG 81, RG H51, RGH 4, RGH 51, RS 1410, Speight 168, Speight 172, Speight 179, Speight 210, Speight 220, Speight 225, Speight 227, Speight 234, Speight G-28, Speight G-70, Speight H-6, Speight H20, Speight NF3, TI 1406, TI 1269, TN 86, TN86LC, TN 90, TN 97, TN97LC, TN D94, TN D950, TR (Tom Rosson) Madole, VA 309, VA359, AA 37-1, B13P, Xanthi (Mitchell-Mor), Bel-W3, 79-615, Samsun Holmes NN, KTRDC número 2 híbrido 49, Burley 21, KY8959, KY9, MD 609, PG01, PG04, PO1, PO2, PO3, RG11, RG 8, VA509, AS44, Banket A1, Basma Drama B84/31, Basma I Zichna ZP4/B, Basma Xanthi BX 2A, Batek, Besuki Jember, C104, Coker 347, Criollo Misionero, Delcrest, Djebel 81, DVH 405, Galpão Común, HB04P, Hicks Broadleaf, Kabakulak Elassona, Kutsage E1, LA BU 21, NC 2326, NC 297, PVH 2110, Russo rojo, Samsun, Saplak, Simmaba, Talgar 28, Wslica, Yayaldaq, Prilep HC-72, Prilep P23, Prilep PB 156/1, Prilep P12-2/1, Yaka JK-48, Yaka JB 125/3, TI-1068, KDH-960, TI-1070, TW136, Basma, TKF 4028, L8, TKF 2002, GR141, Basma xanthi, GR149, GR153, Petit Habana. Se contemplan, además, subvariedades de baja conversión de lo anterior, incluso si no se identifican específicamente en la presente descripción.

40 En una modalidad, se usa la variedad de tipo Burley de *Nicotiana tabacum*.

45 Otras plantas adecuadas para su uso en la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, té (*Camellia sinensis*).

50 Las modalidades están dirigidas, además, a composiciones y métodos para producir plantas mutantes, plantas de origen no natural, plantas híbridas, o plantas transgénicas que se han modificado para modular la expresión o la actividad de un polinucleótido(s) descrito(s) en la presente descripción (o cualquiera de sus combinaciones como se describe en la presente descripción). Ventajosamente, las plantas mutantes, plantas de origen no natural, plantas híbridas, o plantas transgénicas que se obtienen pueden ser similares o esencialmente las mismas en su apariencia global respecto a las plantas de control. Diversas características fenotípicas tales como grado de madurez, número de hojas por planta, altura del rabillo, ángulo de inserción de las hojas, tamaño de las hojas (ancho y longitud), distancia de internudos, y relación lámina-nervadura pueden evaluarse mediante observaciones de campo.

55 Un aspecto se refiere a una semilla de una planta mutante, una planta de origen no natural, una planta híbrida o una planta transgénica descrita en la presente descripción. Preferentemente, la semilla es una semilla de tabaco. Un aspecto adicional se refiere al polen o a un óvulo de una planta mutante, una planta de origen no natural, una planta híbrida o una planta transgénica que se describe en la presente descripción. Adicionalmente, se proporciona una planta mutante, una planta de origen no natural, una planta híbrida o una planta transgénica como se describe en la presente descripción, que además comprenden un ácido nucleico que confiere esterilidad masculina.

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

65

Aún un aspecto adicional se refiere a un material vegetal curado, tal como hoja curada o tabaco curado, derivado o derivable de una planta o célula mutante, de origen no natural o transgénica, en donde la expresión de uno o más de los polinucleótidos descritos en la presente descripción o la actividad de la proteína codificada de esta manera se reduce y resulta en niveles reducidos de asparagina.

- 5 Adecuadamente, la apariencia visual de dicha planta (por ejemplo, las hojas) es esencialmente la misma que la de la planta de control. Adecuadamente, la planta es una planta de tabaco.
- 10 Las modalidades se dirigen, además, a composiciones y métodos para producir plantas o células vegetales mutantes, de origen no natural o transgénicas que se han modificado para modular la expresión o la actividad del uno o más de los polinucleótidos o polipéptidos descritos en la presente descripción lo que puede resultar en plantas o componentes vegetales (por ejemplo, hojas, tales como hojas curadas o secadas) o células vegetales con niveles reducidos de asparagina.
- 15 Las plantas mutantes, de origen no natural o transgénicas que se obtienen de conformidad con los métodos descritos en la presente descripción pueden ser similares o esencialmente iguales en cuanto a apariencia visual respecto a las plantas de control. En una modalidad, el peso de las hojas de la planta mutante, de origen no natural o transgénica es esencialmente el mismo que el de la planta de control. En una modalidad, el número de hojas de la planta mutante, de origen no natural o transgénica es esencialmente el mismo que el de la planta de control. En una modalidad, el peso de las hojas y el número de hojas de la planta mutante, de origen no natural o transgénica son esencialmente los mismos que los de la planta de control. En una modalidad, la altura del tallo de las plantas mutantes, de origen no natural o transgénicas es esencialmente la misma que la de las plantas control, por ejemplo, a los dos o tres meses después del trasplante al campo o 10, 20, 30 o 36 días después del desmocche. Por ejemplo, la altura del tallo de las plantas mutantes, de origen no natural o transgénicas no es menor que la altura del tallo de las plantas control. En otra modalidad, el contenido de clorofila de las plantas mutantes, de origen no natural o transgénicas es esencialmente el mismo que el de las plantas control. En otra modalidad, la altura del tallo de las plantas mutantes, de origen no natural o transgénicas es esencialmente la misma que la de las plantas control y el contenido de clorofila de las plantas mutantes, de origen no natural o transgénicas es esencialmente el mismo que el de las plantas control. En otras modalidades, el tamaño o la forma, el número o la coloración de las hojas de las plantas mutantes, de origen no natural o transgénicas son esencialmente iguales que las de las plantas control. Adecuadamente, la planta es una planta de tabaco.
- 20
- 25
- 30
- 35 En otro aspecto, se proporciona un método para modular (por ejemplo reducir) la cantidad de asparagina en al menos una parte de una planta (por ejemplo, las hojas, tales como las hojas curadas o secas, o en tabaco), que comprende las etapas de: (i) modular (por ejemplo reducir) la expresión o actividad de uno o más de los polipéptidos descritos en la presente descripción, adecuadamente, en donde el(es) polipéptido(s) está(n) codificado(s) por la correspondiente secuencia polinucleotídica descrita en la presente descripción; (ii) medir el contenido de asparagina en al menos una parte (por ejemplo, las hojas, tales como las hojas curadas) de la planta mutante, de origen no natural o transgénica obtenida en la etapa (i); e (iii) identificar una planta mutante, de origen no natural o transgénica en la que el contenido de asparagina se ha reducido en comparación con una planta de control. Adecuadamente, la apariencia visual de dicha planta mutante, de origen no natural o transgénica es esencialmente la misma que la de la planta de control. Adecuadamente, la planta es una planta de tabaco.
- 40
- 45 En otro aspecto, se proporciona un método para reducir la cantidad de asparagina en al menos una parte del material vegetal curado o secado, tal como la hoja curada o secada, que comprende las etapas de: (i) reducir la expresión o actividad de uno o más de los polipéptidos descritos en la presente descripción, adecuadamente, en donde el(es) polipéptido(s) están codificados por la secuencia polinucleotídica correspondiente descrita en la presente descripción; (ii) cosechar el material vegetal, tal como una o más de las hojas, y curarlo o secarlo durante un período de tiempo; (iii) medir el contenido de asparagina en al menos una parte del material vegetal curado o secado obtenido en la etapa (ii); y (iv) identificar el material vegetal curado o secado en el que el contenido de asparagina se ha reducido en comparación con una planta de control.
- 50
- 55 Una reducción en la expresión en comparación con un control puede ser de aproximadamente 5 % a aproximadamente 100 %, o una reducción de al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, o 100 %, lo que incluye una reducción en la actividad transcripcional o la expresión de polinucleótido o la expresión de polipéptido o una de sus combinaciones.
- 60 Una reducción en la actividad en comparación con un control puede ser de aproximadamente 5 % a aproximadamente 100 %, o una reducción de al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, o 100 %.
- 65 Los polinucleótidos y constructos recombinantes descritos en la presente descripción pueden usarse para modular la expresión de las enzimas descritas en la presente descripción en una especie vegetal de interés, adecuadamente en tabaco.

- Una serie de métodos basados en polinucleótidos pueden usarse para aumentar la expresión génica en plantas y células vegetales, por ejemplo. A manera de ejemplo, puede prepararse un constructo, vector o vector de expresión que sea compatible con la planta a transformar, que comprende el gen de interés junto con un promotor corriente arriba que puede sobreexpresar el gen en la planta o célula vegetal. En la presente descripción se describen 5 promotores ilustrativos. Después de la transformación y cuando se cultiva en condiciones adecuadas, el promotor puede dirigir la expresión con el objetivo de modular (por ejemplo, reducir) los niveles de esta enzima en la planta, o en un tejido específico de estas. En una modalidad ilustrativa, se genera un vector que porta uno o más polinucleótidos descritos en la presente descripción (o cualquiera de sus combinaciones como se describe en la presente descripción) para sobreexpresar el gen en una planta o célula vegetal. El vector porta un promotor adecuado, tal como el promotor 10 de 35S del virus del mosaico de la coliflor CaMV, corriente arriba del transgén que conduce su expresión constitutiva en todos los tejidos de la planta. El vector porta, además, un gen de resistencia a antibióticos para realizar la selección de los callos y líneas celulares transformados.
- Diversas modalidades se dirigen a métodos para reducir el nivel de expresión de uno o más polinucleótidos descritos 15 en la presente descripción al integrar múltiples copias del polinucleótido en un genoma vegetal; los métodos comprenden: transformar una célula vegetal hospedera con un vector de expresión que comprende un promotor unido operativamente a uno o más polinucleótidos descritos en la presente descripción. El polipéptido codificado por un polinucleótido recombinante puede ser un polipéptido natural, o puede ser heterólogo a la célula.
- Una planta que porta un alelo mutante de uno o más polinucleótidos descritos en la presente descripción (o cualquiera 20 de sus combinaciones como se describe en la presente descripción) puede usarse en un programa de fitomejoramiento (no reivindicado) para crear líneas, variedades e híbridos útiles. En particular, el alelo mutante se intrograsa en las variedades comercialmente importantes descritas anteriormente. Así, se proporcionan métodos para el fitomejoramiento de plantas en la presente descripción aunque no se reivindican, que comprenden cruzar una planta 25 mutante, una planta de origen no natural o una planta transgénica como se describe en la presente descripción con una planta que comprende una identidad genética diferente. El método puede comprender, además, cruzar la planta de la progenie con otra planta, y opcionalmente repetir el cruzamiento hasta que se obtenga una progenie con los rasgos genéticos o fondo genético deseables. Un propósito ofrecido por dichos métodos de mejoramiento es introducir 30 un rasgo genético conveniente en otras variedades, líneas de mejoramiento, híbridos o cultivares, particularmente los que son de interés comercial. Otro propósito es facilitar el apilamiento de modificaciones genéticas de diferentes genes en una sola variedad de planta, líneas, híbridos o cultivares. Se contemplan apareamientos intraespecíficos así como también interespecíficos. Las plantas de la progenie que surgen de tales cruces, también referidas como líneas de mejoramiento, son ejemplos de plantas de origen no natural de la descripción.
- Como se describe en la presente descripción pero no se reivindica, se proporciona un método para producir una planta 35 de origen no natural que comprende: (a) cruzar una planta mutante o transgénica con una segunda planta para producir la semilla de tabaco de la progenie; (b) cultivar la semilla de la progenie, en las condiciones de cultivo de la planta, para producir la planta de origen no natural. El método puede comprender además: (c) cruzar la generación anterior de la planta de origen no natural con ella misma o con otra planta para producir la semilla de la progenie; (d) cultivar 40 la semilla de la progenie de la etapa (c) en las condiciones de cultivo de la planta, para producir plantas de origen no natural adicionales; y (e) repetir las etapas de cruzamiento y cultivo (c) y (d) múltiples veces para obtener generaciones adicionales de plantas de origen no natural. Opcionalmente el método puede comprender antes de la etapa (a), una etapa de proporcionar una planta parental que comprende una identidad genética que está caracterizada y que no es 45 idéntica a la planta mutante o transgénica. En algunas modalidades descritas en la presente descripción pero no se reivindican, en dependencia del programa de fitomejoramiento, las etapas de cruzamiento y cultivo se repiten de 0 a 2 veces, de 0 a 3 veces, de 0 a 4 veces, 0 a 5 veces, de 0 a 6 veces, de 0 a 7 veces, de 0 a 8 veces, de 0 a 9 veces o de 0 a 10 veces, con el objetivo de obtener generaciones de plantas de origen no natural. El retrocruzamiento es un 50 ejemplo de tal método en donde una progenie se cruza con uno de sus parentales u otra planta genéticamente similar a su parental, con el objetivo de obtener una planta de la progenie en la próxima generación que tiene una identidad genética que está más cerca a la de uno de sus parentales. Las técnicas de fitomejoramiento, particularmente el fitomejoramiento, se conocen bien y pueden usarse en los métodos de la descripción. Dichas técnicas se describen pero no se reivindican. La descripción proporciona, además, plantas de origen no natural producidas mediante estos métodos. Ciertas modalidades excluyen la etapa de seleccionar una planta.
- En algunas modalidades de los métodos descritos en la presente descripción pero no reivindicados, las líneas que resultan del mejoramiento y tamizaje en busca de genes variantes se evalúan en el campo con el uso de procedimientos de campo estándares. Los genotipos controles que incluyen el parental original sin mutaciones se incluyen y las entradas se disponen en el campo en un diseño de bloque completo aleatorizado u otro diseño de campo apropiado. Para el tabaco, se usan prácticas agronómicas estándar, por ejemplo, el tabaco se cosecha, se pesa, y se 55 toman muestras para pruebas químicas y otras pruebas comunes antes y durante el curado o el secado. El análisis estadístico de los datos se realiza para confirmar la similitud de las líneas seleccionadas con la línea parental. El análisis citogenético de las plantas seleccionadas se realiza opcionalmente para confirmar las relaciones de complemento de los cromosomas y pareado de los cromosomas.
- La huella genética del ADN, el polimorfismo de nucleótido simple, los marcadores microsatélites, o tecnologías similares pueden usarse en un programa de fitomejoramiento por selección asistida por marcadores (MAS), como se 60

describe en la presente descripción pero no se reivindica, para transferir o cruzar alelos mutantes de un gen para otras plantas, como se describe en la presente descripción. Por ejemplo, un genetista puede crear poblaciones segregantes a partir de hibridaciones de un genotipo que contiene un alelo mutante con un genotipo conveniente agronómicamente. Las plantas en las generaciones F2 o de retrocruzamiento pueden tamizarse mediante el uso de un marcador desarrollado a partir de una secuencia genómica o un fragmento de esta, con el uso de una de las técnicas enumeradas en la presente descripción. Las plantas identificadas por poseer el alelo mutante pueden retrocruzarse o autopolinizarse para crear una segunda población a tamizar. En dependencia del patrón de herencia esperado o la tecnología MAS usada, puede ser necesario autopolinizar las plantas seleccionadas antes de cada ciclo de retrocruzamiento para ayudar en la identificación de las plantas individuales deseadas. El retrocruzamiento u otro procedimiento de mejoramiento pueden repetirse hasta que se recupere el fenotipo deseado del parental recurrente.

En un programa de fitomejoramiento, como se describe en la presente descripción pero no se reivindica, los cruces exitosos producen plantas F1 que son fértiles. Las plantas F1 seleccionadas pueden cruzarse con uno de los parentales, y las plantas de la primera generación del retrocruzamiento se autopolinizan para producir una población que se tamiza de nuevo para determinar una expresión génica variante (por ejemplo, la versión nula del gen). El proceso de retrocruzamiento, autopolinización, y tamizaje se repite, por ejemplo, al menos 4 veces hasta que el tamizaje final produce una planta que es fértil y similar razonablemente al parental recurrente. Esta planta, si se desea, se autopoliniza y la progenie se tamiza de nuevo posteriormente para confirmar que la planta exhibe una expresión génica variante. Como se describe en la presente descripción pero no se reivindica, una población de plantas en la generación F2 se tamiza para detectar expresión génica variante, por ejemplo, se identifica una planta que no expresa un polipéptido debido a la ausencia del gen de conformidad con métodos estándar, por ejemplo, mediante el uso de un método de PCR con cebadores basados en la información de la(s) secuencia(s) de nucleótido(s) para el(los) polinucleótido(s) descrito(s) en la presente descripción (o cualquiera de sus combinaciones como se describe en la presente descripción).

Las variedades híbridas, descritas en la presente descripción pero no reivindicadas, pueden producirse al evitar la autopolinización de plantas parentales femeninas (es decir, parentales de semillas) de una primera variedad, lo que permite que el polen de plantas parentales masculinas de una segunda variedad fecunden a las plantas parentales femeninas, y permite que se formen semillas híbridas F1 en las plantas femeninas. La autopolinización de plantas femeninas puede evitarse mediante la emasculación de las flores en una etapa temprana del desarrollo de las flores. Alternativamente, la formación de polen puede evitarse en las plantas parentales femeninas mediante el uso de una forma de esterilidad masculina. Por ejemplo, la esterilidad masculina puede producirse por esterilidad masculina citoplasmática (CMS), o esterilidad masculina transgénica en donde un transgén inhibe la microsporogénesis y/o la formación de polen, o autoincompatibilidad. Las plantas parentales femeninas que contienen CMS son útiles particularmente. En modalidades en las cuales las plantas parentales femeninas son CMS, el polen se cosecha a partir de plantas fértiles masculinas y se aplica manualmente a los estigmas de las plantas parentales femeninas CMS, y se cosecha la semilla F1 resultante.

Las variedades y líneas descritas en la presente descripción pueden usarse para formar híbridos F1 de un cruce simple. En dichas modalidades, las plantas de las variedades parentales pueden cultivarse como poblaciones adyacentes homogéneas esencialmente para facilitar la polinización cruzada natural de las plantas parentales masculinas a las plantas parentales femeninas. La semilla F1 formada sobre las plantas parentales femeninas se cosecha selectivamente por medios convencionales. Además, las dos variedades de plantas parentales pueden cultivarse de manera masiva y cosecharse una mezcla de semillas híbridas F1 formadas en el parental femenino y la semilla formada en el parental masculino como el resultado de la autopolinización. Alternativamente, pueden llevarse a cabo cruces de tres vías en donde un híbrido F1 de un cruce simple se usa como un parental femenino y se cruza con un parental masculino diferente. Como otra alternativa, pueden crearse híbridos de cruces dobles en donde la progenie F1 de dos cruces simples diferentes se cruzan entre ellas. Dichos métodos de fitomejoramiento se describen en la presente descripción pero no se reivindican.

Una población de plantas mutantes, de origen no natural o transgénicas puede tamizarse o seleccionarse en busca de los miembros de la población que tienen un rasgo o fenotipo deseado. Por ejemplo, una población de la progenie de un solo evento de transformación puede cribarse para buscar las plantas que tienen un nivel deseado de la expresión o actividad del(de los) polipéptido(s) codificados de esta manera. Pueden usarse métodos físicos y bioquímicos para identificar los niveles de expresión o actividad. Estos incluyen análisis de Southern o amplificación por PCR para la detección de un polinucleótido; transferencias tipo Northern, protección de S1 RNasa, extensión de cebadores, o amplificación por RT-PCR para detectar transcritos de ARN; ensayos enzimáticos para detectar la actividad de enzima o ribozima de polipéptidos y polinucleótidos; y electroforesis en gel de proteínas, transferencias tipo Western, inmunoprecipitación, e inmunoensayos con unión a enzimas para detectar polipéptidos. Otras técnicas tales como hibridación in situ, tinción enzimática, e inmuntinción y ensayos de enzimas pueden usarse además para detectar la presencia o expresión o actividad de polipéptidos o polinucleótidos.

En la presente descripción se describen células vegetales y plantas mutantes, de origen no natural o transgénicas que comprenden uno o más polinucleótidos recombinantes, uno o más constructos de polinucleótidos, uno o más ARN bicatenarios, uno o más conjugados o uno o más vectores/vectores de expresión.

Sin limitación, las plantas descritas en la presente descripción pueden modificarse para otros propósitos antes o después de la modulación de la expresión o actividad de conformidad con la presente descripción. Una o más de las siguientes modificaciones genéticas pueden estar presentes en las plantas mutantes, de origen no natural o transgénicas. En una modalidad, se modifican uno o más genes que están implicados en la conversión de intermediarios metabólicos del nitrógeno lo que da como resultado plantas (tales como hojas) que cuando se curan, producen niveles menores de al menos una nitrosamina específica del tabaco en comparación con las plantas de control. Los ejemplos no limitantes de genes que puede modificarse incluyen, como se describe en la presente descripción, genes que codifican una asparagina sintetasa, tales como *CYP82E4*, *CYP82E5* y *CYP82E10* que participa en la conversión de nicotina a nornicotina y se describen en los documentos WO2006091194, WO2008070274, WO2009064771 y PCT/US2011/021088 y como se describe en la presente descripción. En otra modalidad, se modifican uno o más genes que están involucrados en la captación de metales pesados o el transporte de metales pesados lo que da como resultado plantas o partes de plantas (tales como hojas) que tienen un menor contenido de metales pesados que las plantas control o partes de estas sin la(s) modificación(ones). Los ejemplos no limitantes incluyen genes en la familia de proteínas asociadas a la resistencia a múltiples fármacos, la familia de facilitadores de la difusión de cationes (CDF), la familia de proteínas similares a Irt, Zrt (ZIP), la familia de intercambiadores de cationes (CAX), la familia de transportadores de cobre (COPT), la familia de ATPasas tipo P de metales pesados (por ejemplo, HMA, como se describe en el documento WO2009074325), la familia de homólogos de proteínas de macrófagos asociadas a la resistencia natural (NRAMP), y la familia de transportadores de casete de unión a ATP (ABC) (por ejemplo, MRP, como se describe en el documento WO2012/028309, que participan en el transporte de metales pesados, tales como el cadmio. El término metal pesado como se usa en la presente descripción incluye metales de transición. Los ejemplos de otras modificaciones incluyen tolerancia a herbicidas, por ejemplo, el glifosato es un ingrediente activo de muchos herbicidas de amplio espectro. Las plantas transgénicas resistentes al glifosato se desarrollaron mediante la transferencia del gen *aroA* (una glifosato EPSP sintetasa de *Salmonella typhimurium* y *E. coli*). Las plantas resistentes a la sulfonilurea se producen mediante la transformación del gen de ALS mutante (acetolactato sintetasa) de *Arabidopsis*. La proteína OB del fotosistema II de *Amaranthus hybridus* mutante se transfirió a plantas para producir plantas transgénicas resistentes a la atrazina; y las plantas transgénicas resistentes al bromoxinilo se producen mediante la incorporación del gen *bxn* de la bacteria *Klebsiella pneumoniae*. Otra modificación ilustrativa da como resultado plantas que son resistentes a insectos. Las toxinas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) pueden proporcionar una forma efectiva de retrasar la emergencia de plagas resistentes a Bt, como se ilustró recientemente en brócoli donde los genes piramidales *cry1Ac* y *cry1C* de Bt controlaron las polillas de dorso de diamante resistentes a cualquiera de las proteínas individuales y retrasaron significativamente la evolución de insectos resistentes. Otra modificación ilustrativa da como resultado plantas que son resistentes a enfermedades causadas por patógenos (por ejemplo, virus, bacterias, hongos). Se modificaron plantas que expresan el gen *Xa21* (resistencia al tizón bacteriano) con plantas que expresan tanto un gen de fusión de Bt como un gen de quitinasa (resistencia al barrenador amarillo del tallo y tolerancia a la cubierta). Otra modificación ilustrativa resulta en una capacidad reproductiva alterada, tal como la esterilidad masculina. Otra modificación ilustrativa resulta en plantas que son tolerantes al estrés abiótico (por ejemplo, sequía, temperatura, salinidad) y se han producido plantas transgénicas tolerantes mediante la transferencia de la enzima de acil glicerol fosfato de *Arabidopsis*; los genes que codifican la manitol deshidrogenasa y sorbitol deshidrogenasa que participan en la síntesis de manitol y sorbitol mejoran la resistencia a la sequía. Otras modificaciones ilustrativas pueden resultar en plantas con almacenamiento mejorado de proteínas y aceites, plantas con eficiencia fotosintética mejorada, plantas con vida útil prolongada, plantas con contenido de carbohidratos mejorado y plantas resistentes a hongos; plantas que codifican una enzima que participa en la biosíntesis de alcaloides. También se contemplan plantas transgénicas en las que se moduló la expresión de S-adenosil-L-metionina (SAM) y/o cistationina gamma-sintasa (CGS).

Uno o más de dichos rasgos pueden introGRESARSE en las plantas mutantes, de origen no natural o transgénicas a partir de otro cultivar o pueden transformarse directamente en estas. La introgresión del(de los) rasgo(s) en las plantas mutantes, de origen no natural o transgénicas puede lograrse mediante cualquier método de mejoramiento de plantas conocido en la técnica, por ejemplo, mejoramiento genealógico, retrocruzamiento, mejoramiento por dobles haploides, y similares (ver, Wernsman, E. A., y Rufty, R. C. 1987. Capítulo Diecisiete. Tobacco. Páginas 669-698 En: *Cultivar Development. Crop Species*. W. H. Fehr (ed.), MacMillan Publishing Co, Inc., Nueva York, N.Y 761 pp.). Dichos métodos de fitomejoramiento se describen en la presente descripción pero no se reivindican. Las técnicas basadas en biología molecular que se describieron anteriormente, en particular RFLP y marcadores microsatélites, pueden usarse en tales retrocruzamientos para identificar las progenies que tienen el mayor grado de identidad genética con el parental recurrente. Esto permite acelerar la producción de variedades que tienen al menos 90 %, preferentemente, al menos 95 %, con mayor preferencia, al menos 99 % de identidad genética con el parental recurrente, aún con mayor preferencia, idénticas genéticamente al parental recurrente, y que comprenden, además, el(los) rasgo(s) introGRESADO(S) a partir del parental donante. Dicha determinación de identidad genética puede basarse en marcadores moleculares conocidos en la técnica.

La última generación de retrocruzamiento puede autofecundarse para proporcionar progenie de mejoramiento puro para el(los) ácido(s) nucleico(s) que se transfiere. Generalmente, las plantas resultantes tienen esencialmente todas las características morfológicas y fisiológicas de las plantas mutantes, de origen no natural o transgénicas, además del(de los) rasgo(s) transferido(s) (por ejemplo, uno o más rasgos de un solo gen). El protocolo de retrocruzamiento exacto dependerá del rasgo que se altera para determinar un protocolo de prueba apropiado. Aunque los métodos de retrocruzamiento se simplifican cuando el rasgo que se transfiere es un alelo dominante, también puede transferirse

un alelo recesivo. En este caso, puede ser necesario introducir una prueba de la progenie para determinar si el rasgo deseado se ha transferido exitosamente.

5 Diversas modalidades proporcionan plantas mutantes, plantas de origen no natural o plantas transgénicas, así como biomasa, donde el nivel de expresión de un polinucleótido (o cualquiera de sus combinaciones como se describe en la presente descripción) se reduce para reducir el contenido de asparagina en estas.

10 Las partes de dichas plantas, particularmente plantas de tabaco, y más particularmente la lámina y la nervadura de las hojas de plantas de tabaco, pueden incorporarse o usarse para fabricar varios productos consumibles que incluyen, pero no se limitan a, materiales formadores de aerosol, dispositivos formadores de aerosol, artículos para fumar, artículos fumables, productos sin humo, y productos de tabaco. Ejemplos de materiales formadores de aerosol incluyen, pero no se limitan a, composiciones de tabaco, tabacos, extracto de tabaco, tabaco cortado, picadura, tabaco curado o seco, tabaco expandido, tabaco homogeneizado, tabaco reconstituido, y tabacos para pipas. Los artículos para fumar y los artículos fumables son tipos de dispositivos formadores de aerosol. Los ejemplos de artículos para fumar o artículos fumables incluyen, pero no se limitan a, cigarrillos, cigarros y tabaco. Los ejemplos de productos sin humo comprenden tabacos de mascar, y rapé. En ciertos dispositivos formadores de aerosol, en lugar de la combustión (o quema), una composición de tabaco u otro material formador de aerosol se calienta, por ejemplo, mediante uno o más elementos de calentamiento eléctrico o una fuente de calor de carbono para producir un aerosol. Típicamente en tales artículos para fumar calentados, un aerosol se genera por la transferencia de calor desde una fuente de calor a un sustrato formador de aerosol separado físicamente, que puede localizarse dentro, alrededor o corriente abajo de la fuente de calor. Durante la acción de fumar, se liberan compuestos volátiles desde el sustrato formador de aerosol mediante la transferencia de calor desde la fuente de calor y se arrastran en el aire aspirado a través del artículo para fumar. A medida que los compuestos liberados se enfrian, se condensan, para formar un aerosol que el usuario inhala. Tales dispositivos incluyen, por ejemplo, dispositivos generadores de aerosol calentados eléctricamente en los que un aerosol se genera mediante la transferencia de calor desde el dispositivo generador de aerosol al sustrato formador de aerosol de un artículo para fumar que se ha calentado. Adecuadamente, durante el calentamiento del sustrato formador de aerosol, no ocurre la combustión o quemado del tabaco. Un artículo formador de aerosol adecuado se describe en el documento WO2013/098405 y comprende un sustrato formador de aerosol para generar un aerosol inhalable al calentarse mediante un elemento de calentamiento interno de un dispositivo generador de aerosol. Puede comprender un dispositivo generador de aerosol calentado eléctricamente que comprende un elemento de calentamiento interno. Puede comprender, además, en una disposición secuencial lineal, un sustrato formador de aerosol, un elemento de soporte localizado inmediatamente corriente abajo del sustrato formador de aerosol, un elemento de enfriamiento de aerosol localizado corriente abajo del elemento de soporte, y una envoltura externa que circunscribe el sustrato formador de aerosol, el elemento de soporte y el elemento de enfriamiento de aerosol. El elemento de soporte puede colindar con el sustrato formador de aerosol. El sustrato formador de aerosol es penetrable por el elemento de calentamiento del dispositivo generador de aerosol.

40 Como se usa en la presente descripción, el término "combustión" se refiere a una reacción química redox donde las moléculas reactivas, a saber el combustible y el oxidante, se mezclan y reordenan para convertirse en moléculas productos con la liberación simultánea de calor. La combustión se puede indicar positivamente por la presencia de cantidades relevantes de óxidos de nitrógeno en los productos gaseosos, no formados a partir de la descomposición de nitratos presentes en el sustrato reactivo original y la clara evidencia de un proceso exotérmico global simultáneo. La evolución de cantidades relevantes de óxidos de nitrógeno en los productos gaseosos para la combustión puede determinarse comparando las cantidades globales de óxidos de nitrógeno formados en las condiciones de interés (por ejemplo, en el aire) y óxidos de nitrógeno formados en las mismas condiciones pero en ausencia de oxígeno (por ejemplo, en una atmósfera de helio o nitrógeno puro). En otro tipo de dispositivo formador de aerosol calentado, el aerosol se produce por la transferencia de calor de un elemento combustible carburante o fuente de calor a un material formador de aerosol separado físicamente, que puede localizarse dentro, cerca o corriente abajo de la fuente de calor. Los productos de tabaco sin humo y varios materiales formadores de aerosol que contienen tabaco pueden contener tabaco en cualquier forma, que incluye partículas secas, fragmentos, gránulos, polvos, o una suspensión, depositados, mezclados, rodeados por, o combinados de cualquier otra manera con otros ingredientes en cualquier formato, tales como hojuelas, capas, lengüetas, espumas, o perlas. Como se usa en la presente descripción, el término 'humo' se usa para describir un tipo de aerosol que se produce por los artículos para fumar, tales como cigarrillos combustibles, o por combustión de un material formador de aerosol.

55 En ciertas modalidades, se prefiere calentar sin quemar o quemar el material vegetal.

60 En una modalidad, también se proporciona material vegetal curado a partir de las plantas de tabaco mutantes, transgénicas y de origen no natural descritas en la presente descripción. Los expertos en la técnica conocen los procesos de curado de las hojas verdes de tabaco e incluyen sin limitación curado al aire, curado al fuego, curado en atmósfera artificial y curado al sol. El proceso de curado de hojas verdes de tabaco depende del tipo de tabaco cosechado. Por ejemplo, la variedad Burley y ciertas cepas oscuras usualmente, se curan al aire, y el tabaco para pipa, el tabaco de mascar, y el rapé usualmente, se curan al fuego.

65 En otra modalidad, se proporciona además material vegetal secado a partir de las plantas mutantes, transgénicas y de origen no natural descritas en la presente descripción. Los expertos en la técnica conocen los procesos de secado

de hojas e incluyen, sin limitación, secado al aire y secado al sol. El proceso exacto de secado de hojas depende del tipo de planta que se cosecha. Adecuadamente, el material vegetal se seca después de la cosecha. Por lo tanto, en la presente descripción se contempla el uso de material seco y material seco posterior a la cosecha. El proceso de secado puede activar uno o más genes asociados a la senescencia. La expresión de la actividad de los genes y proteínas que se describen en la presente descripción puede monitorizarse durante el curado o secado. Asimismo, los niveles de asparagina, nicotina, glutamina, ácido aspártico y ácido glutámico se pueden monitorear durante el curado o secado. A modo de ejemplo, se pueden realizar mediciones después de 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas de curado o secado. A modo de otro ejemplo, se pueden realizar mediciones después de 0 días, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días o 10 días o más.

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

La cantidad de asparagina en la planta, parte de la planta, material vegetal, producto vegetal o producto de tabaco descritos en la presente descripción después del curado o secado (por ejemplo, 3 días de curado o secado) es de aproximadamente 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % y 100 % menor, tal como aproximadamente 200 % o 300 % menor, en comparación con la planta de control. Adecuadamente, la cantidad de asparagina en la planta, parte de la planta, material vegetal, producto vegetal o producto de tabaco descritos en la presente descripción después del curado o secado (por ejemplo, 3 días de curado o secado) es al menos aproximadamente 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % y 100 % menor, tal como aproximadamente 200 % o 300 % menor, en comparación con el control, de manera más adecuada, al menos aproximadamente 80 % menor o al menos aproximadamente 90 % menor, en comparación con el control.

La cantidad de asparagina en la planta, parte de la planta, material vegetal, producto vegetal o producto de tabaco descritos en la presente descripción después del curado o secado (por ejemplo, 3 días de curado o secado) es de aproximadamente 40 mg/g en peso seco de hojas o menos, más adecuadamente aproximadamente 35 mg/g en peso seco de hojas o menos, más adecuadamente aproximadamente 30 mg/g en peso seco de hojas o menos, más adecuadamente aproximadamente 25 mg/g en peso seco de hojas o menos, más adecuadamente aproximadamente 20 mg/g en peso seco de hojas o menos, más adecuadamente aproximadamente 15 mg/g en peso seco de hojas o menos, más adecuadamente aproximadamente 12 mg/g en peso seco de hojas o menos, más adecuadamente aproximadamente 10 mg/g en peso seco de hojas o menos, o más adecuadamente aproximadamente 5 mg/g en peso seco de hojas o menos. Adecuadamente, se cosechan las hojas de la posición media inferior de la planta.

La cantidad de acrilamida en el aerosol derivado de la planta, parte de la planta, material vegetal, producto vegetal o producto de tabaco después del curado o secado y obtenida mediante calentamiento es al menos aproximadamente 70 % menor en comparación con el control. A modo de ejemplo, la cantidad de acrilamida en el aerosol derivado del producto de tabaco después del curado o secado y obtenida mediante calentamiento es de aproximadamente 1,5 µg por cigarrillo.

La cantidad de acrilamida en el aerosol derivado de la planta, parte de la planta, material vegetal, producto vegetal o producto de tabaco después del curado o secado y obtenida mediante combustión es al menos aproximadamente 55 % menor en comparación con el control. A modo de ejemplo, la cantidad de acrilamida en el aerosol derivado del producto de tabaco después del curado o secado y obtenida mediante combustión es de aproximadamente 2,5 µg por cigarrillo.

Adecuadamente, la cantidad de acrilamida en el aerosol derivado de la planta, parte de la planta, material vegetal, producto vegetal o producto de tabaco después del curado o secado y obtenida mediante combustión o calentamiento es al menos aproximadamente 55 % a aproximadamente 70 % menor en comparación con el control. A modo de ejemplo, la cantidad de acrilamida en el aerosol derivado del producto de tabaco después del curado o secado y obtenida mediante combustión o calentamiento es de entre aproximadamente 1,5 µg por cigarrillo y 2,5 µg por cigarrillo.

La cantidad de nicotina en la planta, parte de la planta, material vegetal, producto vegetal, producto de tabaco o aerosol puede ser esencialmente igual que la cantidad de nicotina de las plantas, partes de plantas, materiales vegetales, materiales que se pueden fumar, materiales sin humo y aerosoles derivados de la planta de control. Por ejemplo, la cantidad de nicotina puede ser de aproximadamente 20 %, 15 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 % o menos de la cantidad de nicotina que está presente en la planta de control. Adecuadamente, la cantidad de nicotina es de aproximadamente 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 % o menos de la cantidad de nicotina que está presente en la planta de control. La cantidad de nicotina está típicamente entre aproximadamente 15 y 20 mg/g de peso seco de biomasa de las hojas.

En una modalidad, la cantidad de asparagina en la planta, parte de la planta, material vegetal, producto vegetal o producto de tabaco después del curado (por ejemplo, hoja moldeada curada) es al menos aproximadamente 20 % menor (por ejemplo, al menos aproximadamente 22 % menor) y la cantidad de acrilamida en el aerosol derivado de la planta, parte de la planta, material vegetal, producto vegetal o producto de tabaco después del curado (por ejemplo, hoja moldeada curada) es al menos aproximadamente 25 % menor (por ejemplo, al menos aproximadamente 24 % o menor) que el control. En otra modalidad, la cantidad de asparagina en la planta, parte de la planta, material vegetal, producto vegetal o producto de tabaco después del curado (por ejemplo, hoja moldeada curada) es de aproximadamente 12 mg/g en peso seco o menos y la cantidad de acrilamida en el aerosol derivado de la planta, parte de la planta, material vegetal, producto vegetal o producto de tabaco después del curado (por ejemplo, hoja moldeada curada) es de aproximadamente 2,5 µg/cigarrillo o menos. Adecuadamente, el nivel de nicotina es esencialmente el mismo que el nivel de nicotina en el control.

En otra modalidad, la cantidad de asparagina en la planta, parte de la planta, material vegetal, producto vegetal o producto de tabaco después del curado (por ejemplo, hoja moldeada curada) es de al menos aproximadamente 70 % menor (por ejemplo, al menos aproximadamente 66 % menor) y la cantidad de acrilamida en el aerosol derivado de la planta, parte de la planta, material vegetal, producto vegetal o producto de tabaco después del curado es de al menos aproximadamente 45 % menor (por ejemplo, al menos aproximadamente 44 % o menos) que el control. En otra modalidad, la cantidad de asparagina en la planta, parte de la planta, material vegetal, producto vegetal o producto de tabaco después del curado (por ejemplo, hoja moldeada curada) es de aproximadamente 12 mg/g en peso seco o menos y la cantidad de acrilamida en el aerosol derivado de la planta, parte de la planta, material vegetal, producto vegetal o producto de tabaco después del curado es de aproximadamente 3 µg/cigarrillo o menos. Adecuadamente, el nivel de nicotina es esencialmente el mismo que el nivel de nicotina en el control.

En otra modalidad, la cantidad de asparagina en la planta, parte de la planta, material vegetal, producto vegetal o producto de tabaco después del curado (por ejemplo, hoja moldeada curada) es de al menos aproximadamente 90 % menor (por ejemplo, al menos aproximadamente 88 % o menor) y la cantidad de acrilamida en el aerosol derivado de la planta, parte de la planta, material vegetal, producto vegetal o producto de tabaco después del curado es de al menos aproximadamente 70 % menor que el control. En otra modalidad, la cantidad de asparagina en la planta, parte de la planta, material vegetal, producto vegetal o producto de tabaco después del curado (por ejemplo, hoja moldeada curada) es de aproximadamente 5 mg/g en peso seco o menos y la cantidad de acrilamida en el aerosol derivado de la planta, parte de la planta, material vegetal, producto vegetal o producto de tabaco después del curado es de aproximadamente 1,5 µg/cigarrillo o menos. Adecuadamente, el nivel de nicotina es esencialmente el mismo que el nivel de nicotina en el control.

En otra modalidad, la modulación de la expresión de *NtASN1* mediante ARNi puede: (i) reducir la cantidad de asparagina en la planta, parte de la planta, material vegetal, producto vegetal o producto de tabaco después del curado o secado (por ejemplo, hoja moldeada curada) entre 24 % y aproximadamente 89 % (por ejemplo, entre aproximadamente 35 mg/g a aproximadamente 5 mg/g); (ii) mantener el nivel de nicotina a aproximadamente 20 %, 15 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 % o menos de la cantidad de nicotina que está presente en la planta de control (por ejemplo, a aproximadamente 15 y 20 mg/g en peso seco de biomasa de las hojas) y (iii) reducir el nivel de acrilamida en aerosol en al menos aproximadamente 70 % a 1,5 3 µg/cigarrillo o menos. La cantidad de biomasa de las hojas está generalmente entre aproximadamente 300-400 g.

En otra modalidad, la modulación de la expresión de *NtASN5* mediante ARNi puede: (i) reducir la cantidad de asparagina en la planta, parte de la planta, material vegetal, producto vegetal o producto de tabaco después del curado o secado (por ejemplo, hoja moldeada curada) entre aproximadamente 35 % y aproximadamente 66 % (por ejemplo, entre aproximadamente 31 mg/g a aproximadamente 18 mg/g); (ii) mantener el nivel de nicotina a aproximadamente 20 %, 15 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 % o menos de la cantidad de nicotina que está presente en la planta de control (por ejemplo, a aproximadamente 15 y 20 mg/g en peso seco de biomasa de las hojas) y (iii) reducir el nivel de acrilamida en aerosol en al menos aproximadamente 44 % a aproximadamente 3 µg/cigarrillo o menos. La cantidad de biomasa de las hojas está generalmente entre aproximadamente 300-400 g.

En otra modalidad, la modulación de la expresión de *NtASN1* mediante mutagénesis puede: (i) reducir la cantidad de asparagina en la planta, parte de la planta, material vegetal, producto vegetal o producto de tabaco después del curado o secado (por ejemplo, hoja moldeada curada) entre aproximadamente 17 % y aproximadamente 83 % (por ejemplo, entre aproximadamente 19,4 mg/g a aproximadamente 4,7 mg/g); y (iii) reducir el nivel de acrilamida en aerosol en al menos aproximadamente 24 % a aproximadamente 2,5 µg/cigarrillo o menos.

En otra modalidad, la modulación de la expresión de *NtASN5* mediante mutagénesis puede reducir la cantidad de asparagina en la planta, parte de la planta, material vegetal, producto vegetal o producto de tabaco después del curado o secado (por ejemplo, hoja moldeada curada) entre aproximadamente 44 % (por ejemplo, a aproximadamente 14,5 mg/g). Las plantas mutantes, de origen no natural o transgénicas pueden tener otros usos, por ejemplo, en la agricultura. Por ejemplo, las plantas mutantes, de origen no natural o transgénicas descritas en la presente descripción pueden usarse para fabricar alimentación animal y productos para la alimentación humana.

- La descripción proporciona, además, métodos para producir semillas que comprenden cultivar la planta mutante, planta de origen no natural, o planta transgénica descrita en la presente descripción, y recolectar las semillas de las plantas cultivadas. Las semillas de las plantas que se describen en la presente descripción pueden acondicionarse y empacarse en material de empaque por medios conocidos en la técnica para formar un artículo de fabricación. Los materiales de empaque tales como papel y tela se conocen bien en la técnica. Un empaque de semilla puede tener una etiqueta, por ejemplo, un marcador o etiqueta asegurado al material de empaque, una etiqueta impresa en el empaque que describe la naturaleza de las semillas en el mismo.
- Las composiciones, métodos y kits para genotipar las plantas para la identificación, selección o mejoramiento pueden comprender un medio para detectar la presencia de un polinucleótido (o una de sus combinaciones como se describe en la presente descripción) en una muestra de polinucleótido. En consecuencia, se describe una composición que comprende uno de más cebadores para amplificar específicamente al menos una porción de uno o más de los polinucleótidos y opcionalmente una o más sondas y opcionalmente uno o más reactivos para llevar a cabo la amplificación o detección.
- En consecuencia, se describen cebadores o sondas de oligonucleótidos específicos de genes que comprenden aproximadamente 10 o más polinucleótidos contiguos que corresponden al (a los) polinucleótido(s) descrito(s) en la presente descripción. Dichos cebadores o sondas pueden comprender o consistir en aproximadamente 15, 20, 25, 30, 40, 45 o 50 más polinucleótidos contiguos que hibridan (por ejemplo, hibridan específicamente) con el(los) polinucleótido(s) descrito(s) en la presente descripción. En algunas modalidades, los cebadores o sondas pueden comprender o consistir en aproximadamente 10 a 50 nucleótidos contiguos, aproximadamente 10 a 40 nucleótidos contiguos, aproximadamente 10 a 30 nucleótidos contiguos o aproximadamente 15 a 30 nucleótidos contiguos que pueden usarse en los métodos dependientes de secuencias para la identificación de genes (por ejemplo, hibridación Southern) o aislamiento (por ejemplo, hibridación *in situ* de colonias bacterianas o placas de bacteriófagos) o detección de genes (por ejemplo, como uno o más cebadores de amplificación en la amplificación o detección de ácidos nucleicos). El uno o más cebadores o sondas específicos pueden diseñarse y usarse para amplificar o detectar una parte o la totalidad del(de los) polinucleótido(s). A manera de ejemplo específico, pueden usarse dos cebadores en un protocolo de reacción en cadena de la polimerasa para amplificar un fragmento de ácido nucleico que codifica un ácido nucleico, tal como ADN o ARN. La reacción en cadena de la polimerasa puede realizarse, además, mediante el uso de un cebador que se deriva de una secuencia de ácido nucleico y un segundo cebador que hibrida con la secuencia corriente arriba o corriente abajo de la secuencia de ácido nucleico, tal como una secuencia promotora, el extremo 3' del precursor de ARNm o una secuencia derivada de un vector. Ejemplos de técnicas térmicas e isotérmicas útiles para la amplificación de polinucleótidos *in vitro* se conocen bien en la técnica. La muestra puede ser o puede derivarse de una planta, una célula vegetal o material vegetal o un producto de tabaco fabricado o derivado de la planta, la célula vegetal o el material vegetal como se describe en la presente descripción.
- En un aspecto adicional, se proporciona, además, un método para detectar un(os) polinucleótido(s) descrito(s) en la presente descripción (o cualquiera de sus combinaciones como se describe en la presente descripción) en una muestra que comprende la etapa de: (a) proporcionar una muestra que comprende, o se sospecha que comprende, un polinucleótido; (b) poner en contacto dicha muestra con uno de más cebadores o una o más sondas para detectar específicamente al menos una porción del(de los) polinucleótido(s); y (c) detectar la presencia de un producto de amplificación, en donde la presencia de un producto de amplificación es indicativo de la presencia del(de los) polinucleótido(s) en la muestra. En un aspecto adicional, se proporciona además el uso de uno de más cebadores o sondas para detectar específicamente al menos una porción del(de los) polinucleótido(s). Además, se proporcionan kits para detectar al menos una porción del(de los) polinucleótido(s), los cuales comprenden uno de más cebadores o sondas para detectar específicamente al menos una porción del(de los) polinucleótido(s). El kit puede comprender reactivos para la amplificación de polinucleótidos, tales como PCR, o reactivos para la tecnología de detección por hibridación de sondas, tales como membranas de Southern, membranas de Northern, hibridación *in situ*, o micromatriz. El kit puede comprender reactivos para la tecnología de detección por unión de anticuerpos tal como membrana de Western, ELISA, espectrometría de masas SELDI o tiras de pruebas. El kit puede comprender reactivos para la secuenciación de ADN. El kit puede comprender reactivos e instrucciones para determinar al menos el contenido de asparagina y/o el contenido de acrilamida de aerosol en el material vegetal, material vegetal curado o secado u hojas curadas o secadas.
- En algunas modalidades, un kit puede comprender instrucciones para uno o más de los métodos descritos. Los kits descritos pueden ser útiles para la determinación de la identidad genética, estudios filogenéticos, determinación del genotipo, determinación del haplotipo, análisis de la genealogía o mejoramiento de plantas particularmente con puntuación codominante.
- La presente descripción proporciona además un método para genotipar una planta, una célula vegetal o material vegetal que comprende un polinucleótido como se describe en la presente descripción. El genotipado proporciona un medio para distinguir homólogos de un par cromosómico y puede usarse para diferenciar segregantes en una población de plantas. Los métodos de marcadores moleculares pueden usarse para estudios filogenéticos, caracterización de relaciones genéticas entre variedades de cultivo, identificación de cruces o híbridos somáticos, localización de segmentos cromosómicos que afectan rasgos monogénicos, clonación basada en mapas, y el estudio de herencia cuantitativa. El método específico de genotipado puede emplear cualquier número de técnicas analíticas

de marcadores moleculares lo que incluye polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP). Los AFLP son el producto de diferencias alélicas entre los fragmentos amplificados causadas por la variabilidad de secuencias de nucleótidos. Así, la presente descripción proporciona adicionalmente un medio para seguir la segregación de uno o más genes o ácidos nucleicos así como secuencias cromosómicas genéticamente unidas a estos genes o ácidos nucleicos mediante el uso de tales técnicas como el análisis de AFLP.

En una modalidad, se proporciona además material vegetal curado o secado a partir de las plantas mutantes, transgénicas y de origen no natural descritas en la presente descripción. Por ejemplo, los procesos de curado o secado de hojas de tabaco se conocen por los expertos en el campo e incluyen sin limitación curado al aire, curado al fuego, curado en atmósfera artificial y curado al sol. El proceso de curado de hojas verdes de tabaco depende del tipo de tabaco que se cosechó como se describe en la presente descripción.

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

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

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

Ejemplos

Ejemplo 1: Síntesis de asparagina en hojas de tabaco curadas

Durante el curado de la hoja de tabaco y especialmente la hoja de los cultivares Burley, la asparagina se produce de manera activa contribuyendo a aproximadamente el 50 % del total de aminoácidos presentes en las hojas curadas. En la Figura 1, se muestra el aumento de asparagina y aminoácidos libres totales, lo que es resultado principalmente del aumento de asparagina, en hojas curadas de tres cultivares de tabaco Burley cultivados y curados al aire en paralelo en el mismo campo y granero. Sorprendentemente, la asparagina es el único aminoácido que se acumula notablemente durante el curado. Si se considera que la asparagina se sintetiza durante la fase temprana del curado, entonces la reacción depende de las actividades de asparagina sintetasa que usan glutamina y aspartato como sustrato. Sin embargo, en la Figura 1, Asp y Gln solo muestran un pequeño aumento en comparación con la asparagina, sugiriendo así que los grupos de Gln y Asp probablemente varían durante el largo proceso de curado al aire (>2 meses). No se observó variación en el grupo de glutamato (datos no mostrados).

Figura 2 indica que Gln aumenta durante los primeros 4 días de curado (96 h) y después se reduce al principio de la acumulación de asparagina. Por el contrario, el grupo de aspartato sigue siendo principalmente plano, aunque se puede observar cierta fluctuación. Sin pretender limitarse por ninguna teoría en particular, el grupo de glutamina observado podría servir como sustrato para que la(s) asparagina sintetasa(s) genere(n) asparagina durante los primeros 4-5 días de curado (véase la Figura 3).

Como se mencionó anteriormente, la acumulación de asparagina observada durante el curado podría ser el resultado de una actividad específica de asparagina sintetasa inducida por la senescencia. Una vez calentados o quemados, la asparagina y los azúcares reducidos tienen el potencial de generar acrilamida en aerosol mediante una reacción de Maillard. Existe una buena correlación entre la asparagina acumulada en la hoja de tabaco curada o mezclas de tabaco y la acrilamida medida en aerosol (véase la Figura 4). Sin pretender estar limitados por ninguna teoría en particular, esto sugiere que el aumento de acrilamida en el aerosol depende estrictamente de la presencia de asparagina. Además, la presencia de asparagina en los tejidos foliares también se relaciona con el proceso de curado usado, como se indica en la Figura 5.

Ejemplo 2: Genes de asparagina sintetasa en tabaco

6 genes de asparagina sintetasa de longitud completa se identifican en tabaco y se denominan *NtASN1-S*, *NtASN1-T*, *NtASN3-S*, *NtASN3-T*, *NtASN5-S* y *NtASN5-T*. De manera interesante, *Arabidopsis* tiene 3 genes relacionados con la asparagina sintetasa *AtASN1*, *AtASN2* and *AtASN3* y el tomate solo 2 genes de longitud completa (*Solyc06g007180* y *Solyc04g055200*). Los análisis filogenéticos que usan las secuencias de proteínas putativas derivadas de secuencias

- genómicas extraídas del genoma de tabaco (Sierro y otros, 2014) sugieren que durante la evolución se obtuvieron dos grupos de asparagina sintetasas (véase la Figura 6). De hecho, un grupo que comprende Solyc04g055200, AtASN2 y 3 está cerca de NtASN3-S y NtASN3-T. El producto génico de AtASN2 que corresponde a este grupo se ubica en el floema y es aparentemente esencial para la asimilación, distribución y removilización de nitrógeno en los tejidos verdes (Gaufichon y otros, 2013 Plant Cell Environ. Feb;36(2):328-42). Este grupo pertenece a la subclase de dicotiledóneas de la clase II. El segundo grupo que incluye Solyc06g007180, AtASN1, NtASN1-S, NtASN1-T, NtASN5-S y NtASN5-T pertenece a la subclase de dicotiledóneas de la clase I (Gaufichon y otros, 2010 Ann Bot. 2010 Jun;105(7):1141-57). La sobreexpresión de AtASN1 contribuye a un aumento del contenido de asparagina en flores y siliquas en desarrollo y a una elevación del contenido de proteína en las semillas, lo que evidencia así un mejor transporte de asparagina desde la fuente a los tejidos objetivo. Esto sugiere que el grupo de AtASN1 está más dedicado a la translocación de la fuente de nitrógeno hacia las semillas para permitir una germinación adecuada de las semillas y alta tolerancia de las plántulas al sustrato limitante de nitrógeno (Lam y otros, 2003 Plant Physiol. 2003 Jun;132(2):926-35).
- El porcentaje de identidad entre los productos génicos reveló que NtASN3-S y NtASN3-T son idénticos y muy cercanos a Solyc04g055200 y AtASN3 (85 % de identidad), lo que sugiere que este grupo de genes se conservó relativamente bien durante la evolución, probablemente para mantener la asimilación de nitrógeno en tejidos vegetativos (véase anteriormente). Es interesante que cada copia de proteína deducida de *N. sylvestris* y *N. tomentosiformis* de NtASN1-S/NtASN1-T, y NtASN5-S/NtASN5-T comparten un alto porcentaje de identidad cercano al 98 %. Esto sugiere que la función génica de ambas copias de ASN1 y ASN5 probablemente se conserva entre cada ancestro de tabaco y probablemente deriva de un único ancestro común como se encuentra en tomate y *Arabidopsis*. Además, NtASN5-S comparte 95 % de identidad con Solyc06g007180, lo que sugiere una función similar.
- Al saber que la asparagina aumenta rápidamente durante el proceso de curado al aire del tabaco Burley, la producción de asparagina durante la fase temprana del curado (véase la Figura 1 y Figura 2) puede no resultar directamente de la degradación proteolítica de proteínas y polipéptidos sino de la síntesis de novo durante el curado. De ser así, y como se menciona anteriormente, la síntesis de asparagina solo puede originarse de asparagina sintetasa(s) activa(s).
- Para determinar la expresión de los genes de asparagina sintetasa durante el curado, se analizan los datos recogidos de los análisis de micromatriz mediante el uso de chips de genes de Tobarray Affymetrix (Martin y otros, *BMC Genomics* 2012, 13:674). Los ARN de hojas se aislan con el transcurso del tiempo durante las primeras 96 h de curado. Se identifican sondas específicas (100 % de identidad) que coinciden con las seis secuencias codificantes de ASN (NtPMIa1g47375e1_st para ASN1-T; NtPMIa1g31395e1_st para ASN1-S; NtPMIa1g25255e1_st para ASN5-T; NtPMIa1g57337e1_st para ASN5-S; NtPMIa1g152348e1_st para ASN3-T y NtPMIa1g121582e1_st para ASN3-S).
- Para la preparación del ARN, se recogen hojas en una posición de tallo medio de Stella (CH-Burley) directamente en el campo (-4 h), donde el tiempo 0 es el momento en que las hojas se cuelgan en un granero de curado al aire. ASN3-S y ASN3-T solo se expresan muy poco en hojas de Burley durante el curado al aire. Por el contrario, ASN1-S, ASN1-T y ASN5-S se expresan mucho al comienzo del curado (senescencia, fase de amarillamiento), mientras que ASN5-T se regula positivamente justo después de la cosecha y después se reduce constantemente durante las primeras 96 h de curado (Figura 7).
- Para controlar cualquier hibridación cruzada que pueda ocurrir en los análisis de micromatriz particularmente para genes que comparten alta homología de secuencia, se analiza la expresión de ASN1-S/T y ASN5-S/T mediante el uso de tecnología de RNAseq. Los datos se presentan en la Figura 8. En Swiss Burley "Stella" (Figura 8A), los datos de RNA-seq confirman que ASN5-T se induce menos durante el curado que las otras tres copias de ASN1/5 (véase la Figura 7), donde ASN1-T es el gen que se expresa más intensamente después de dos días de curado al aire. Esta actividad genética de ASN no ocurre con intensidad similar en Swiss bright Virginia "ITB 683" curado clásicamente en un horno. En este tabaco, la expresión de ASN1-S/T y ASN5-S/T permanece baja después de 48 h de curado. En ambos tabacos, el curado no induce la expresión de ASN3S/T (Figura 8C y D), lo que confirma los datos de Affymetrix presentados en la Figura 7.
- Para evaluar la solidez de la inducción de genes ASN durante la fase temprana del curado de Burley, se aísla el ARN de hojas antes y después de 60 h de curado en un granero de cuatro accesos diferentes de Burley (BU1-4: Saplack, BanketA1, Stella y TN90) cultivados de manera simultánea en un campo suizo (2013). El punto temporal para aislar ARN se extiende a 60 h, debido a que TN90 necesita más tiempo para comenzar el amarillamiento en Suiza. Los datos de expresión (Figura 9A) muestran que en todas las hojas de Burley, ASN1-T y ASN5-T son nuevamente los genes de ASN más y menos expresados durante el curado al aire (excepto por ASN1-T en BU2), respectivamente, lo que confirma los datos presentados en la Figura 8. Los transcriptos de ASN1-S y ASN5-S se expresan de manera constante y sólida durante la fase temprana del curado en las hojas de los diferentes accesos de Burley. Figura 9B confirma que ninguna de las dos copias de ASN3 que se originan de *N. tomentosiformis* y *N. sylvestris* se induce durante el curado, lo que confirma indirectamente que estas dos copias que están más cerca de AtASN2 (véase la Figura 6) probablemente tengan una función más basal en tejidos de plantas vegetativas para mantener los grupos fisiológicos de asparagina.
- Los análisis de los transcriptos correspondientes en 8 tejidos recogidos de plantas TN90 en la etapa de floración y cultivados en el campo sugieren que ASN5-T es más activo en las flores que en las hojas, donde las copias de ARN

de ASN5-T se encuentran particularmente en flores inmaduras, pétalos y sépalos (véase la Figura 10, panel izquierdo). Además de expresarse en las hojas, ASN1-T y ASN1-S también se expresan fuertemente en los pétalos posiblemente para asimilar el nitrato que es una función que ya se describió en *Arabidopsis* (Lam y otros, 2003 Plant Physiol. 2003 Jun;132(2):926-35) para el gen ortólogo *AtASN1* (véase la Figura 6). ASN3-S/T tienen baja expresión basal en estos 5 tejidos (véase la Figura 10, panel derecho).

Ejemplo 3: Líneas TN90e3 con ARNi-ASN1 y ASN5

El silenciamiento de las copias de ASN1-S/ASN1-T y ASN5-S/ASN5-T en plantas de tabaco Burley se investiga para 10 determinar si contribuye a reducir la asparagina en las hojas de Burley curadas. Se clonian fragmentos de ADN específicos entre el promotor de MMV (virus del mosaico de Mirabilis) constitutivo fuerte o el promotor de senescencia de E4 (asparagina sintetasa). El fragmento del gen de ASN está flanqueado entre MMV o E4 y la secuencia de terminación en 3' nos del gen de nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens* (Cheng y otros, 2003 In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 39 595 604). Un diagrama de los constructos usados en este estudio se muestra en 15 la Figura 22. La línea de tabaco Burley TN90e4e5e10 (Zyvert) se transforma individualmente con cada uno de los cinco constructos mediante el uso de protocolos de transformación mediados por Agrobacterium. TN90e4e5e10 (Zyvert) representa una selección de una población de burley mutagenizada con etilmelano sulfonato (EMS) que contiene mutaciones de inactivación en CYP82E4, CYP82E5v2 y CYP82E10, los genes de asparagina sintetasa principales del tabaco (Lewis y otros, 2010), para evitar la producción de nornicotina. El uso de esta línea de fondo 20 puede evitar las posibles complicaciones al interpretar los futuros datos de TSNA.

Para permitir la selección de plantas que expresan los transgenes respectivos a un alto nivel, al menos 10 plantas T0 independientes para cada constructo se sometieron a ensayo por qPCR. Se cosechan las semillas de las tres líneas T0 de cada constructo que muestran los mayores niveles de eventos de silenciamiento de ASN. Para evaluar si la progenie de T1 que heredó el(s) fragmento(s) de genes de ARNi realizan un silenciamiento génico eficaz, se extrae ARN de 4 plantas de eventos de transformación independiente seleccionados para obtener semillas T2 disponibles para futuras pruebas de campo (2016). Las líneas de control TN90e4e5e10 (Zyvert) se usan como fondo para 25 comparar la eficacia de la transformación.

Se seleccionan tres eventos de transformación independiente en plantas T0 ARNi-ASN1 y ARNi-ASN5 en función del 30 nivel de los transcriptos de ASN1 y ASN5. Se generan plantas ARNi-ASN1 para silenciar las copias de ASN1-T y ASN1-S bajo el control del promotor de MMV o el promotor de E4 y se generan plantas ARNi-ASN5 para silenciar las copias de ASN5-T y ASN5-S bajo el control del promotor de MMV o el promotor de E4. Se seleccionan quince plantas con kanamicina para cada evento de transformación y se cultivan en el invernadero. Una vez maduras, se recogen cuatro 35 hojas en la posición media inferior para cada planta y se someten a curado al aire durante 7 semanas.

Las concentraciones de aminoácidos y nicotina se determinan mediante HPLC-MS: Se extraen aliquotas (~30 mg) de tabaco molido con etanol-agua (1:1; 6 ml) durante 45 minutos a 50 °C. Los extractos centrifugados se diluyen 10 veces. 40 Se realiza separación por cromatografía líquida en una columna de amida (amida Waters Acuity BEH, 2,1 x 150 mm, 1,7 µm) a 45 °C eluyendo con un gradiente de formato de amonio 2 mM en agua + 0,25 % de ácido fórmico (eluyente A) y acetonitrilo + 0,1 % de ácido fórmico (eluyente B), aplicando un gradiente de elución (0 min – 10 % de A, 0,5 min – 10 % de A, 4 min – 60 % de A, 4,5 min – 60 % de A, 4,6 min – 10 % de A, 6,8 min – 10 % de A; flujo 0,5 ml/min). Para la detección espectrométrica de masas de los aminoácidos, se usa un instrumento Q Exactive (Thermo Scientific) en modo de electropulverización positiva que adquiere los espectros de masas con barrido completo. Las 45 concentraciones de nicotina en los extractos se calculan a partir de su área máxima en la traza de 260 nm de un detector UV/VIS con fotodiodos.

La asparagina se mide en la lámina de hoja curada. Después de 3 días de curado durante la fase de amarillamiento, 50 se extrae una perforación de la lámina, se aísla el ARN de cada planta y se realiza qPCR. En la Figura 11A, se muestra que el fragmento del gen de ARNi de ASN1 bajo el control de ambos promotores de MMV y E4 afecta el nivel de asparagina en las muestras de hojas curadas y la cantidad de asparagina varía en diferentes eventos de transformación. E284-4 mostró una reducción de asparagina del 24 %, mientras que E284-6 presentó 89 % de reducción de asparagina en comparación con las plantas de fondo TN90e4e5e10 (Zyvert) cultivadas en paralelo. El contenido de asparagina se correlaciona con el nivel de ARN de ASN1 medido después de 3 días de curado para 55 ambos promotores de MMV o E4 (Figura 11B), lo que confirma que la asparagina se sintetiza durante el curado y que las copias de ASN1-T y/o ASN1-S están implicadas en la producción de asparagina durante la fase temprana de curado. Tanto un promotor constitutivo, como MMV, como un promotor de la senescencia, como E4, son activos para silenciar ASN1. La eficacia del promotor E4 evidencia que los genes de ASN1 son principalmente activos durante la senescencia (amarillamiento), lo que contribuye a la producción de asparagina en la hoja curada, probablemente para 60 la redistribución de nitrógeno de hojas fuente a las semillas. Después de tres días de curado, en paralelo a los análisis de transcripción, también se mide la asparagina, lo que ya muestra perfiles de reducción de asparagina similares para las 6 líneas evaluadas, aunque aproximadamente solo un tercio de este aminoácido se sintetizó después de este período de curado (16,4 mg/g en el TN90e4e5e10 de control (Zyvert), no se muestran los datos), este pico de asparagina llega al máximo después de 9-10 días de curado al aire después de la cosecha de las hojas (véase la 65 Figura 2).

La asparagina sintetasa transfiere el grupo amina de la glutamina (Gln), el primer aminoácido que fija el amoniaco como la forma de nitrógeno asimilada a partir del almacenamientos de nitrato en las hojas, a aspartato (Asp). Esta actividad que usa ATP resulta en la formación de asparagina (asparagina) y glutamato (Glu, véase también la Figura 3). Consecuentemente, se puede especular que el silenciamiento de ASN1 resultará en un aumento de Gln y Asp y una reducción de Glu.

Por lo tanto, en las mismas muestras también se analiza la cantidad de Gln, Asp, Glu y nicotina. Se observa un aumento concomitante de Gln en las muestras que presentan una fuerte reducción de asparagina, es decir, E281-6 y E282-1 y por el contrario, una menor cantidad de Gln en las muestras que presentan bajo contenido de asparagina es decir, E282-7 (Figura 12A). Para Gln y asparagina, el equilibrio de aminoácidos que da como resultado del silenciamiento de los genes de ASN1 se modifica de forma opuesta dentro de las hojas curadas. También se observa un efecto similar para Asp y Glu, pero menos marcado que para Gln. Tanto Asp como Glu muestran un aumento (~1,5-3x) en todas las líneas transformadas que presentan perfiles de Gln similares (excepto para Asp en E282-7). En cuanto a la actividad de la asparagina sintetasa (véase la Figura 3), no se esperaba un aumento de Glu.

El contenido de nicotina no se afecta por el silenciamiento de ASN1 ni en los constructos de MMV ni en los constructos de E4, lo que confirma que la actividad de ASN1-S y/o ASN1-T no se relaciona con la vía de la síntesis de nicotina y se restringe a la maduración de la hoja después de la cosecha durante el programa de senescencia temprana.

Se realiza un experimento similar para silenciar ASN5-S y ASN5-T mediante el uso de líneas transgénicas de ARNi. Los datos muestran que la asparagina se reduce de manera eficaz especialmente en dos líneas cuando el fragmento de ARNi de ASN5 se expresa bajo el control del promotor constitutivo de MMV, y no bajo el control del promotor de E4, o solo ligeramente (Figura 13A). De manera interesante, los datos solo se correlacionan parcialmente con el nivel de ARNm de ASN5 estimado por qPCR después de 3 días de curado (Figura 13B). En primer lugar, los eventos transformantes bajo el control del promotor de E4 muestran un ARNm de ASN5 más abundante que bajo el control de MMV, lo que confirma que el promotor de E4 es menos eficaz que el promotor de MMV para silenciar ASN5, lo que posiblemente indica que el programa de síntesis de proteína ASN5 ocurre más rápido y antes que la producción de la proteína ASN1 después de la cosecha de la hoja (Figura 7). En determinadas líneas, el porcentaje de asparagina no se correlaciona con el nivel de ARNm, compare, por ejemplo, E303-14 con E303-16 o E305-5 con E305-15. Esto puede deberse al hecho de que la copia de ASN5-T participa en actividades que no están presentes o solo un poco presentes en la hoja curada (Figura 9) sino dentro de los tejidos de floración (Figura 10). Después de tres días del curado, también se mide la asparagina, lo que muestra perfiles de reducción de asparagina similares para las 6 líneas (no se muestran los datos) como para las líneas transgénicas de ASN1 (véase el texto anterior).

La cantidad de Gln, Asp, Glu y nicotina también se mide en las líneas de ARNi-ASN5 (Figura 14). En las líneas de ARNi-ASN1, se observó un aumento concomitante de Gln en las muestras que presentan una fuerte reducción de asparagina, es decir, E303-1 y E303-16 y por el contrario, una menor cantidad de Gln en las muestras que presentan un mayor contenido de asparagina, es decir, E303-14 y E305-16. E305-5 muestra una reducción de asparagina menor que 10 % y un aumento de Gln, Asp y Glu en comparación con el control y las líneas hermanas E305-15 y E305-16, lo que sugiere que en determinados casos, el promotor de E4 puede silenciar parcialmente las copias de ASN5. La línea E303-1 muestra la mayor reducción de ARNm (Figura 13B), una fuerte reducción de asparagina (66 %, Figura 13A) y un aumento relevante de Gln (14x), Asp (3x) y Glu (3x) en comparación con el control (Figura 14A, B y C). Por lo tanto, en lo que respecta a las plantas ARNi-ASN1, el silenciamiento de ASN5 resulta en una reducción marcada de asparagina y un aumento de Gln, Asp y Glu. El nivel de nicotina no varía en las plantas ARNi-ASN5 (Figura 14D), como se observa para las líneas de ARNi-ASN1, lo que sugiere que la reacción está desconectada de la vía de la nicotina.

Las hojas en la posición de tallo medio se pesan en cada evento de transformación y las líneas de control. Los datos no muestran una gran variación en la biomasa de las hojas, cuando las plantas ARNi-ASN1 y ASN5 se cultivan en un ambiente controlado como el invernadero (Figura 15).

En conclusión, ambas familias de genes de ASN1 y ASN5 se silencian en las líneas de ARNi de MMV correspondientes, lo que indica de esta manera que las copias de genes de ASN1 y ASN5 están implicadas en la síntesis de asparagina durante el curado de Burley.

Se realizan análisis de qPCR cruzada para determinar si ambas familias de transcritos de ASN1 y ASN5 están silenciadas en las plantas ARNi-ASN1 y ARNi-ASN5 correspondientes controladas por el promotor de MMV. En la Tabla 2, los datos muestran que en las plantas ARNi-ASN5 ambos transcritos de ASN1 y ASN5 están silenciadas, pero esto es menos evidente en las plantas ARNi-ASN1, particularmente para las líneas ASN1-1 y ASN1-2. Esta observación probablemente se deba al hecho de que ambos genes ASN5 y ASN1 (S y T) son muy similares, ya que pertenecen al mismo grupo de genes (Figura 6). Sin embargo, esto también puede indicar que es suficiente solo inactivar el grupo de genes ASN1 para alterar la síntesis de asparagina en las hojas curadas.

El análisis de la expresión de CYP82E4 durante el curado de Burley indica que el promotor de E4 se vuelve completamente activo solo después de 48 h de curado, sugiriendo así que todos los constructos transgénicos o fragmentos génicos bajo el control del promotor de E4 se expresan tardíamente en la fase de curado temprano (>48

h). Por lo tanto, en función de los datos presentados en la Figura 11 y la Figura 13, se predice que ASN1-T y -S se activan más tarde durante la primera fase del proceso de curado, debido a que el silenciamiento de ASN1 puede ser llevarse a cabo igualmente por los promotores de MMV y E4. El promotor de E4 controla débilmente el silenciamiento de ASN5, lo que sugiere que los genes de ASN1 son controlados por una secuencia de eventos relacionados con la inducción del programa de senescencia de las hojas.

5 Ejemplo 4: Líneas variantes de ASN (mutante con EMS)

10 Se identifican mutantes de ASN con EMS para las dos copias de ASN1-S y -T y las dos copias de ASN5-S y -T. Las mutaciones específicas se tamizan en el ADN genómico en las secuencias de exones predichas. Se identifican tres mutaciones de parada en las copias de ASN1-S (ASN1-S_W156*), ASN1-T (ASN1-T_W156*) y ASN5-S (ASN5-S_Q66*), pero no en la copia de ASN5-T. Dado que se identifican mutaciones que no son de parada en ASN5-T, se selecciona una mutación que no es de parada que muestra una puntuación SIFT de 0,0004 como un posible candidato que pudiera sustituir un codón de parada (ASN5-T_G59D).

15 De los parentales M2, las semillas de la descendencia con mutaciones (variantes) o que no están mutadas en los genes seleccionados (segregantes no transformados WT) se someten a genotipado, se identifican y plantan en el campo. Se cultivan 10 plantas de cada variante seleccionada al lado de 10 plantas de su segregante no transformado WT correspondiente en parcelas individuales para evitar cualquier impacto de la variabilidad del campo (es decir, fertilización no homogénea de nitrato y variación del suelo). Se recogen cuatro hojas del tallo medio inferior en el momento de la cosecha y se cuelgan en cuerdas durante 2 meses en un granero de curado al aire. Se retiran las hojas y se muelen las láminas hasta obtener un polvo fino. Se determina la asparagina (mg/g) en cada grupo de hojas. Aunque se pueden observar algunas variaciones debido a la variabilidad entre parcelas, hay una clara tendencia a la reducción de asparagina en ASN1-S_W156*, ASN1-T_W156* y ASN5-S_Q66* en comparación con sus segregantes WT correspondientes, pero no para ASN5-T_G59D (véase la Tabla 3).

20 30 35 El porcentaje de la reducción de asparagina se muestra en la Figura 17. La mayor reducción se observa para ASN1-T_W156* (83 %), después para ASN5-S_Q66* (44 %) y finalmente para ASN1-S_W156* (17 %). La línea ASN5-T_G59D mostró un leve aumento en la asparagina. El contenido de asparagina en las variantes de ASN se correlaciona con el nivel de activación génica durante el curado. De hecho, ASN1-T se expresa más durante el curado que ASN5-S y ASN1-S después de 48 h y 60 h de curado (véase la Figura 8 y la Figura 9). Sin embargo, esta observación debería tomarse con cuidado, debido a que los datos para ASN1-T_W156* resulta solo de una parcela en el campo y tanto ASN1-T_W156* como las plantas segregantes no transformadas WT para esta línea presentaron una fuerte reducción de la biomasa en este experimento de campo (véase la Figura 18).

40 45 50 55 60 La reducción de biomasa en ASN1-T_W156* y sus segregantes no transformados WT correspondientes ASN1-T_WT* probablemente resulte de otra(s) mutación(es) que sigue(n) presente(s) en ambas líneas variantes. De hecho, los experimentos transgénicos con las líneas de ARNi-ASN1/5 tienden a indicar que ASN1-T y cualquier otra copia de ASN1 y ASN5 no afectan el fenotipo de la altura y la biomasa de la planta (véase la Figura 15). Los cruzamientos con la variedad de fondo AA37 y la posterior autofertilización de la planta nos permitirán concluir acerca de cualquier efecto de la mutación de parada de ASN1-T en el tamaño de la planta. La Figura 18 también muestra que las mutaciones de parada en ASN1-S y ASN5-S no tienen impacto sobre la biomasa de la planta. Esto también es válido para la mutación puntual G59D en ASN5-T, lo que probablemente esté de conformidad con los datos de expresión (Figura 7 y Figura 8) preferencialmente implicados en otros tejidos, como la flor (véase la Figura 10).

Se realiza una segunda prueba de campo con mutantes de parada similares para ASN1-T (6 parcelas que incluyen 10 plantas no segregantes y 10 plantas con mutación de parada), ASN1-S (6 parcelas que incluyen 10 plantas no segregantes y 10 plantas con mutación de parada) y ASN5-S (9 parcelas que incluyen 10 plantas no segregantes y 10 plantas con mutación de parada). Después del curado de hojas (6 hojas en una posición de tallo media), las plantas con mutación de parada ASN1-T presentan una reducción de asparagina de 19 % en comparación con los no segregantes en la lámina de la hoja, las plantas con mutación de parada ASN1-S presentan una reducción de asparagina de 23 % en comparación con los no segregantes en la lámina de la hoja y por último, las plantas con mutaciones de parada ASN5-S presentan una reducción de asparagina de aproximadamente 10 % en comparación con los no segregantes en la lámina de las hojas. Estos resultados confirman los resultados anteriores mostrados en la Tabla 3, lo que evidencia que las mutaciones de parada seleccionadas son eficaces para reducir la asparagina en las hojas curadas. Al compararse con los datos de asparagina de las líneas de ARNi-ASN, la combinación de los tres mutantes de parada ASN1-T_W156*, ASN1-S_W156* y ASN5-S_Q66*, debería proporcionar una reducción de asparagina similar en la lámina de las hojas curadas.

65 Se concluye a partir de estos datos que ASN1-S, ASN1-T y ASN5-S están implicados en la formación de asparagina durante el curado al aire de hojas de tabaco Burley.

Ejemplo 5: Impacto de la reducción de asparagina en líneas transgénicas de ASN en la formación de acrilamida

65 El polvo de láminas de la hoja de las líneas transgénicas MMV-ASN1-ARNi (línea E281-6 y su control correspondiente, véase la Figura 11) y MMV-ASN5-ARNi (línea E303-1 y su control correspondiente, véase la Figura 13) se mezcla con

polvo de tabaco Virginia al 50 % para obtener una suspensión y material de hoja moldeada de conformidad con las especificaciones del fabricante. Se produjeron artículos formadores de aerosol y el aerosol generado mediante calentamiento se sometió a análisis (régimen de Health Canada) para medir la acrilamida. Los datos se muestran en la Figura 19. La asparagina que presenta una reducción del 88 % en las líneas de ARNi-ASN1 se transfirió a una

5 reducción de 70 % de acrilamida en comparación con el control de tabaco correspondiente. Se obtuvieron datos similares con las segundas líneas transgénicas, donde la asparagina presenta una reducción del 66 % en las hojas de líneas de ARNi-ASN5 para una reducción de acrilamida del 40 % en el aerosol en comparación con el control de tabaco.

10 La acrilamida es un marcador biológico (Naufal y otros, 2011) para los fumadores. La producción de acrilamida también se analiza en el humo de cigarrillo combustible (Figura 20). Los cigarrillos combustibles se preparan a partir de hojas curadas de tallo medio de plantas ARNi-ASN1 mediante el uso del siguiente procedimiento. La hoja de tabaco se acondiciona a 22 °C y 60 % de humedad ambiental. La picadura se prepara a partir de la lámina de las hojas después de retirar el nervio central. Los cigarrillos se fabrican a mano, se rellenan con una máquina eléctrica inyectora de cigarrillos "Powermatic 2" mediante el uso de tubos de cigarrillo estándar. El peso de la picadura insertada en los cigarrillos varía (alrededor de 800 mg) para obtener una resistencia a la extracción que corresponde a 120 a 140 mm de columna de agua. Después cada cigarrillo se verifica manualmente para determinar la firmeza (dureza). Una vez que se determinan los parámetros para un conjunto de picadura, se mantienen para las series de cada barra de cigarrillo producida (200 por muestra).

20 En las plantas controladas, el contenido de asparagina dentro de la picadura de tabaco (Figura 20) fue comparable al contenido de asparagina medido en el polvo mezclado de la hoja moldeada (véase la Figura 19) y aproximadamente 10 % menor en comparación con la cantidad medida en la Figura 11. Esta diferencia se debe a la posición de la hoja en el tallo al momento de la cosecha, donde la asparagina es más abundante en las hojas del tallo inferior que en las 25 hojas del tallo superior después del curado de Burley. Sin embargo, la reducción de la asparagina en ARNi-ASN en comparación con las plantas de tipo silvestre fue similar a los datos presentados en la Figura 11 y la Figura 19. Cabe destacar que la reducción de acrilamida fue menos efectiva en el humo de cigarrillos combustibles (57 %) que en el aerosol del artículo generador de aerosol (70 %), lo que posiblemente indique que la reacción de Maillard que lleva a la formación de asparagina es más eficaz en productos de tabaco calentados que quemados o quemados.

30 La reducción de acrilamida también es eficiente en el aerosol de artículos formadores de aerosol fabricados con lámina de un mutante de ASN1-S_parada (Figura 21). Sin embargo, en este caso, esta reducción se limita debido al impacto limitado del único ASN1-S como contribuyente de la síntesis de asparagina en hojas curadas en comparación con ASN1-T por ejemplo (en función de los datos ilustrados en la Figura 17). Los datos indican que tanto en las líneas 35 transgénicas ARNi-ASN como en las líneas mutantes de ASN, la reducción de la asparagina en la lámina curada es concomitante con una posterior reducción de acrilamida en el humo de cigarrillo combustible y el aerosol generado por calentamiento. En otras palabras, la inactivación de las copias de los genes ASN1 y ASN5 da como resultado una reducción de asparagina dentro de la matriz de tabaco y una reducción de la formación de acrilamida en el humo de cigarrillos combustibles y el aerosol generado por calentamiento.

40 Referencias

- Canales J, Rueda-López M, Craven-Bartle B, Avila C, Cánovas FM. (2012). Novel insights into regulation of asparagine synthetase in conifers. *Front Plant Sci.* 3:100
- Lewis RS, Bowen SW, Keogh MR and Dewey RE. (2010) Three nicotine demethylase genes mediate nornicotine biosynthesis in *Nicotiana tabacum* L.: functional characterization of the CYP82E10 gene. *Phytochemistry* 71: 17-18.
- Moldoveanu SC (2005) Analysis of Protein Amino Acids in Tobacco Using Microwave Digestion of Plant Material. Contributions to Tobacco Research 21: 451-465
- Naufal ZS, Marano KM, Kathman SJ, Wilson CL. (2011) Differential exposure biomarker levels among cigarette smokers and smokeless tobacco consumers in the National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2008. *Biomarkers* 16:222-235
- Onoa H, Chudab Y, Ohnishi-Kameyama M, H. Yadaa, M. Ishizakac, H. Kobayashia y M. Yoshidaa. 2003. Analysis of acrylamide by LC-MS/MS and GC-MS in processed Japanese foods. *Food Additives & Contaminants*, 20: 215-220.
- Papousek y otros (2014), Determination of Acrylamide and Acrolein in Smoke from Tobacco and E-Cigarettes, *Chromatographia* 77: 1145-1151
- Sierro N, Battey JN, Ouadi S, Bakaher N, Bovet L, Willig A, Goepfert S, Peitsch MC e Ivanov NV. (2014) The tobacco genome sequence and its comparison with those of tomato and potato. *Nat Commun.* 5:3833.
- Un aspecto adicional se refiere a una planta mutante, de origen no natural o transgénica o parte de esta, que tiene 65 reducción de la expresión o actividad de asparagina sintetasa, dicha asparagina sintetasa comprende, consiste o consiste esencialmente en: (i) una secuencia polinucleotídica que comprende, consiste o consiste esencialmente en

una secuencia que tiene al menos 72 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:7; o (ii) un polipéptido codificado por el polinucleótido establecido en (i); o (iii) un polipéptido que tiene al menos 78 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:6 o SEQ ID NO:8; en donde la expresión o actividad de la asparagina sintetasa establecida en (i), (ii) o (iii) se reduce en comparación con una planta de control.

5 Un aspecto adicional se refiere a un método para preparar un material vegetal con niveles reducidos de asparagina y niveles reducidos de acrilamida en el aerosol derivado de dicho material vegetal en comparación con el material vegetal de una planta de control, dicho método comprende las etapas de: (a) proporcionar una planta o parte de esta que comprende un polinucleótido que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que codifica una asparagina sintetasa y que tiene al menos 72 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:7; (b) reducir la expresión del polinucleótido o la actividad de la proteína codificada por este en la planta o parte de esta; (c) cosechar un material vegetal de la planta o parte de esta; (d) secar o curar el material vegetal; (e) opcionalmente, medir los niveles de asparagina en la planta o parte de esta y/o medir los niveles de acrilamida en el aerosol derivado de la planta o parte de esta; y (f) obtener material vegetal curado o secado con niveles reducidos de asparagina y niveles reducidos de acrilamida en el aerosol derivado de dicho material vegetal, adecuadamente, en donde el nivel de nicotina es esencialmente el mismo que el nivel de nicotina en la planta de control; adecuadamente, en donde la formación de glutamina, ácido aspártico y ácido glutámico aumenta en comparación con la hoja curada o secada de la planta de control.

10 20 Cualquier publicación citada o que se describe en la presente descripción proporciona información relevante que se describió antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Las declaraciones en la presente descripción no deben interpretarse como una admisión de que los inventores no tienen derecho a anteceder tales descripciones. Aunque la invención se ha descrito en relación con modalidades preferidas específicas, debe entenderse que la invención como se reivindica no debe limitarse indebidamente a tales modalidades específicas. De hecho, diversas modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención que son obvias para los expertos en biología celular, molecular y de plantas o campos relacionados se pretende que estén dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

15 25

30

35

40

45

50

55

60

65

Tabla 1
Porcentaje de residuos idénticos en regiones de alineación sin brechas entre los productos génicos de asparagina sintetasa (ASN) de tabaco, tomate y Arabidopsis.

	AtASN1	AtASN2	AtASN3	NtASN5-T	NtASN5-S	NtASN1-T	NtASN1-S	NtASN3-T	NtASN3-S	Solycd06g007180	Solycd04g055200
AtASN1	100	76,91	77,26	83,01	83,73	85,1	85,27	76,17	76,17	83,9	77,44
AtASN2	76,91	100	91,33	77,22	76,99	78,03	78,03	84,64	84,64	76,82	85,46
AtASN3	77,26	91,33	100	77,4	76,99	78,37	78,37	85,14	85,14	76,99	85,96
NtASN5-T	83,01	77,22	77,4	100	97,88	90,27	89,91	77,16	77,16	93,81	80,2
NtASN5-S	83,73	76,99	76,99	97,88	100	90,85	90,51	77,28	77,28	95,08	79,7
NtASN1-T	85,1	78,03	78,37	90,27	90,85	100	98,31	77,62	77,62	90,34	80,45
NtASN1-S	85,27	78,03	78,37	89,91	90,51	98,31	100	77,45	77,45	89,83	80,2
NtASN3-T	76,17	84,64	85,14	77,16	77,28	77,62	77,45	100	100	75,93	64,73
NtASN3-S	76,17	84,64	85,14	77,16	77,28	77,62	77,45	100	100	75,93	64,73
Solycd06g007180	83,9	76,82	76,99	93,81	95,08	90,34	89,83	75,93	75,93	100	79,95
Solycd04g055200	77,44	85,46	85,96	80,2	79,7	80,45	80,2	64,73	64,73	79,95	100

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Tabla 2

Análisis de qPCR (unidades de expresión génica relativa) para determinar el grado de silenciamiento de ambos transcritos de ASN1 y ASN5 en líneas transgénicas de ARNi-ASN1 (ASN1-1, ASN1-2 y ASN1-3) y ARNi-ASN5 (ASN5-1, ASN5-2 y ASN5-3) mediante el uso de los cebadores específicos ASN1p y ASN5p.

	ASN1p	ASN5p
Control	1	1
ASN1-1	0,35	0,88
ASN1-2	0,54	0,74
ASN1-3	0,10	0,40
ASN5-1	0,31	0,24
ASN5-2	0,50	0,34
ASN5-3	0,16	0,35

Tabla 3

Análisis de asparagina (mg/g) en hojas curadas al aire cosechadas en la posición del tallo inferior/media en las cuatro variantes de ASN: ASN1-S_W156* y sus correspondientes segregantes no transformados WT ASN1-S_WT*, ASN1-T_W156* y sus correspondientes segregantes no transformados WT ASN1-T_WT*, ASN5-S_Q66* y sus segregantes no transformados WT ASN5-S_WT*, ASN5-T_G59D y sus correspondientes segregantes no transformados WT ASN5-T_WT*. Cada variante y segregante no transformado WT se sembraron lado a lado en parcelas individuales para evitar cualquier efecto de campo no deseado (es decir, variación del nitrato y el suelo).

Parcela	ASN1-S_WT#	ASN1-S_W158*	ASN1-T_WT#	ASN1-T_W158*	ASN5-S_WT#	ASN5-S_G66*	ASN5-T_WT#	ASN5-T_G59D
1	24,2	20,5	27,5	4,7	20,9	12,0	25,0	26,4
2	26,0	20,6			22,3	16,2	18,5	27,8
3	22,9	20,6			23,0	15,2	17,7	28,0
4	26,7	21,3					28,3	28,7
5	30,9	22,0					28,4	31,9
6	17,4	14,1						
7	18,4	17,3						
% de Reducción	17 +/- 7		83		34 +/- 8		No	

Secuencias

SEQ ID NO:1 - NtASN1-S, secuencia de ADN genómico

20 SEQ ID NO:2 - NtASN1-S, secuencia de aminoácidos deducida

MCGILAVLGCSDDSQAKRVRVLESLRRLKHRGPDWGSLYQHGDCYLAHQRLAIVDPASGDQPLFNEDKTIIVTVNGEIYNHEQLRK
QMPNHKFRTGSDCDVIAHLYEEHGEDFVDMILDGIFAFVLLDTRDNSFLVARDAIGITSLYIGWGLGSVWISSELKGLNDDCEHFE
VFPPGHLYS SKNGGFRRWYNP PWFSSEAIPSTRYDPLVLRRAFENAVIKRMLTDVPGVLLSGGLDSSLVASITARYLAGTKAAKQW
GAQLHSFCVGLEGS PDLKAAREVAD YLGTVHFFHFTVQDGIDAIEDVIYHIETYDVTTIRASTPMLMSRKIKSLGVKMVISGEG
SDEVFGGYLYFHKAPNKEEFHKETCRKIKALHQYDCLRANKSTS A WGLEARVPFLDKEFINVAMS IDPEWKLIKPEQRRIEKWA LR
RAFDDEEHPYLPKHILYRQKEQFS DGVGYSWIDGLKAHAEQHVNTRMFMNASHIFPHNTPITKEAYYYRMIFERFFFQNSAGLTV P
GGASVACSTAKAVEWDASWSKNLDPSGRAAI G VHNSAYENHV PAMANGNLTKKII GRVPSMVEVGAAPELTIKS

30 SEQ ID NO:3 - NtASN1-T, secuencia de ADN genómico

5 gtgatttgcgaatgttatattgttaaccacaaactaacaattnaaggctctgatgaagtgttggtggctacttgtactttcacaagg
 ctcacaacaagaagagttccacaaggaaacatgtcgcaaggataaaaaaagtgttccagttcctgtttaaaaccttatttaaa
 taggataagcaacaacaacaacaaccccagtgataatccactagtgggtctgaggagggtattgttatgcagacacctacccc
 taccctgggttagagaggctgttcaagatagaactcgactccctccctccaaaaaccttatttaaataggacaaggagttgagaa
 aatgttcatctttccatctctatgcagattaaagcacttcaccaatatgactgtttaagagcaataagtcaacatctgca
 tggtttagaagcttagagtcgtttcaagataggatcatcaatgttgcattgatccagatggagtttgcatttgcatttgcatt
 tagttgaaccccaattgttgcataaaacgtcaactgtccctaaacccctgtattctatcccaaaagggtgtactaaatgcctt
 aggaggattgagaagtggtcttaaggaggcccttgcattgtgaggatcatccctatctcccaaaagggtgtactaaatgcctt
 tcaaactgatttgcagtgatgttcaatgttattgttaccacaaactaacaatttactcattacatttgcagcacatcctat
 10 acaggcagaaagaacaattcagtgtatggcttaggtatagttggatagatggactcaaagcacatgtgaacaacatgtgcgtt
 aatgactaatcaacaacttcaatgttcttattatcttcaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatt
 ttaatagggtgaccaataggatgtcttacatataattccctcataacacaccgattacaaggaaagcatacttatt
 agatgatttcgagcgtttccacaggtaatttgcattgttgcattgtgaggatcatgataattagctacttgcatttgcatttgcatt
 15 tcaaccccttgcacccctccgataaggatcacattttggatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatt
 ttttgggttgcagaattcagctggctaaaccgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatt
 tgcttcttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatt
 tgcttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatt
 atttag
 20 SEQ ID NO:4 - NtASN1-T, secuencia de aminoácidos deducida

MCGILAVLGCSDDSQAKRVRVLELSRRLKHRGPDWSGLYQHGDCYLAHQRLAIVDPASGDQPLFNEDEKTIVVTVNGEIYMHQLRK
 QMPDHKFRGSDCDVIAHLYEEHGEDFVDMLDGIFAFVLLDTRNSFLVARDAIGITSLYIGWGLDGSVWISSELKGLNDCEHFE
 VFPFGHLYSKNGGFRRWYNPLWFSEAIIPSTPYDPLVLRRAFENAVIKRIMTDVPPGVLLSGGLDSSLVASITARYLAGTKAAKQW
 25 GAQLHSFCVLEGSPDLKAAREVADYLGTVHHEFHFTVQDGIDAIEDVIYHIETYDVTTIRASTPMFLMSRIKSLGVKMVISGEG
 SDEVFGGYLYFHKAPNKEEFHKETCRKIKALHQYDCLRANKSTSAWGLEARVPFLDKEFINVAMSIDPEWKLIKPEQRRIEKWALR
 RAFDDEEHPYLPKHILYRQKEQFSDFGVGYSWIDGLKAHAEQHVTNRMMLNASHIFPHNTPTIKEAYYRMIFERFFPQNSAGLTV
 GGASVACSTAKAVEWDASWSKNLDPGRRAIGVHNSAYENHEPAMANGNLATKIIGRAPSMVEVGAAHELTIRS

30 SEQ ID NO:5 - NtASN5-S, secuencia de ADN genómico

atgtgtggaatcttggcttgggttgcattgttgcattgttgcattgttgcattgttgcattgttgcattgttgcattgttgcattgtt
 tccctttctttcttttattttattactccatcatataattattctactttcaccttttttttttttttttttttttttttttttttttttt
 gctttttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatt
 ttttggagcaacggtaaggatattttgtataggatcacagggtggagccgtaaaaggcatttttttttttttttttttttttttttttt
 gtctatcaggaaagatattttgtataggatcacagggtggagccgtaaaaggcatttttttttttttttttttttttttttttttttt
 35 aaatatgacttgcaccccttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatt
 ttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatt
 tttaggctgatagataggatactatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatt
 att
 40 ttttatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatt
 gcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatt
 gaataaaacaagattaattaaggatatacccttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatt
 ccgtcaccgtgacctgttcatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatt
 atacttattatactttggaaaattatggtcaaaattttatattttgttattcccttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 45 gaaaaaaaatt
 gtagaaatt
 tgaacaaagaagatatt
 ctgggtgctccatccaccccttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatt
 ataaatatt
 50 tt
 aaaaatctttatgtcaaacctatcaagatcccttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatt
 caaatatt
 ttt
 55 tt
 gtatatt
 atcacaagttcagaactgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatt
 gtatatt
 acacgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatt
 atagcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatt
 aatatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatt
 60 gttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatt
 ttt
 ttt
 65 tt
 gtggcatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatt
 tactccctatatt
 ttt
 ttt
 aaaaggatatt
 ggtacaatccatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatt
 ctgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatt
 ttggctataaggatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatt

SEQ ID NO:6 - NtASN5-s, secuencia de aminoácidos deducida

30 MCGILALLGCSDDSQAKRVRVLESLRRLKHRGPDWSGIYQHGFYLAHQRLAIDPASGDQPLFNQDKTIVTVNGEIYNHEKLRN
LMPNHKFRTGSDCDVIAHLYEEYGENFVDMLDGVFSFVLLDTRDNSFLAARDAIGITPLYIGWGLGSVWISELKGJNGDCEHFE
VFPFGHLYSSKNGGFRRWYNPQWFSEAI^PSNPYDPLVLRRAFENAVIKRLMTDVPFGVLLSGGLDSSLVASVTARYLAGTKAAKQW
GAQLHSFCVGLEGSPDLKAAREVADYLGTVHFFTFTVQDGIDAIEDVIYHIETYDVTITRASTPMFLMSRKIKSLGVKMVISGEG
35 SDELFGGYLYFHKAPNKEEFHVETCHKIKALHQYDCLRANKATSAWGLEARVPFLDKEFINVAMSIDPEWKMIKHDHGRIEKWVL
KAFDDEEQPYLPKHILYRQEKFQSDGVGYSWIDLKAHAEQHVTDRMMLNAAHIFPHNTPTTKEAYYYRMI^FERFFPQNSARLTVP
GGPSIACSTAKAI^EWDASWSNNLDPSGRAIGVHN^SA^YDDHLPDVGNGLDTTI^IDNVPRMVGVGAAAELTIRS

SEQ ID NO:7 - NtASN5-T, secuencia de ADN genómico

SEQ ID NO:8 - NtASN5-T, secuencia de aminoácidos deducida

45 MTLKHGPDWSGIYQHGDFYLAHQRLAIDPTSGDQPLFNQDKTIVTVNGEIYNHEKLRNLMPNFKFRTGSDCDVIAHLYEEYGE
NFVDMLDGVFSFVLLDTRDNSFLAARDAIGITPLYIGWGLDGSVWISSELKGLNDDCEHFEVFFPGHLYSSKNGGFRRWYNPQWF'S
EAVPSNPYDPVLVRRAFENAVIKRMLTDVPFGVLLSGGLDSLVASVTARYLAGTKAAKQWGAQIHSFCVGLEGS PDLKAAREVAD
YLGTVHETFTTVQDGIDAIEDVIYHIETYDVTIRASTPMFLMSRKIKSLGVKVMVISGEGSDELFGGGYLVFHKAPNKEEFHTETC
50 HKIKALHQYDCLRANKATSAGLEARVPFLDKEFINIAMSIDPEWKMIKHDQGRIEKWVLRKAFDEEHPYLPKHILYRQKEQFSD
GVGYSWIDGLKAHAEQHVTDRMMLNASHIFPHNTPTTKEAYYYRMIFERFFPQNSARLTVPGGPSIACSTAKAIEWDASWSNNLDP
SGRAAIGVHNSAYDDHLPDVSNGLDTIIDNVPRMVGVGASAELTIKS

SEQ ID NO:9 - NtASN3-S, secuencia de ADN genómico

SEQ ID NO:10 - NtASN3-S, secuencia de aminoácidos deducida

35 MCGILAVFGCIDNSQAKRSRIELSRRLRHGPDWGSLHSHDDCYLAHQRLAIVDPTSGDQPLYNEDKTIVAVNGEIYNHRDLRE
KLKSHQFRTGSDCEVIAHLYEDYGEDFVHMLDGMFSFVLLDTRDKSFIARDAIGITPLYMGWGLDGSVWFSEMKALSDDCERFV
SFLPGHIYSKNGGLRRWYNPPWYSETIPSTPYDHVLRKAFEKAVVKRLMTDVPFGVLLSGGDSSLVAAVANRYLADTEEARQW
GSQSLHTFCVGLKGSPDLKAAREVADYLGLTRHHEFHFTVQEGIDALDEVIYHVETYDVTITRASTPMFLMSRKIKSLGVKMVLSGEG
40 SDEIFGGYLYFHKAPNKEEFHQETCRKIKALHLYDCLRANKSTSAGVEARVPFLDKEFVNVMAMDPESKMIRPDLGRIEKWVLR
NAFDQDQNPKLPHILYRQEKFSDGVGYSWIDLKDHASRLVSDSMIANASFVYPHNTPTTKEGYYYRTIFERYFPKNAARETVP
GGPSVACSTAKAVEWDAWSKNLDPSGRAALGVHAAAEDASEVKTTVATDTPOKLEVDKAAAV

SEQ ID NO:11 - NtASN3-T, secuencia de ADN genómico

ctgtaaaattcggagtctcacccatattggccaccactcaactatagaagtgaaaaa
aaaaaaattcaagagttaataagtataaaaaatacattaaaggtagactataaaatata
aagcacttggcacctggcgatttcgtcttcttggtaatagcaagtcggagcttaaa
aagtccctcagctgcctgttaatagcaagctgatctactatctttctgcatgtctt
5 atctggggtaacttgataacaacccatggaatccctgtccacacttcttagccaatga
attattctcatgctgatcataaaagagtgcggggtcagaataagtccagctgcatgcaa
aggtctatgaagttgcctactccatctgcatcaatgatctgaaagacccatggcatatt
ctgctcatcagtgatgatgcttgaatagcccttggccctatccatagcttcatagag
gtagcccattgggtgttttgcctccatccaccaaacggagtactttaaccaaaggccc
accaattttaaagagcatgaaggacattattccaaaagaataagaagaataatgcgtgc
aacatcttcctgcacttccttgcaccaattactcttgcctccatccctctaagtgaa
caacttctcaaattggattttgcaccaatggatactatgttaagtcaagaagcagtgcc
gaaccttgccttgcgggttccaccaaatttttgcctggatacttgcatacatatt
caataacaaggccgctgagaaatataagaatgtaccctaaccgcctggccaaaaactgt
15 agagaagggttttcccttggaaaatgtccccgaagattaagtgatcataatgagccgcaca
tggagtccaaatagacattctgtacgccttccaccatgcaccgccttcacatttc
actcgcattatcagtgaccacttgcaccaactttgcctggccatcttcaatgggtt
ctgaaacaaggtaacatttgatgttgtcagtgatgactcgctagcatcaatggact
aagaaacaacattcccttggagaattcacaacacgtaataatcattttccagttct
20 tggcgtccacttatccatcataatggcagccatacttgcctccacgcacactttatgtt
ctccacaattttattagtcctccacttcctttagataaggacctgtatttcattg
ataagtgggaggcattccagggtccgtattgaccaacggcctaataaaagtctccaa
agtgcgtatgttagtgcaccaatgtgacggggagcccagcatcatgacccatcgtgcaaa
agctctaactgcacgatccctcaaatgtccttagacattttgtacatctttcacc
25 gcttttccctccggctttggaaatagcaatcttagcgttgcctactgt
accgcgtcgtatccatggcgttgcaccaatgggttgcatttttttttttttttttttttt
ttctcaatcatcatcatcattccatcatcaagattggtcaccaatgggttgcatttttt
ttgatTTTGTCTCCTCTTCACAAATTCTTATTCATCCCTCACCTCGG
tgacatTTTGGACAACTTGACGTTCTATGCCACCAATAAGATGGAAATTAAAGCG
30 ataaattccacccgttgcataatttttttttttttttttttttttttttttttttttttt
attaactctatcgccatcatcgcaagccggcttttatcttcgtatcttgcatttttttt
gaaatccctattaaagatataagaaatacataatcaaaataactgaaatacatataata
tatataataatt
ataacatataataatt
35 ataaacatataataatt
actgaaaaatataacatataaaataataatttttttttttttttttttttttttttttt
taaactaaaatataacatataatataataatttttttttttttttttttttttttttt
attaatcaaataaaactgaaaatataacatataataataatttttttttttttttttt
atatacatt
40 tatatgtctgaaatatacattttttttttttttttttttttttttttttttttttt
aataatt
gaaaaaaaacaaaatgggttagagataaaaggagaagaagaagacgctgaagtctgaac
tgc当地actgtcagactctcagagataaaacgagaagaagaaggaaagaaggaa
aaaagaaaagaaaaaaaagcagaatctgacgggaccaagaagaagaaggaaagaaggaa
aaaaaaagagaagaaggaaaattacctggactggcgtactgtcaatgaagttaaccc
45 agccttggcgtacccatgtatattggaccacactttgtattcatgctgatttgc
taggggtctttgtataatagaaaaacagacccaaagtttttttttttttttttttt
ctgcgtttttttaacaaaagcgtacccgtcgctcgctccctcggtgaacgcgtgc
ctcggcgtactgtcgcctcaggcgtactgtacccgtacactgtactgtcgc
ctttaagcgcgaagcgtacccgttttcaacactgttgccttcaagttctgtccat
50 ctgggtgtgtcttaaccatgtatatttttttttttttttttttttttttttttt
gctctactgtatccgtacttgccttttttttttttttttttttttttttttttt
tgc当地actgtcagactgttgcatttttttttttttttttttttttttttttt
acttt
gttgggttt
55 taatt
aagcttctattcgtatcatgtatatttttttttttttttttttttttttttttt
atgcgtatgtcactgtcactgttgcactgttgcatttttttttttttttttttt
gagatgaaaggcttaatgttgcactgttgcactgttgcatttttttttttttt
60 tattcaagcaaaaatgttgcactgttgcatttttttttttttttttttttttt
gatcagcgtactttccttatttttttttttttttttttttttttttttttttt
tgaacccttatt
aatttattacaatatt
taggatagttggatgttagactgttgcactgttgcatttttttttttttttt
tgc当地actgttgcactgttgcactgttgcactgttgcactgttgc
65 ataaaaaaatgttgcactgttgcactgttgcactgttgcactgttgcactgtt
acttqatqaacccatgtcqcactttaacacccattttttttttttttttttttt
acttqatqaacccatgtcqcactttaacacccattttttttttttttttttttt

ctgggtgagctcttagttgtttcttccctccttccattcttattcccttc
gtgggttgtgaacacatctcatatacttggtccagggttctgattctatgttagcgaa
tgcagaaggttgttacccgcataacacacccacgcacaaaggaggatactattatagaac
tattttgagcgatatttcccccaagggtgggtcttacatagttttttcttgttattc
5 atgttcagttatgatatttgcacaaacaatgtttctttcttcctttctgtta
acaagatcgcttctatcttcgtatttgttataaggttaatcacattgttaactattatt
tggagcagaatgctgcgaggaaacagtccaggtggtccaagtggtggcatgcagcactg
caaaggcagtagaatgggacgcagcttggtccaagaatctagatccatctggtcagctg
10 cactcggtgttcatgcagctgtttagggatgcagtaggtaaaaccacagtcgcga
cagatactgctcagaaacttgcgtgataaagctgcagtagctgttta

SEQ ID NO:12 - NtASN3-T, secuencia de aminoácidos deducida

15 MCGILAVFGCIDNSQAKRSRIELSRRLRHGPDWGSLHSHDDCYLAHQRLAIVDPSTGDQPLYNEDEKTIIVVAVNGEIYNHRLRE
KLKSHQFRGSDCEVIAHLYEDYGEDFVHMLDGMFSFVLLDTRDKSFIARDAIGITPLYMGWGLDGSVWFSEMKALSSDCERFV
SFLPGHIYSSKNGGLRRWYNPPWYSETIPSTPYDHVLVRKAFEKAVVKRLMTDVPFGVLLSGGLDSSLVAAVANRYLADTEARQW
GSQLHTFCVGALKGSPDLKAAREVADYLGTRRHFFHFTVQEGIDALDEVIYHVETYDVTIRASTPMFLMSRKIKSLGVKMVLSGEG
SDEIFGGYLYFHKAPNKEEFHQETCRKIKALHYDCLRANKSTSAWGVEARVPFLDKEFVNAMNDPESKIMIRPDLGRIEKWVLR
NAFDQQDNPYLPKHILYRQKEQFSDBGVGYSWIDGLKDHASRLVSDSMLANASFVYPHNTPTTKEGYYYRTIFERYFPKNAARETVP
GGPSVACSTAKAVEWDAWSKNLDPSGRAALGVHAAAEDASEVKTTVATDTPKLEVDKAAVAV
20

SEQ ID NO: 13 – secuencia de ADN del cebador de *NtASN1*, ASN1-f

tcacatatatccctcataaacacac

SEQ ID NO: 14 – secuencia de ADN del cebador de *NtASN1*, ASN1-r

aagaagcatcccactctacagctt

30 SEQ ID NO: 15 – secuencia de ADN del cebador de *NtASN5*, ASN5-f

atatcttccctcacaacactccaact

SEQ ID NO: 16 – secuencia de ADN del cebador de *NtASN5*, ASN5-r

35 Ctaaccggaaaggatcaaggttat

SEQ ID NO: 17 – secuencia codificante de ADN de *NtASN1-S* usada para silenciar las copias de *NtASN1-S* y *NtASN1-T*

40 tcacatataattccctcataacacaccccattacaagaaaggactactataggatatttcgagcgctttccacagaattc
agctgggctaaccgttctggaggagcaagtgtggcgtgtacgcacagctaaagcttagagtggtatcttggtaaaagaacc
ttgatccttcaggcaggcgtcttgggtacataactcggttatgagaatcatgtacctgtatggctaatggaaatttgacc
aaaaaaaaatcatggtcgtgtgccttctatggtagaagttggcgtgtcccgagctcacaataaagagttag

45 SEQ ID NO: 18 – secuencia codificante de ADN de *NtASN5-T* usada para silenciar las copias de *NtASN5-S* y *NtASN5-T*

50 gaccagattggagtggatatacaacatggatttacttagcacatcaacgttagcaattatcgatcctacttctggat
cagcctctgttaatcaagataagactattgttgttacagtcaatggagaaatttacaatcatgagaaaactcgtaatcttatgcc
taatcacaagttcagaaccggaagtgttgcacatcttatgaagaatatggagaaaatttggacatgttgg
atgggtgttctttgtattgttgatcgcgcgataacagcttcttgctcgtatgcgatggattactccctctat
attgggtggggacttgatgg

55 SEQ ID NO: 19 - secuencia de ADN del mutante de parada de ASN1-S: ASN1-S_W156*

atgtgcggatcttggctgtttgggttgttctgatgattctcaggccaaaagggttcgttctcgagctctcgacggtaggt
tgaagcatcgaccgatggagtggctgtatcaacatgggactgttacttgcacatcagctctagctattgtgatcct
gcttccggatcaacctctgttaacgaagataagacgattttacggtaggtaaatggagagatctacaatcacagcaac
ttcgttaagcaaatgcctaatacataagttccggactggcagtgactgtgatgtcattgcacacctagtagtatgaagaacatggaga
agattttgtggacatgtggatggatctcgctttgttattggatactcgagataacagcttcttgctcgatgcca
tttggattactcccttatattggggacttgcattgttaggtctgtatgaatatcatctgagcttaaggcttgaatgatga
ctgcgaacatTTgaagTTccaccaggcacttgtactctagcaagaatggcgctttaggggtggataatcccttgg
tctctgaggccattcctccactcggtatgatcccttagttctcaggcgtgccttggaaaatgttaggctgttatcaaaagggttat
gactgtatgtcccccttgggttctctccggggactcgattcatccttgcattgttgcattactgctcgctacttgctggta
caaaggctqccaq

SEQ ID NO: 20 - secuencia de aminoácidos del mutante de parada de ASN1-S: ASN1-S_W156*

15 MetCysGlyIleLeuAlaValLeuGlyCysSerAspAspSerGlnAlaLysArgValArgValLeuGluLeuSerArgArgLeuLy
sHisArgGlyProAspTrpSerGlyLeuTyrGlnHisGlyAspCysTyrLeuAlaHisGlnArgLeuAlaIleValAspProAlaS
erGlyAspGlnProLeuPheAsnGluAspLysThrIleValValThrValAsnGlyGluIleTyrAsnHisGluGlnLeuArgLys
GlnMetProAsnHisLysPheArgThrGlySerAspCysAspValIleAlaHisLeuTyrGluGluHisGlyGluAspPheValAs
20 pMetLeuAspGlyIlePheAlaPheValLeuLeuAspThrArgAspAsnSerPheLeuValAlaArgAspAlaIleGlyIleThrS
erLeuTyrIleGlyTrpGlyLeuAspGlySerVal**PARADA**

SEQ ID NO: 21 - secuencia de ADN del mutante de parada de ASN1-T: ASN1-T_W156*

25 atgtgcgggatcttggctttgggttgtctgatgatttcaggccaaaagggttcgtttcgagctctcgccaggtaggt
tgaagcatcgggaccagattggagtggctgtatcaacatgggactttacttggcacatcagcgtctagctattttgtatcct
gcttcggatcaacctgttaacgaagataagacgattttgttacggtaggtaaatggagagatctacaatcacgacaa
ttcgcaaggaaatgcctgatcataagttccggactgaaagtactgtgtatcattgcacacccatgtatgaaagaacatggaga
agattttgtggacatgctggatggatcttcgctttgttactggatactcgagataacagcttcttggctgtatgc
tttggaaattactcccttatattgggtgggacttgatggtagggctgtatgaatcatctgagcttaaggcttgaatgtat
ctgcgaacatTTGAAGTTCCACCAGGACACTGTACTCTAGCAAGAATGGCGGTTAGGGTGGTACAATCCTCTTGGT
TCTCTGAGGCTATTCCCTTCACTCCTATGATCCTTAGTTCTCAGGCAGCCTTGGAAATGTAGGCTGTTATCAAAGGTTGAT
GACTGATGTCCTTGGTGTCTGTCCTGGGGACTCGATTCATCCTGGTTGCTCGATTACTGCCGCTACTGGCTGGCA
CAAAGGCTGCAAGCAGTGGGAGCACAGCTTCAATTCTCTGTGTTGGCTTGAGGTAGGGATCACCGGATCTCAAGGCTGCAAG
AGAAGTGTGACTACTTGGAACCGTTCACCAAGAGTTCACTTCACCGTTCAAGGTAGGATGGAAATTGATGCAATTGAAGATGTT
ATTACCATATTGAGACATACGATGTAACGACAATCAGAGCAAGCCTACTGTCCTATGTCGCTAAGGATTAAGTCACTAGG
AGTGAAGATGGTTATATCTGGGGAAAGGCTGTGATGAGTTGGCTACTTGTTCAAGGCTCCAAACAAGGAAGAGT
TCCACAAGGAAACATGTCGCAAGGTTAGATAAAGCACTTCACCATATGACTGTTAGAGGCAAAATAAGTCAACATCTGCTGGGG
CTTAGAAGCTAGAGTGCCTTCTAGATAAGGAGGTTCATCAATGTTGCCATGAGTATTGATCCAGAGTGGAAAGTGGTAGATTAAA
CCAGAGCAAAGGAGGATTGAGAAGTGGCTCTAAGGAGGGCCTTGTGATGAGGAGGACATCCCTATCTCCAAAGGTTAGCACATCC
TATACAGGCGAAAACAATTCACTGATGGCTAGGCTATAGTTGGATAGATGGACTCAAAGCACATGTCGAAACAATGTTAGGT
GACCAATAGGATGATGCTTAATGCTTCACATATATTCCCTCATACACACCGATTACAAAGGAAGCATACTATTAGGATGATT
TCGAGCGCTTTCCCACAGGTTAGAATTCACTGGCTAACCGTTCTGGAGGAGCGAGTGTGGCGTGTAGCACAGCTAAAGCTG
AGAGTGGGATGCTTCTGGTCAAAGAACCTGATCCTCAGGAAGGGCTGCTATTGGTGTACATAACTCAGCTTATGAGAATCATG
AACCTGCTATGGCTAATGGAATTGGCCACAAAAATCATTGGCGTGCAGCGTCTATGGTGTAGAAGTGGTGTGCTCATGAGCTC
ACAATAAGGAGT

SEQ ID NO: 22 - Secuencia de aminoácidos del mutante de parada de ASN1-T: ASN1-T W156*

50 MetCysGlyIleLeuAlaValLeuGlyCysSerAspAspSerGlnAlaLysArgValArgValLeuGluLeuSerArgArgLeuLy
sHisArgGlyProAspTrpSerGlyIleTyrGlnHisGlyAspCysTyrLeuAlaHisGlnArgLeuAlaIleValAspProAlaS
erGlyAspGlnProLeuPheAsnGluAspLysThrIleValValThrValAsnGlyGluIleTyrAsnHisGluGlnLeuArgLys
GlnMetProAspHisLysPheArgThrGlySerAspCysAspValIleAlaHisLeuTyrGluGluHisGlyGluAspPheValAs
pMetLeuAspGlyIlePheAlaPheValLeuLeuAspThrArgAspAsnSerPheLeuValAlaArgAspAlaIleGlyIleThrS
erLeuTyrIleGlyTrpGlyLeuAspGlySerVal**PARADA**

SEQ ID NO: 23 - secuencia de ADN del mutante de parada de ASN5-S: ASN5-S_Q66*

15 SEQ ID NO: 24 - Secuencia de aminoácidos del mutante de parada de ASN5-S: ASN5-S_Q66*

MetCysGlyIleLeuAlaLeuLeuGlyCysSerAspAspSerGlnAlaLysArgValArgValLeuGluLeuSerArgArgLeuLysHisArgGlyProAspTrpSerGlyIleTyrGlnHisGlyAspPheTyrLeuAlaHisGlnArgLeuAlaIleIleAspProAlaserGlyAspGlnProLeuPheAsn**PARADA**

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Hoja de tabaco curada o secada diseñada genéticamente o modificada genéticamente para tener una expresión o actividad reducida de asparagina sintetasa, dicha asparagina sintetasa comprende, o consiste en:

- 5 (i) una secuencia polinucleotídica que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:1 o al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:7; o
- 10 (ii) un polipéptido codificado por el polinucleótido establecido en (i); o
- (iii) un polipéptido que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:6 o SEQ ID NO:8;

15 en donde la expresión o actividad de la asparagina sintetasa establecida en (i), (ii) o (iii) se reduce en la hoja de tabaco curada o secada en comparación con la hoja de tabaco curada o secada de una planta de tabaco de control y en donde la expresión o actividad reducida de la asparagina sintetasa en la hoja de tabaco curada o secada confiere:

20 (a) una reducción en el nivel de asparagina de al menos 17 % en comparación con el nivel de asparagina en la hoja de tabaco curada o secada de la planta de tabaco de control;

25 (b) una reducción en el nivel de acrilamida de al menos 20 % en el aerosol producido al calentar o quemar la hoja de tabaco curada o secada en comparación con la hoja de tabaco curada o secada de la planta de tabaco de control; y

30 (c) un nivel de nicotina en la hoja de tabaco curada o secada que está dentro de aproximadamente el 10 % o menos de la cantidad de nicotina que está presente en la hoja de tabaco curada o secada de la planta de tabaco de control.

35 en donde dicha hoja de tabaco curada o secada comprende además al menos una alteración genética en una región reguladora o en la secuencia codificante del polinucleótido que codifica la asparagina sintetasa.

40 2. La hoja de tabaco curada o secada de conformidad con la reivindicación 1, en donde el nivel de asparagina es al menos 22 % menor y la cantidad de acrilamida en el aerosol producido al calentar o quemar la hoja de tabaco curada o secada es al menos 24 % menor que la hoja curada o secada y el aerosol de la planta de tabaco de control;

45 adecuadamente, en donde el nivel de asparagina en la hoja curada o secada es al menos 44 % menor y la cantidad de acrilamida en el aerosol producido al calentar o quemar la hoja de tabaco curada o secada es al menos 66 % menor en comparación con la hoja curada o secada y el aerosol de la planta de tabaco de control; adecuadamente, en donde el nivel de asparagina es al menos 70 % menor y la cantidad de acrilamida en el aerosol producido al calentar o quemar la hoja de tabaco curada o secada es al menos 88 % menor en comparación con la hoja de tabaco curada o secada y el aerosol de la planta de tabaco de control.

50 3. La hoja de tabaco curada o secada de conformidad con cualquier reivindicación anterior, en donde el nivel de nicotina es igual que el nivel de nicotina en la hoja de tabaco curada o secada de la planta de tabaco de control; y/o

55 en donde la formación de glutamina, ácido aspártico y ácido glutámico aumenta en la hoja de tabaco curada o secada en comparación con la hoja de tabaco curada o secada de la planta de tabaco de control; y/o

60 en donde la hoja de tabaco curada o secada es de una planta de tabaco *Nicotiana tabacum*, preferentemente, una planta de tabaco *Nicotiana tabacum* de tipo Burley.

65 4. La hoja de tabaco curada o secada de conformidad con cualquier reivindicación anterior, en donde la hoja de tabaco curada o secada comprende al menos una mutación en cada copia de la secuencia polinucleotídica que codifica la asparagina sintetasa establecida en (i), (ii) o (iii), adecuadamente una(s) mutación(ones) de parada y/o un(os) fragmento(s) génico(s) que interfieren con la traducción de un transcripto de ARN que codifica la asparagina sintetasa.

70 5. La hoja de tabaco curada o secada de conformidad con cualquier reivindicación anterior, en donde la secuencia de nucleótidos de la asparagina sintetasa comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una mutación de parada en una posición equivalente a la ubicación de la secuencia de nucleótidos que codifica la mutación de parada en las SEQ ID No. 19, 21 y 23, o en donde la asparagina sintetasa comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un codón de parada en una posición equivalente a la ubicación del codón de parada de las SEQ ID No. 20, 22 y 24.

75 6. La hoja de tabaco curada o secada de conformidad con cualquier reivindicación anterior, en donde la asparagina sintetasa comprende una secuencia de nucleótidos que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID No. 19, 21 y 23, o está codificada por la secuencia de nucleótidos que se selecciona del grupo que consiste en las

SEQ ID No. 19, 21 y 23, o comprende o consiste en la secuencia polipeptídica establecida en las SEQ ID No. 20, 22 y 24; y/o

5 en donde la cantidad de biomasa de las hojas es igual que la cantidad de biomasa de las hojas de la planta de tabaco de control.

7. La hoja de tabaco curada o secada de conformidad con cualquier reivindicación anterior, en donde la hoja se cura al aire, adecuadamente en donde la hoja curada al aire se cura al sol o se cura al fuego; o en donde la hoja se seca al aire, adecuadamente, en donde la hoja secada al aire se seca al sol o se seca al fuego.

10 8. Un método para preparar material de la planta del tabaco curado o secado, dicho método comprende las etapas de:

15 (a) proporcionar una planta de tabaco o parte de esta que comprende un polinucleótido que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:1 o al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:7;

20 (b) diseñar genéticamente o modificar genéticamente la planta de tabaco o parte de esta para reducir la expresión del polinucleótido o la actividad de la proteína codificada por este en la planta de tabaco o parte de esta;

(c) cosechar el material vegetal de la planta de tabaco o parte de esta;

(d) secar o curar el material vegetal;

25 (e) opcionalmente, medir el nivel de asparagina en el material de la planta del tabaco curado o secado y/o medir el nivel de acrilamida en el aerosol del material de la planta del tabaco curado o secado y/o medir el nivel de nicotina en el material de la planta del tabaco curado o secado; y

(f) obtener un material de la planta del tabaco curado o secado que tiene:

30 (i) una reducción en el nivel de asparagina de al menos 17 % en comparación con el nivel de asparagina en el material de la planta del tabaco de control curado o secado;

35 (ii) una reducción en el nivel de acrilamida de al menos 20 % en el aerosol producido al calentar o quemar el material vegetal curado o secado en comparación con el nivel de acrilamida en material de la planta del tabaco de control curado o secado; y

(iii) un nivel de nicotina que está dentro de aproximadamente el 10 % o menos de la cantidad de nicotina en el material de la planta del tabaco de control curado o secado,

40 opcionalmente, en donde la formación de glutamina, ácido aspártico y ácido glutámico aumenta en comparación con la hoja curada o secada de la planta de tabaco de control.

45 9. El método de conformidad con la reivindicación 8, en donde la expresión se reduce en la etapa (b) mediante edición de genes.

50 10. El método de conformidad con la reivindicación 8 o 9, en donde el material de la planta del tabaco se cura o se seca durante al menos 3 días después de la cosecha; y/o en donde el material de la planta del tabaco se cura al aire, adecuadamente, en donde la hoja curada al aire se cura al sol o se cura al fuego, o en donde el material de la planta del tabaco se seca al aire o se seca al sol o se seca al fuego.

55 11. Un producto de tabaco o un artículo para fumar que comprende la hoja de tabaco curada o secada de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

60

65

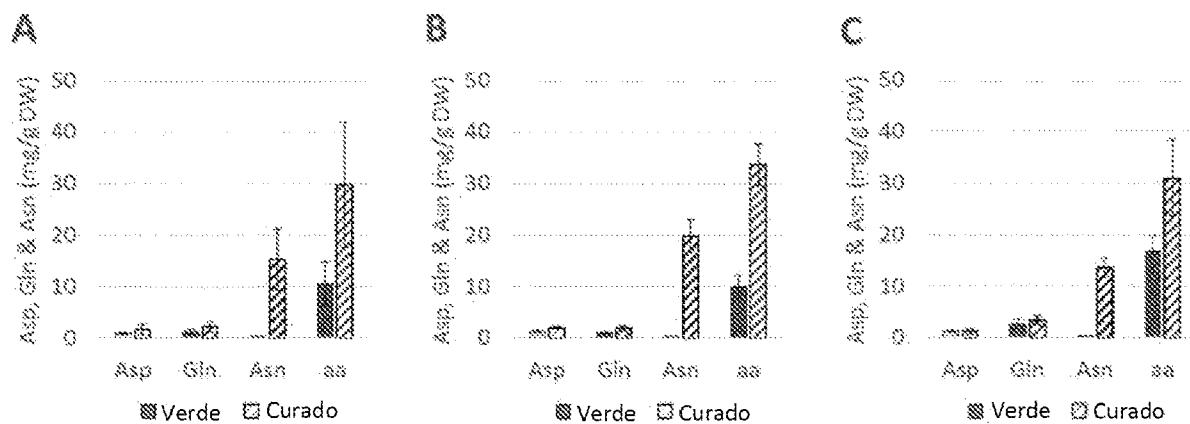
FIGURA 1

FIGURA 2

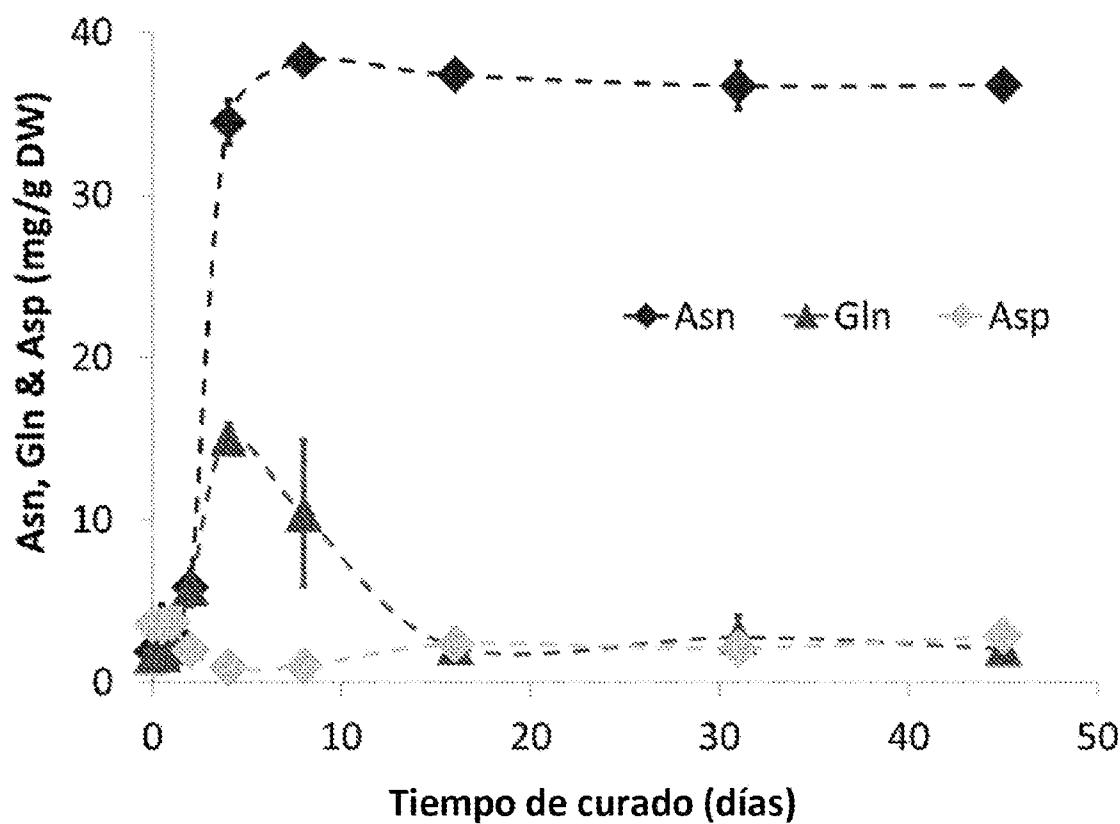


FIGURA 3



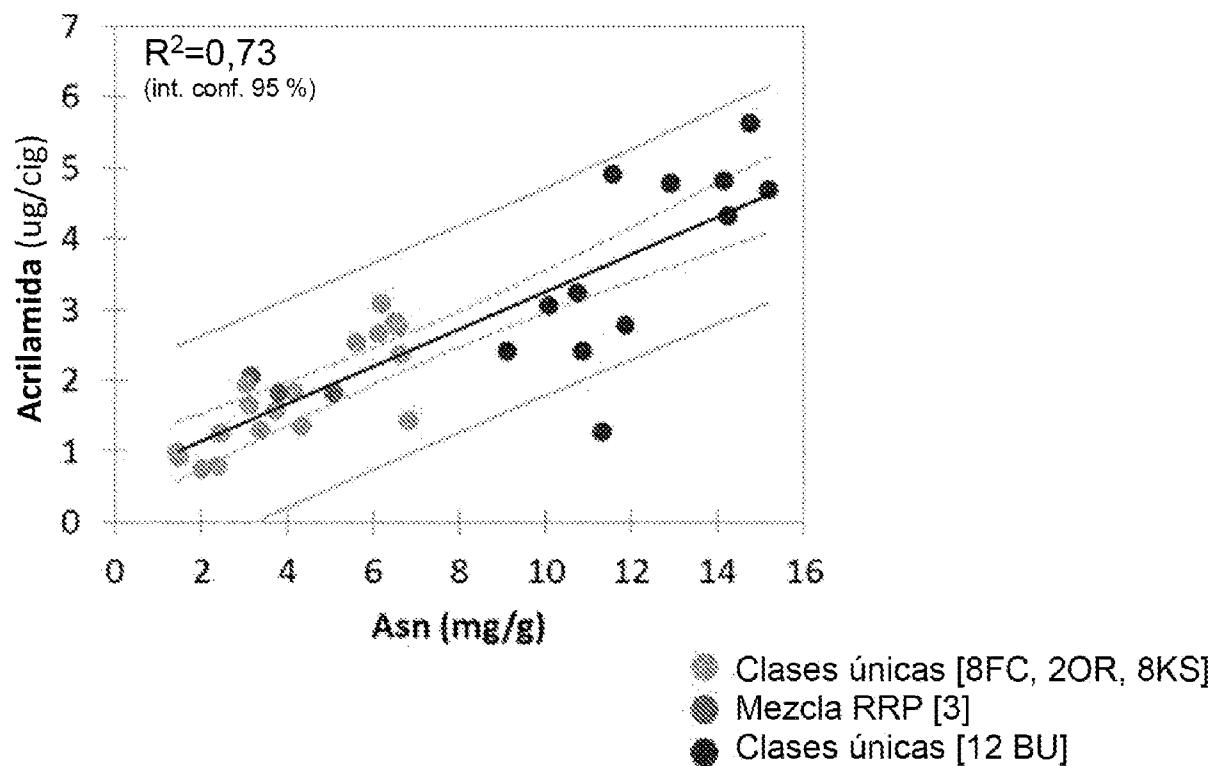
FIGURA 4

FIGURA 5

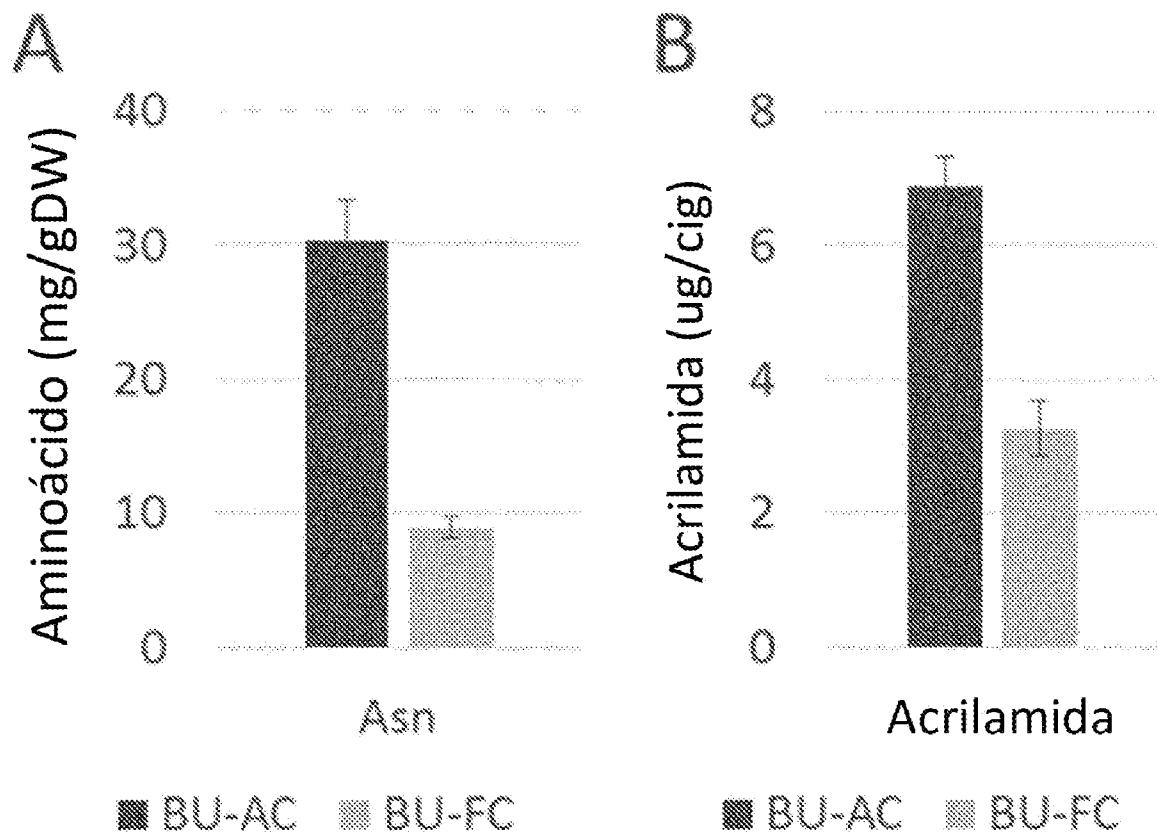


FIGURA 6

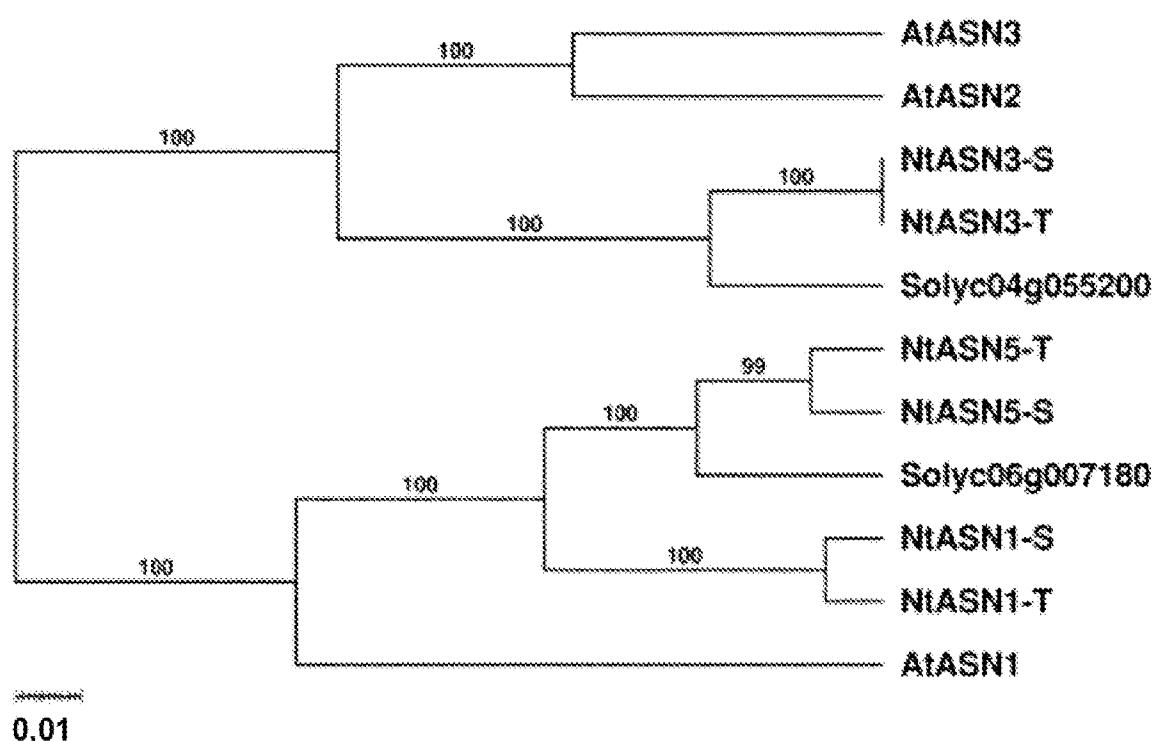


FIGURA 7

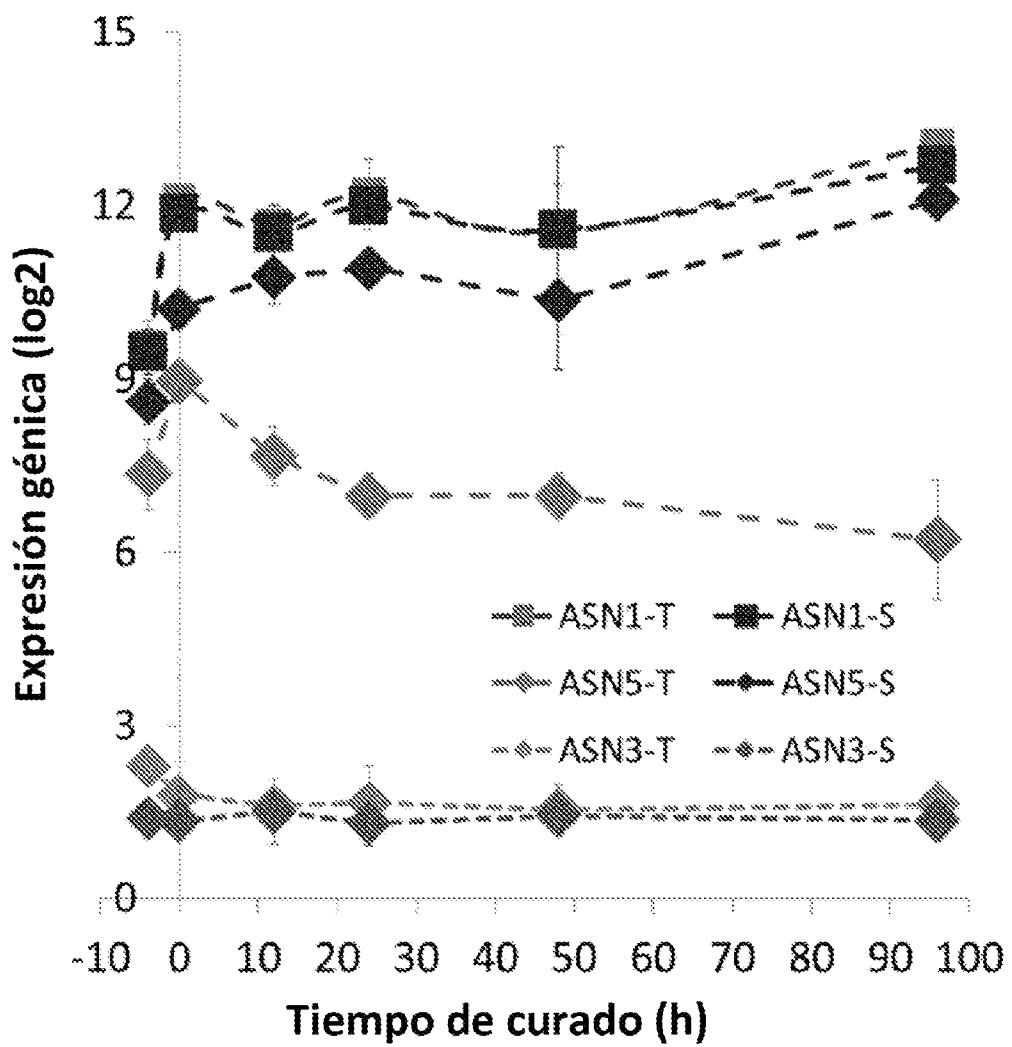


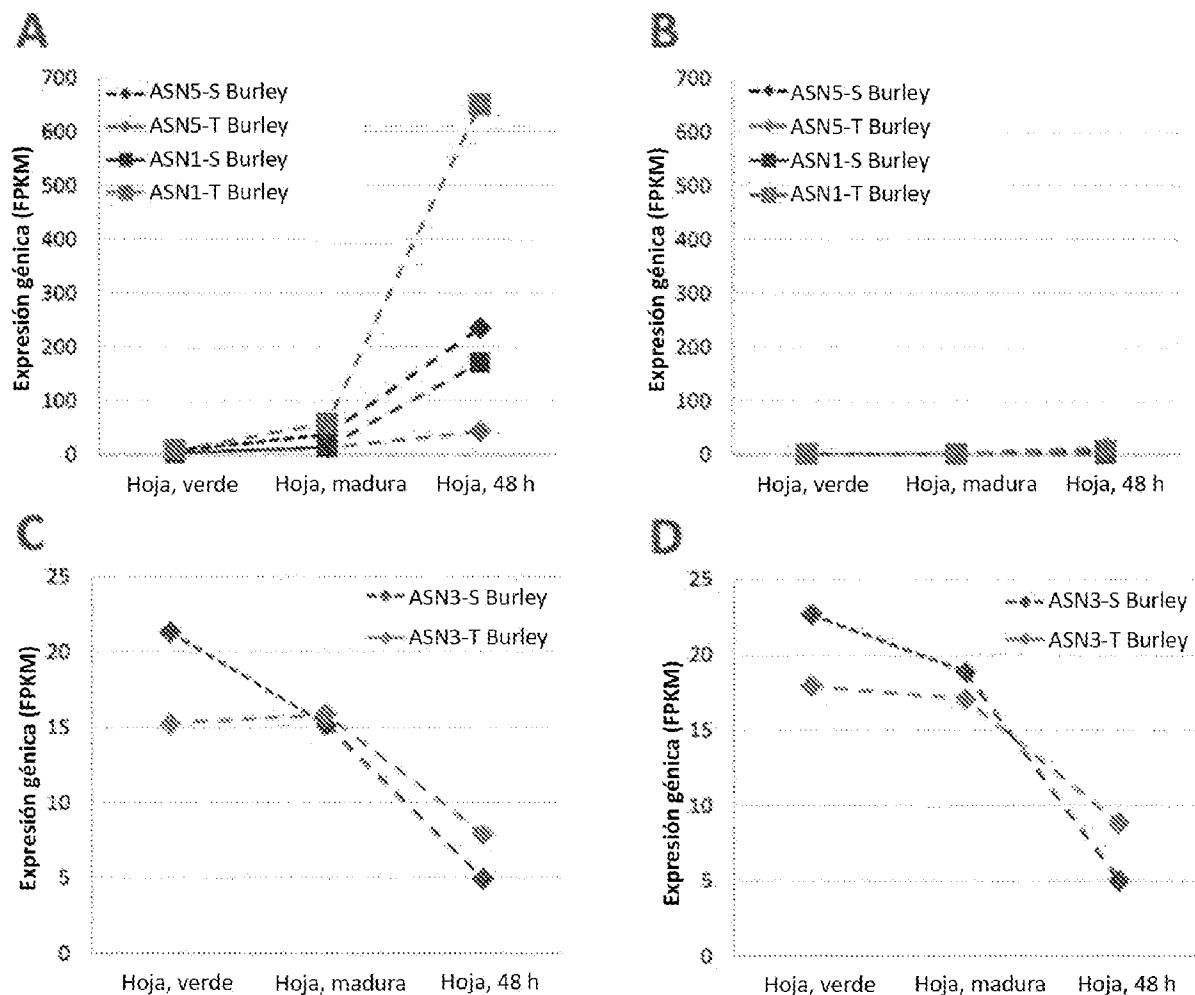
FIGURA 8

FIGURA 9

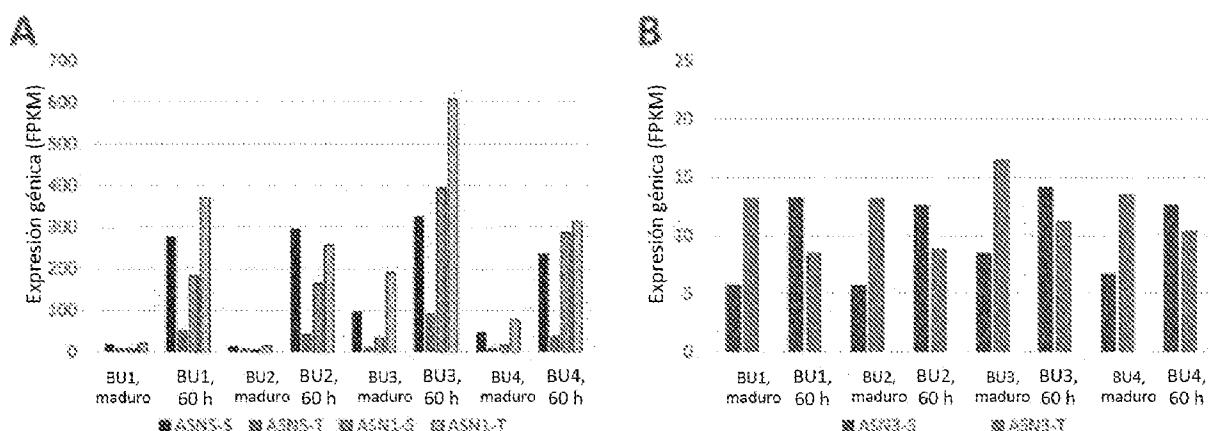


FIGURA 10

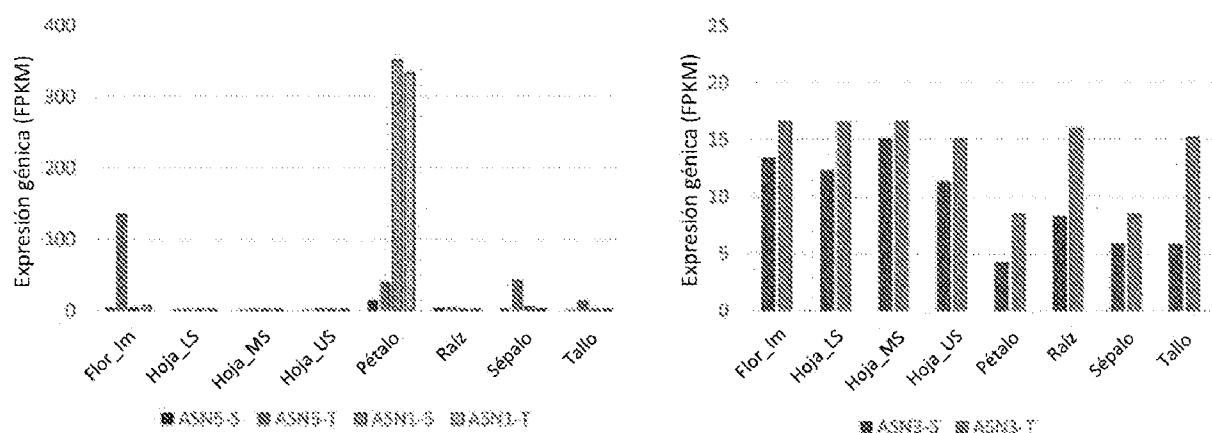


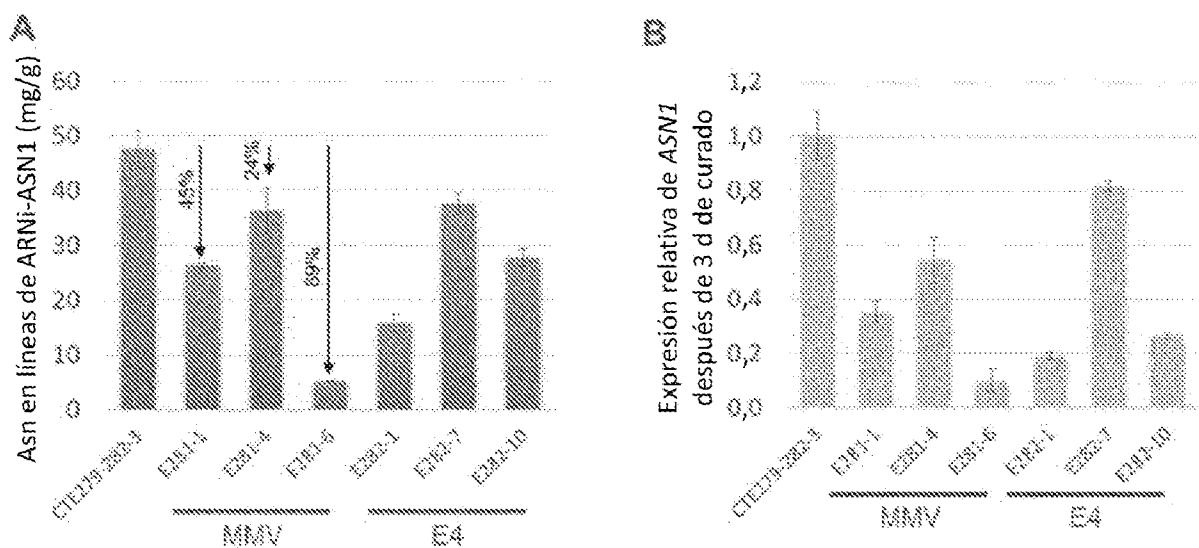
FIGURA 11

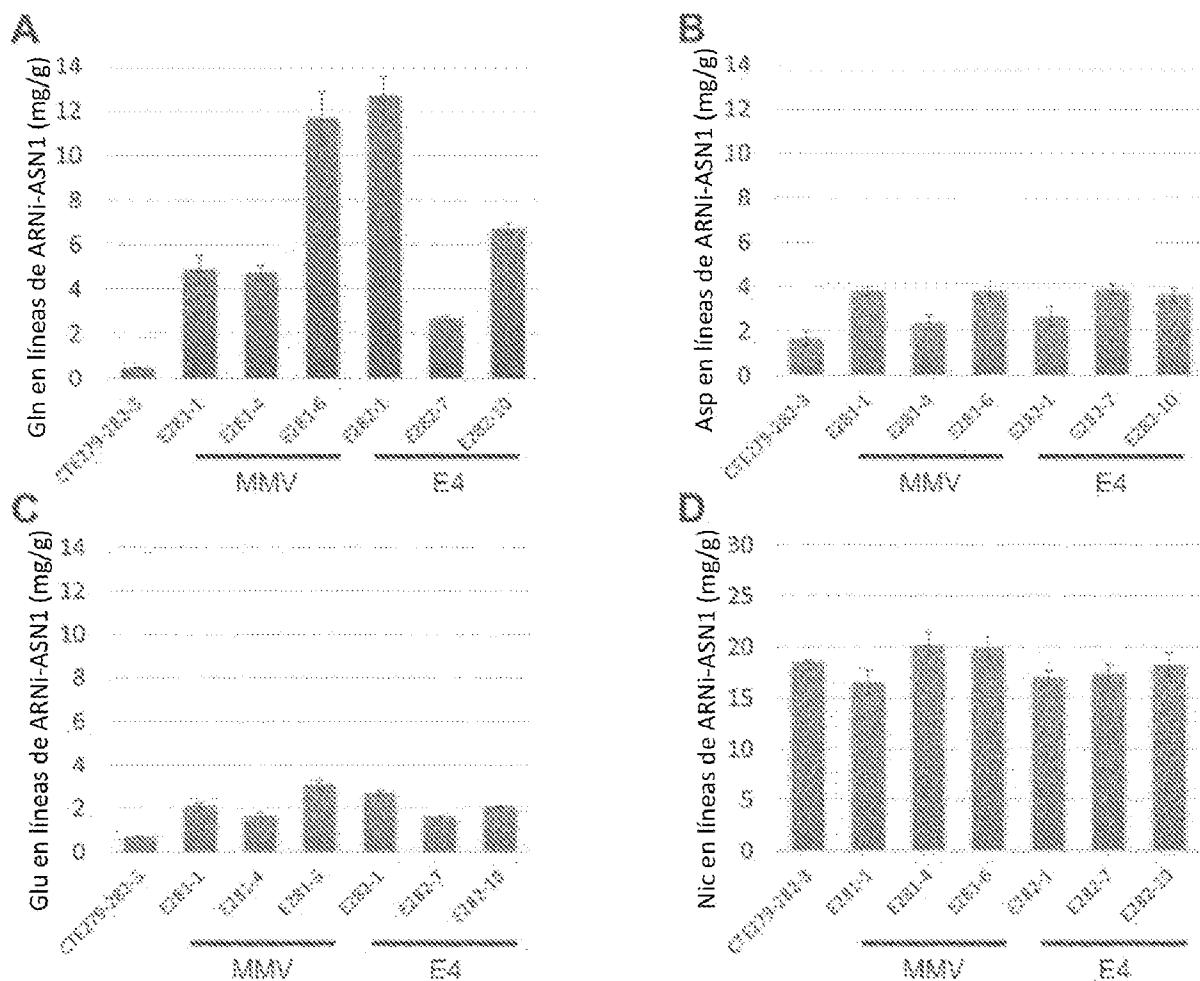
FIGURA 12

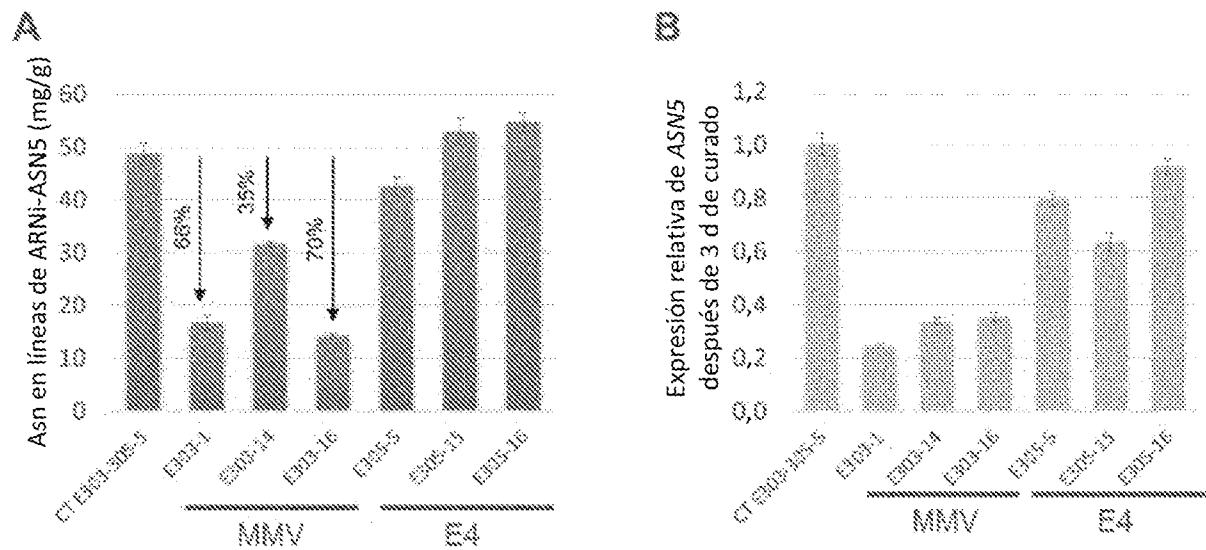
FIGURA 13

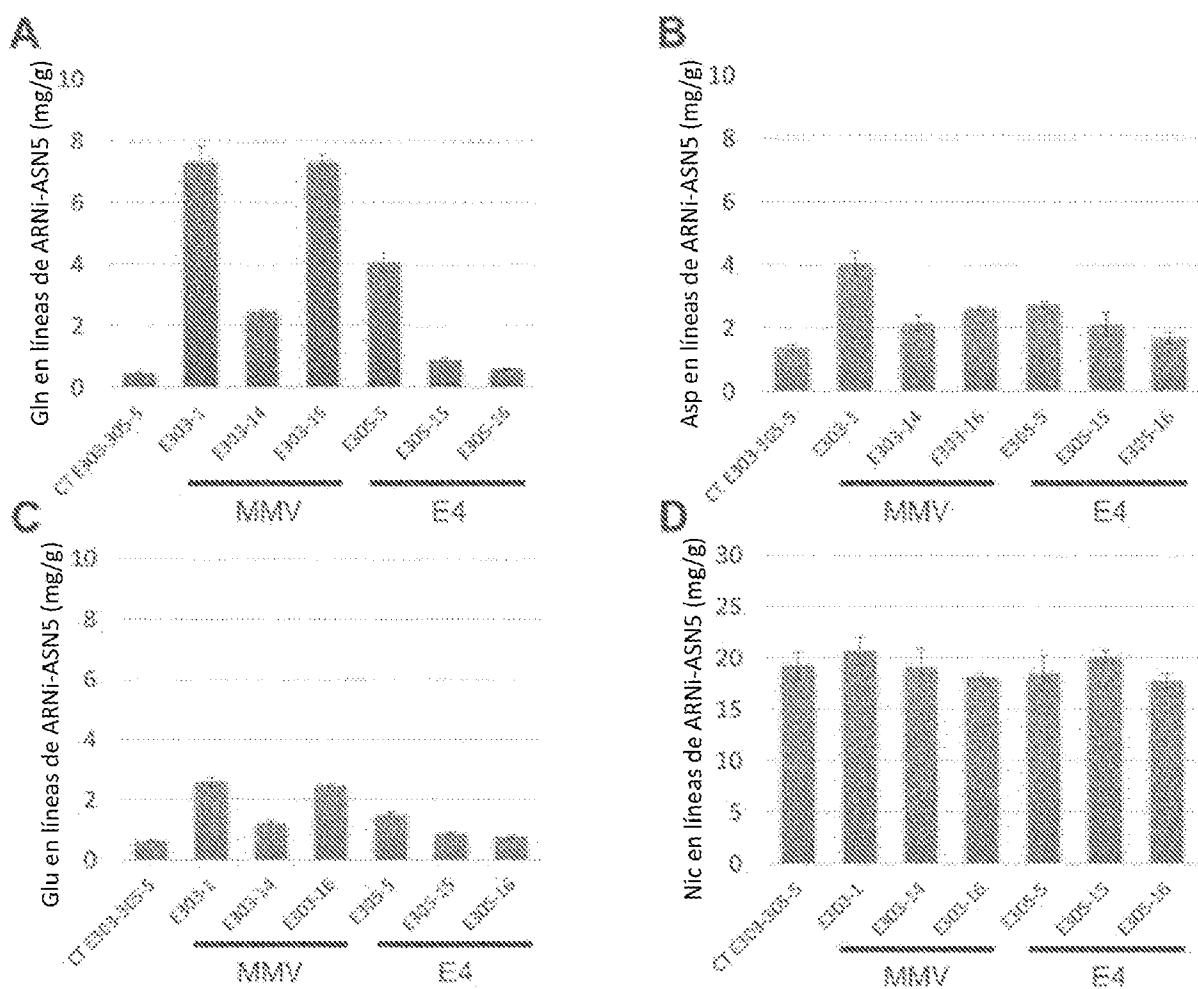
FIGURA 14

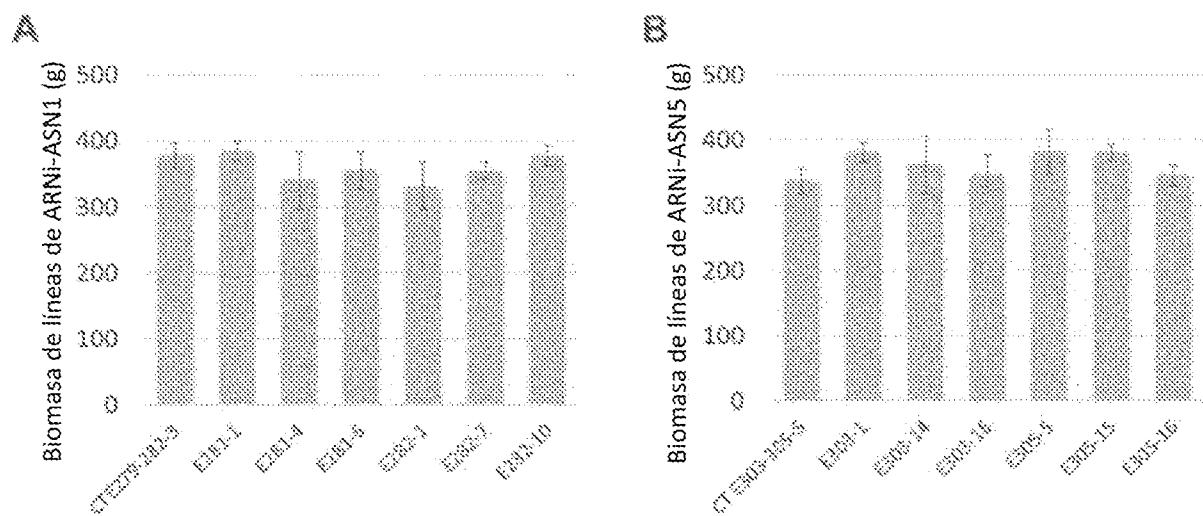
FIGURA 15

FIGURA 16

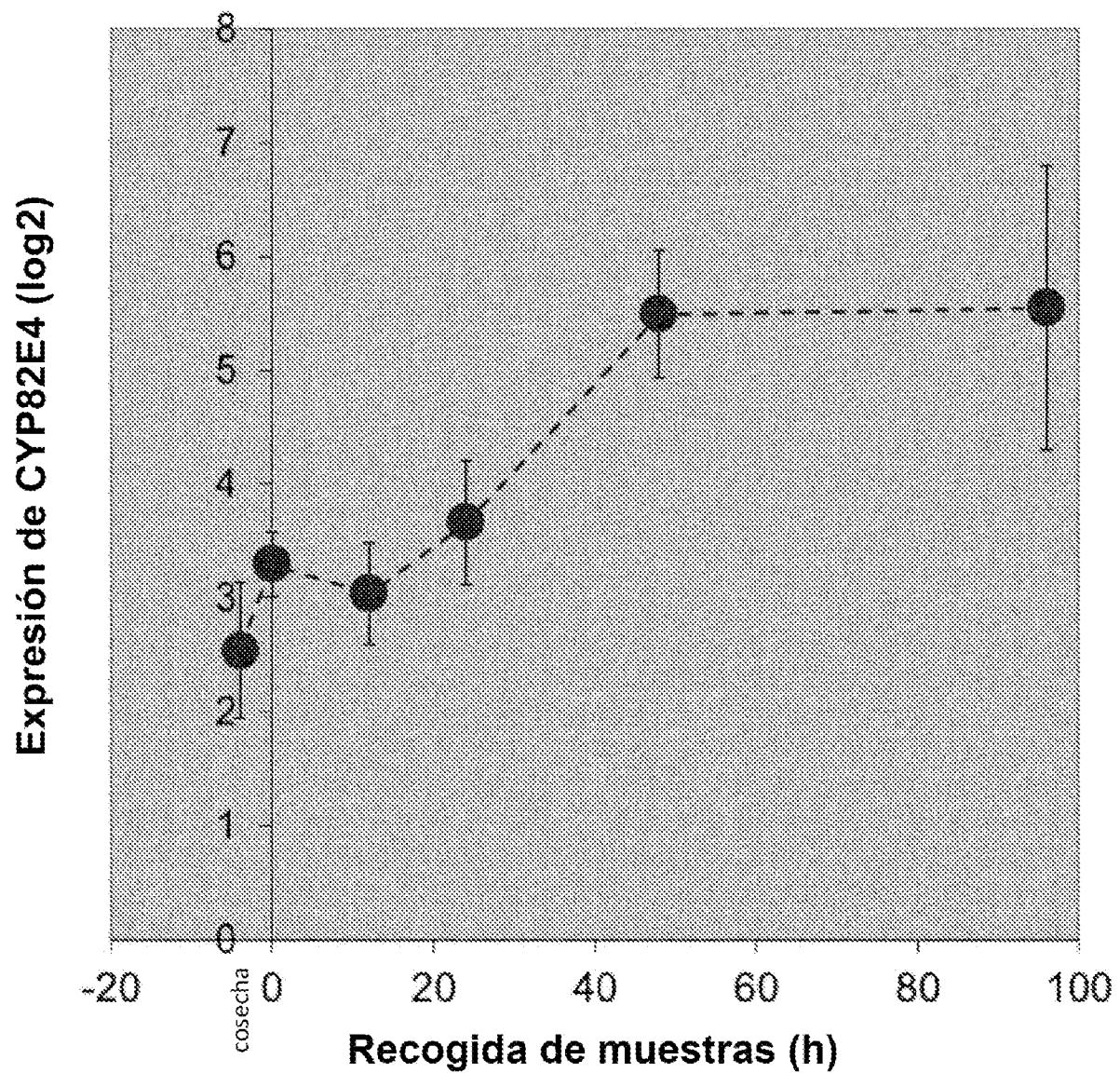


FIGURA 17

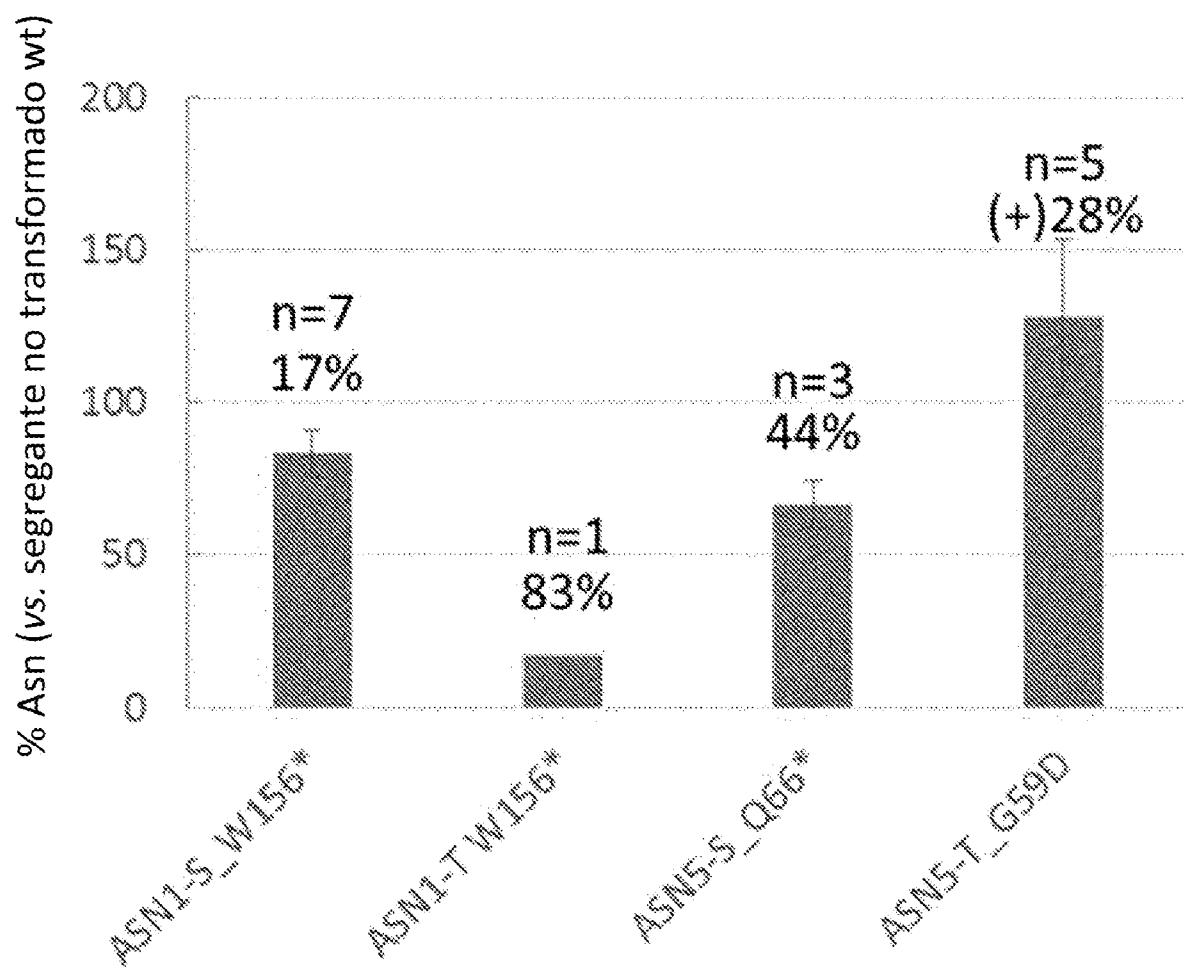


FIGURA 18

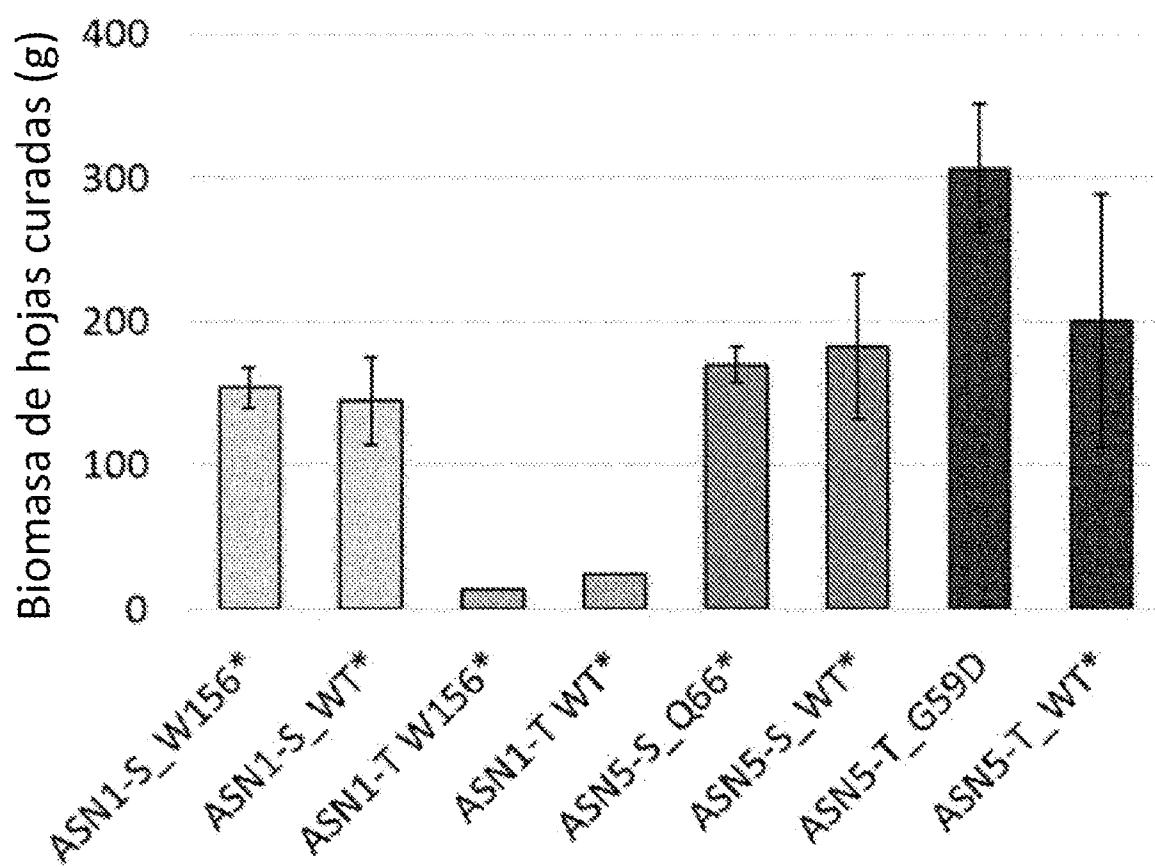


FIGURA 19

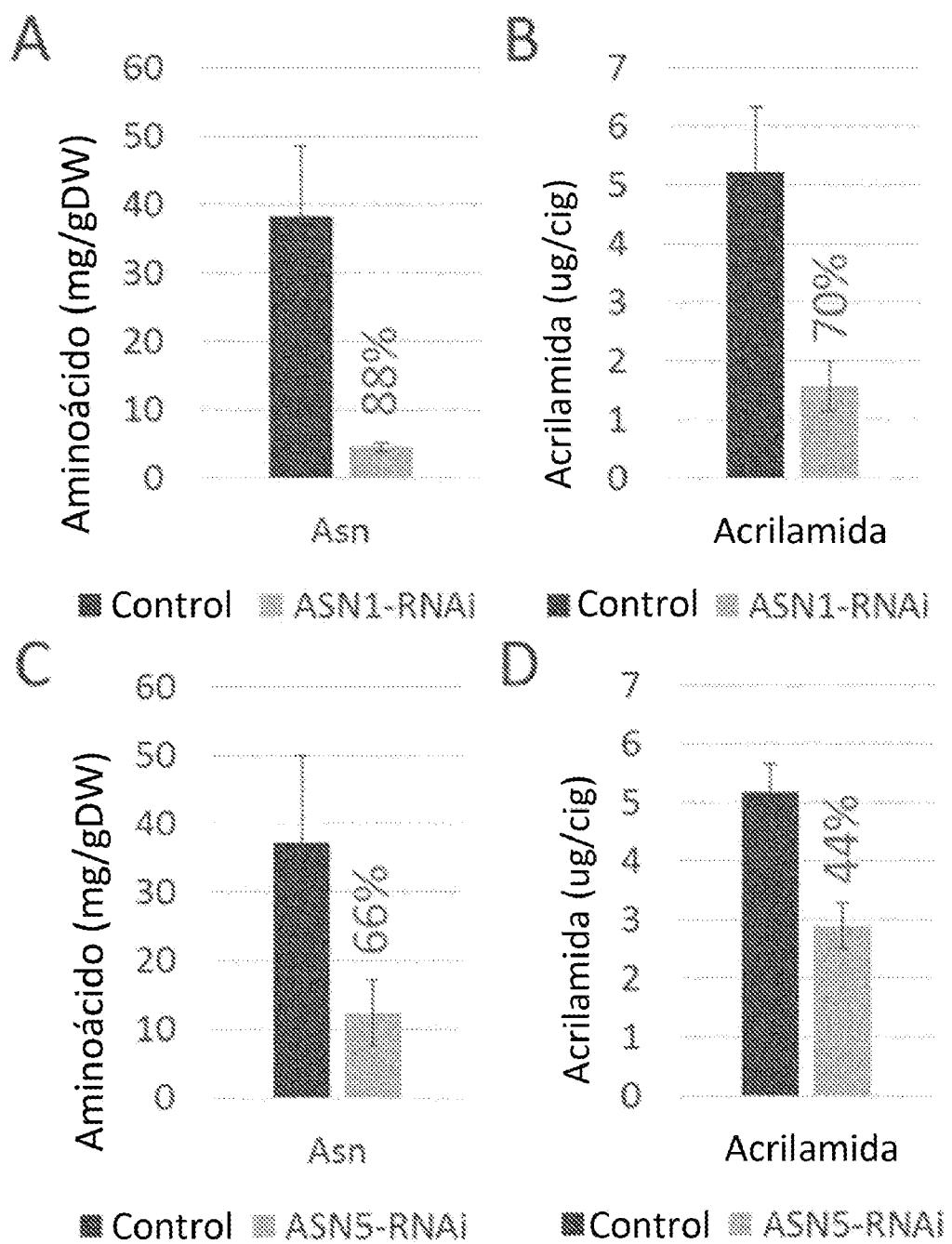


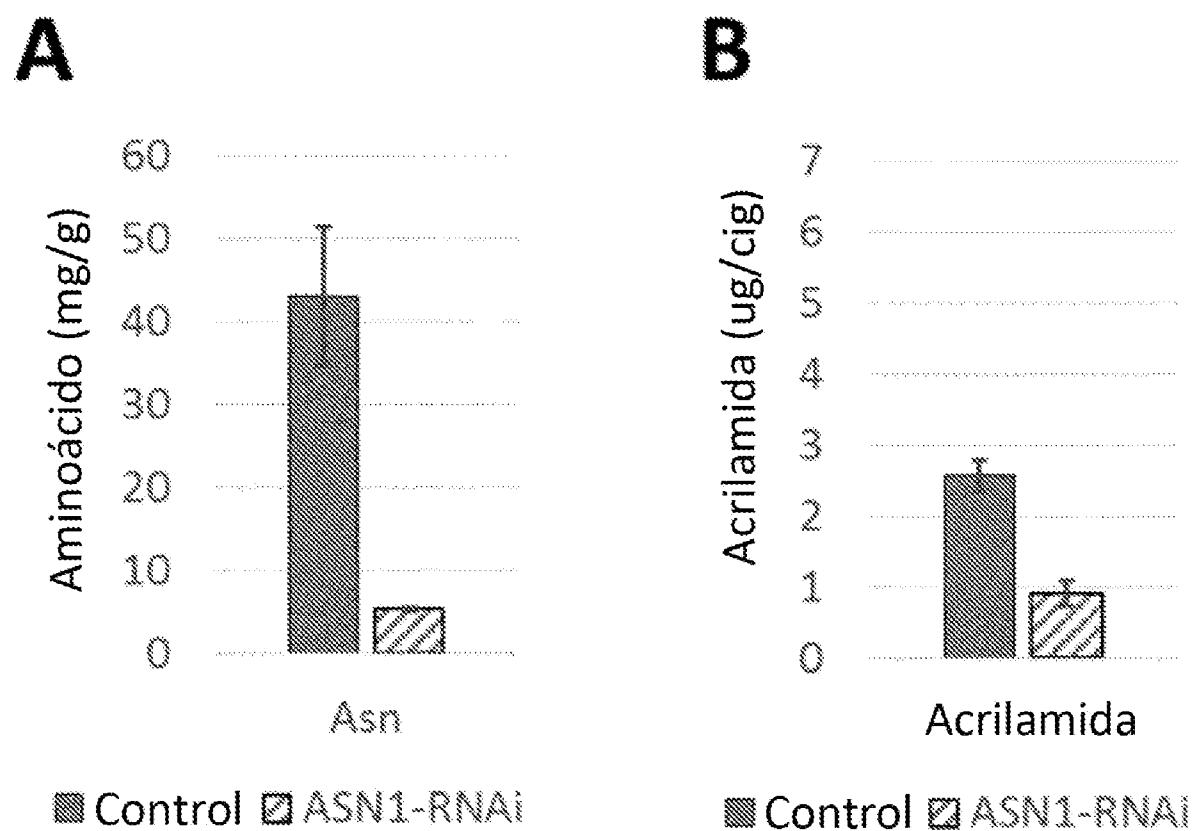
FIGURA 20

FIGURA 21

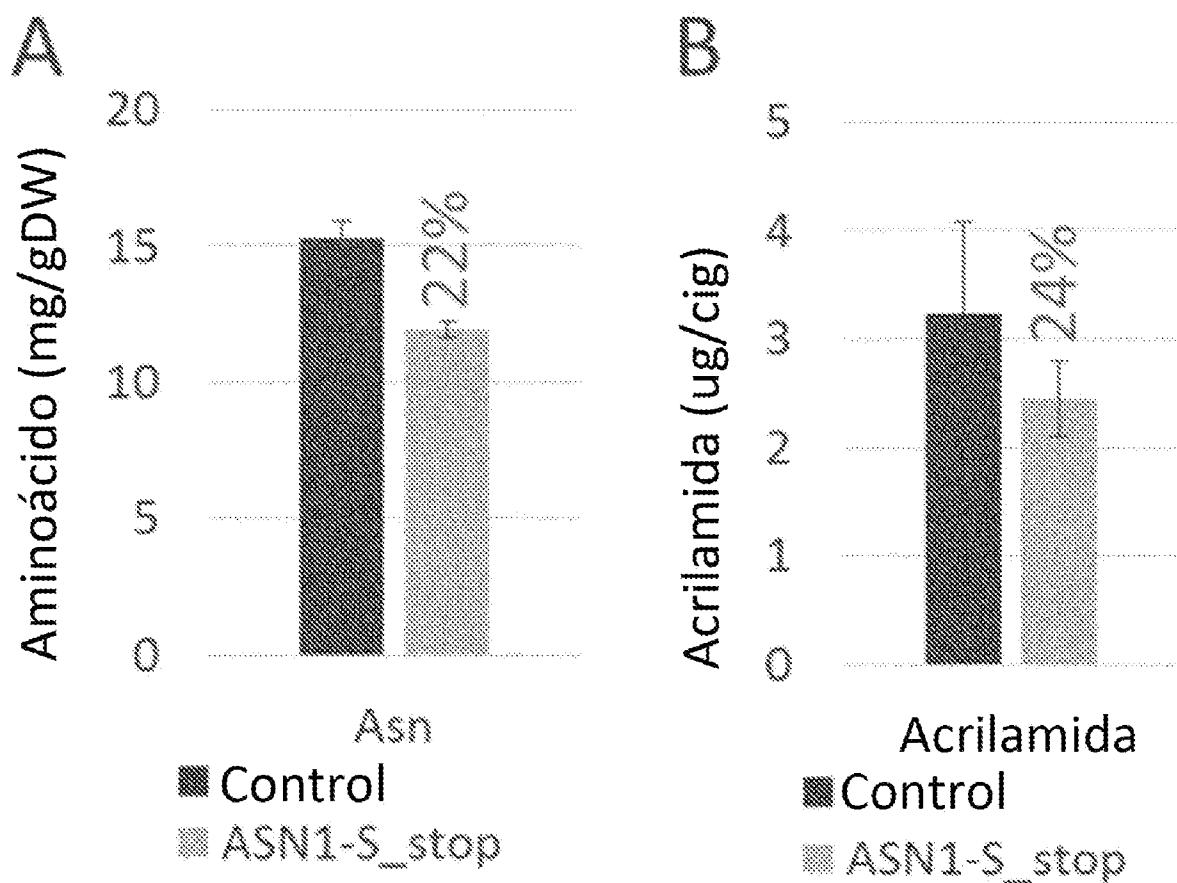


FIGURA 22