

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 748 823**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)
C07K 14/415 (2006.01)
A01H 5/00 (2008.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.09.2006 E 14163682 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2019 EP 2792750**

(54) Título: **Aumento de los niveles de alcaloides nicotínicos**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.03.2020

(73) Titular/es:

**22ND CENTURY LIMITED, LLC (100.0%)
9530 Main Street
Clarence, NY 14031, US**

(72) Inventor/es:

**KAJIKAWA, M. y
HASHIMOTO, TAKASHI**

(74) Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 748 823 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

Aumento de los niveles de alcaloides nicotínicos

5 CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0001] La presente invención se refiere al campo de la biología molecular y la regulación de la síntesis de alcaloides nicotínicos. Por lo tanto, la invención se refiere, por ejemplo, a metodología y construcciones para aumentar el nivel de alcaloides nicotínicos en una planta de *Nicotiana*. También se describen células que se manipulan por ingeniería genética para producir alcaloides nicotínicos y compuestos relacionados, cuando de otro modo no los producirían.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

15 **[0002]** Actualmente se conocen varias enzimas de la biosíntesis de nicotina. Por ejemplo, se ha clonado el gen de la quinolato-fosforribosiltransferasa de tabaco (*QPT*), véanse la patente de los EE. UU. n° 6.423.520 y Sinclair y col., Plant Mol. Biol. 44: 603-17 (2000), y su supresión proporciona reducciones significativas de nicotina en plantas transgénicas de tabaco. Xie y col., Recent Advances in Tobacco Science 30: 17-37 (2004). Igualmente, se ha observado que la supresión de una secuencia endógena de putrescina-metiltransferasa (*PMT*) reduce los 20 niveles de nicotina pero aumenta los niveles de anatabina de dos a seis veces. Hibi y col., Plant Cell 6: 723-35 (1994); Chintapakorn y Hamill, Plant Mol. Biol. 53: 87-105 (2003); Steppuhn y col., PLoS Biol. 2:8:e217: 1074-1080 (2004).

25 **[0003]** Mientras que los esfuerzos de investigación anteriores se han centrado en el uso de enzimas de la biosíntesis de nicotina para reducir la nicotina en las plantas, muy pocas investigaciones han abordado el papel de las enzimas de la biosíntesis de nicotina en el aumento de la síntesis de alcaloides nicotínicos. Esta falta de datos de regulación por aumento puede atribuirse al hecho de que la sobreexpresión de un gen conocido de la biosíntesis de alcaloides nicotínicos, como *PMT* o *QPT*, no tiene necesariamente que aumentar la producción y acumulación de metabolitos secundarios en la planta. Es decir, no necesariamente porque la regulación por disminución de un gen 30 de la biosíntesis de alcaloides nicotínicos reduzca la producción y acumulación de alcaloides, la sobreexpresión de este mismo gen de biosíntesis de alcaloides nicotínicos va a aumentar la producción y acumulación de alcaloides nicotínicos.

35 **[0004]** Debido a la escasez de investigación, existe la necesidad de identificar genes que aumenten la biosíntesis y acumulación de la nicotina. Por ejemplo, dado que los alcaloides nicotínicos desempeñan un papel importante en la protección de las plantas contra insectos y herbívoros, probablemente sea ventajoso aumentar la síntesis de alcaloides nicotínicos en una planta huésped. Desde el punto de vista de los herbívoros, el aumento de la síntesis y acumulación de nicotina proporcionará un modo respetuoso con el medio ambiente de intervenir en las interacciones entre planta y plaga.

40 **[0005]** Desde el punto de vista de la industria tabaquera, en que la nicotina es el componente física y fisiológicamente activo del humo de los cigarrillos, puede ser ventajoso aumentar el contenido de nicotina en el tabaco por ingeniería genética. Los estudios de investigación demuestran que cuando se añade físicamente nicotina adicional al tabaco de los cigarrillos de una fuente externa, los fumadores inhalan menor cantidad de los 45 componentes más dañinos del humo como alquitrán y monóxido de carbono. Véase Armitage y col., Psychopharmacology 96: 447-53 (1988), Fagerström, Psychopharmacology 77: 164-67 (1982), Russell, Nicotine and Public Health 15: 265-84 (2000) y Woodman y col., European Journal of Respiratory Disease 70: 316-21 (1987). Asimismo, un informe del Instituto de Medicina (IOM) de los EE. UU. sobre productos potenciales de exposición reducida (PREP) concluyó que otra estrategia general para reducir el daño del tabaco es la retención de nicotina a 50 niveles agradables o adictivos mientras se reducen los componentes más tóxicos. Véase CLEARING THE SMOKE, ASSESSING THE SCIENCE BASE FOR TOBACCO HARM REDUCTION, IOM, en la página 29 (2001); publicación a la que la industria del tabaco normalmente hace referencia como "informe del IOM".

55 **[0006]** Además de las aplicaciones más tradicionales para productos con aumento de nicotina, como cigarrillos y otros productos de tabaco, algunos estudios farmacológicos recientes sugieren un papel terapéutico para la nicotina y compuestos relacionados. Por ejemplo, varios grupos de investigación están estudiando actualmente fármacos que reconocen selectivamente receptores de nicotina como un modo de tratar deficiencias cognitivas como la enfermedad de Alzheimer, la esquizofrenia y la pérdida de memoria relacionada con la edad. Singer, "The Upside to Nicotine", Technology Review (28 de julio de 2006). Se ha demostrado que ligandos de 60 receptores de acetilcolina, como la nicotina, tienen efectos sobre la atención, la cognición, el apetito, la drogadicción, la memoria, la actividad extrapiramidal, la actividad cardiovascular, el dolor y la motilidad y actividad gastrointestinal. Patente de los EE. UU. n° 5.852.041. Por lo tanto, existen beneficios terapéuticos de la nicotina y los compuestos relacionados y por lo tanto existe la necesidad de mejores procedimientos para su producción.

65 **[0007]** Por consiguiente, existe una necesidad continua de identificar genes adicionales cuya expresión pueda modificarse para aumentar el contenido de alcaloides nicotínicos en las plantas, en particular de nicotina en plantas

de *N. tabacum*, así como para producir nicotina y compuestos relacionados en células no productoras de nicotina.

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCIÓN

5 [0008] La presente invención se define mediante las reivindicaciones. Los aspectos/casos de la presente divulgación que constituyen la presente invención se definen mediante las reivindicaciones.

[0009] Existen cuatro genes, *A622*, *NBB1*, *PMT* y *QPT*, en los que se puede influir para aumentar los niveles de alcaloides nicotínicos en plantas de *Nicotiana*, así como para sintetizar alcaloides nicotínicos y compuestos 10 relacionados en células no productoras de nicotina.

[00010] En un aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para aumentar los alcaloides nicotínicos, como nicotina, en una planta de *Nicotiana*, mediante la sobreexpresión de *A622* con respecto a una planta de control. En un aspecto se *A622* se sobreexpresa. En otro aspecto, *NBB1* se sobreexpresa. Según la presente 15 invención, *A622* y *NBB1* se sobreexpresan. En otra realización más, se sobreexpresan *A622* y *NBB1* y al menos uno de *QPT* y *PMT* también se sobreexpresa. En otra realización más, se sobreexpresan *QPT* y *A622*.

[00011] En otro caso, una planta con aumento de nicotina y productos derivados de la misma se producen mediante cualquier procedimiento de sobreexpresión de uno o más de *A622*, *NBB1*, *PMT* y *QPT*. En un aspecto 20 adicional, los productos se seleccionan del grupo que consiste en un cigarrillo, un producto farmacéutico y un producto nutracéutico.

[00012] En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para la producción de alcaloides nicotínicos, que comprende la expresión heteróloga de *NBB1* y *A622* en una planta o célula que de otro modo no 25 produce alcaloides nicotínicos. En un caso, la expresión de *NBB1* y *A622* tiene lugar en una célula seleccionada del grupo que consiste en una célula bacteriana, de levadura, hongo filamentoso, alga, mamífero o insecto.

[00013] En otro caso, se produce una planta con aumento de alcaloides nicotínicos por la expresión heteróloga de *NBB1* y *A622* en una planta o célula que de otro modo no produce alcaloides nicotínicos. En otro caso, se 30 produce un producto con alcaloides nicotínicos mediante la expresión heteróloga de *NBB1* y *A622* en una planta o célula que de otro modo no produce alcaloides nicotínicos.

[00014] En otro aspecto, se describe un procedimiento para la producción comercial de un alcaloide nicotínico que comprende (a) proporcionar una pluralidad de células que expresan *A622* y *NBB1* y (b) obtener dicho alcaloide 35 nicotínico de dicha pluralidad.

[00015] En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para aumentar la nicotina en una planta, que comprende la sobreexpresión de *PMT* y *QPT* con respecto a una planta de control. En un caso, se produce una planta con aumento de nicotina. En otro caso, se produce un producto con aumento de nicotina.

40 [00016] En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para la producción de la enzima *NBB1* que comprende la transformación de una célula con una molécula de ácido nucleico aislada que codifica *NBB1* y el cultivo de la célula transformada en condiciones en las que se produce la enzima *NBB1*. En un aspecto, las células transformadas pueden seleccionarse del grupo que consiste en células bacterianas, de levadura, hongos 45 filamentosos, algas, plantas verdes y mamíferos.

[00017] En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para aumentar la nicotina y el rendimiento en una planta de *Nicotiana* que comprende a) el cruzamiento de una planta de *Nicotiana* con aumento de nicotina con una planta de *Nicotiana* de alto rendimiento; y b) la selección de una planta de *Nicotiana* de la 50 descendencia con aumento de nicotina y del rendimiento. En un caso, se produce una planta con aumento de nicotina y del rendimiento.

[00018] En un caso, la planta con aumento de nicotina se produce por: a) transformación de una planta de *Nicotiana* con una construcción que comprende, en la dirección 5' a 3', un promotor unido operativamente a un ácido 55 nucleico heterólogo que codifica una enzima que aumenta la síntesis de nicotina; b) regeneración de plantas transgénicas de *Nicotiana* a partir de la planta transformada; y c) selección de una planta transgénica de *Nicotiana* con un aumento del contenido de nicotina con respecto a una planta de control. En otro caso, el ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en *QPT*, *PMT*, *A622* y *NBB1*.

60 [00019] En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para aumentar la nicotina y el rendimiento en una planta de *Nicotiana* que comprende: (a) la transformación de una planta de *Nicotiana* con (i) una primera construcción que comprende, en la dirección 5' a 3', un promotor unido operativamente a un ácido nucleico heterólogo que codifica una enzima que aumenta la síntesis de nicotina; y (ii) una segunda construcción que comprende, en la dirección 5' a 3', un promotor unido operativamente a un ácido nucleico heterólogo que codifica 65 una enzima que aumenta el rendimiento; (b) la regeneración de plantas transgénicas de *Nicotiana* a partir de la planta transformada; y (c) la selección de una planta transgénica de *Nicotiana* con un aumento del contenido de

nicotina y un aumento del rendimiento con respecto a una planta de control.

[00020] En un caso, la primera construcción comprende un ácido nucleico que codifica una enzima seleccionada del grupo que consiste en QPT, PMT, A622 y NBB1. En otro caso, se produce una planta con aumento de nicotina y 5 del rendimiento.

[00021] En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para aumentar la nicotina en *N. tabacum* que comprende la sobreexpresión de *PMT* con respecto a una planta de control.

10 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[00022]

FIGURA 1: análisis de transferencia de ARN de la expresión de *NBB1*

15

FIGURA 2: alineamiento de NBB1 con la enzima del puente de la berberina de *Eschscholzia californica* (EcBBE)

20

FIGURA 3: árbol filogenético construido con las secuencias del polipéptido NBB1 y proteínas de plantas similares a BBE

25

FIGURA 4A: región de ADN-T de pTobRD2-DEST

30

FIGURA 4B: región de ADN-T de pTobRD2-NBB1ox

35

FIGURA 4C: región de ADN-T de pTobRD2-A622ox

FIGURA 4D: región de ADN-T de pTobRD2-A622ox-NBB1ox

40

FIGURA 4E: región de ADN-T de pBI101H-E2113-DEST

45

FIGURA 4F: región de ADN-T de pE12355SΩ-NBB1

50

FIGURA 5A: análisis de inmunotransferencia de NBB1 en raíces capilares de tabaco

55

FIGURA 5B: análisis de inmunotransferencia de A622 en raíces capilares de tabaco

FIGURA 6: contenido de alcaloides nicotínicos en raíces capilares de TobRD2-NBB1 (TN), TobRD2-A622 (TA) y TobRD2-NBB1-A622 (TNA)

60

FIGURA 7: expresión de la proteína A622 en plantas transgénicas de *A. belladonna*

FIGURA 8: plantas transgénicas de *A. belladonna* que expresan NBB1 y A622

65

FIGURA 9: síntesis de nicotina en raíces capilares transgénicas de *A. belladonna* que expresan NBB1 y A622

70

FIGURA 10: perfil de EM de la nicotina sintetizada en raíces capilares transgénicas de *A. belladonna* que expresan NBB1 y A622

75

FIGURA 11A: región de ADN-T de pA622pro-DEST

80

FIGURA 11B: región de ADN-T de pA622pro-PMTox

85

FIGURE 11C: región de ADN-T de pTobRD2-PMTox

90

FIGURE 11D: región de ADN-T de pA622pro-QPTox

95

FIGURE 11E: región de ADN-T de pTobRD2-QPTox

100

FIGURE 11F: región de ADN-T de pA622pro-PMTox-QPTox

105

FIGURA 11G: región de ADN-T de pTobRD2-PMTox-QPTox

110

FIGURA 12: contenido de nicotina en hojas de plantas de tabaco transformadas con A622pro-PMTox (AP-1 a AP-24). AG-1 a AG-4 son plantas de control transformadas con A622-GUS

115

FIGURA 13: contenido de nicotina en hojas de plantas de tabaco transformadas con TobRD2-PMTox (TP-1 a TP-

14). TG-1 a TG-3 son plantas de control transformadas con TobRD2-GUS

FIGURA 14: contenido de nicotina en hojas de plantas de tabaco transformadas con A622pro-QPTox (AQ-1 a AQ-15). AG-1 a AG-4 son plantas de control transformadas con A622-GUS

5

FIGURA 15: contenido de nicotina en hojas de plantas de tabaco transformadas con TobRD2-QPTox (TQ-1 a TQ-14). TG-1 a TG-3 son plantas de control transformadas con TobRD2-GUS

FIGURA 16: contenido de nicotina en hojas de plantas de tabaco transformadas con A622pro-PMTox-QPTox (APQ-10 1 a APQ-27). AG-1 a AG-3 son plantas de control transformadas con A622-GUS

FIGURA 17: contenido de nicotina en hojas de plantas de tabaco transformadas con pTobRD2-PMTox-QPTox (TPQ-1 a TPQ-24). TG-1 a TG-3 son plantas de control transformadas con TobRD2-GUS

15 **FIGURA 18A:** región de ADN-T de pGWB2

FIGURA 18B: región de ADN-T de p35S-NBB1

FIGURA 18C: región de ADN-T de p35S-NBB1

20

FIGURA 19: análisis de inmunotransferencia de líneas de *Arabidopsis thaliana* transformadas con casetes de 35S-A622-35S-NBB1-35S-PMT

FIGURA 20: plantas transgénicas de *Arabidopsis* que coexpresan NBB1, A622 y PMT

25

FIGURA 21A: confirmación de la presencia de A622 y NBB1 en bácmidos recombinantes

FIGURA 21B: detección de A622 y NBB1 en células Sf9 de insectos y eluatos de columnas de Ni-NTA

30 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

[00023] La presente invención se refiere al aumento de los alcaloides nicotínicos en plantas de *Nicotiana*. La divulgación también se refiere a la producción de alcaloides nicotínicos en células que de otro modo no los producirían. Según se describe a continuación, los presentes inventores se dieron cuenta de que podía influirse en 35 cuatro genes, A622, NBB1, QPT y PMT, para conseguir un aumento de los niveles de alcaloides nicotínicos en plantas de *Nicotiana*. Es decir, la sobreexpresión de cualquiera de estos cuatro genes aumenta los alcaloides nicotínicos en *Nicotiana*. Es posible obtener mayores aumentos de alcaloides nicotínicos en *Nicotiana* mediante la sobreexpresión simultánea de al menos dos de los cuatro genes, tales como QPT y PMT.

40 **[00024]** A622 y NBB1 pueden introducirse en plantas o células no productoras de nicotina para conseguir así que produzcan nicotina o compuestos relacionados.

[00025] Además de proporcionar una metodología para aumentar los alcaloides nicotínicos en *Nicotiana*, la invención proporciona también el aumento simultáneo de los alcaloides nicotínicos y el rendimiento en *Nicotiana*. 45 Conforme a este aspecto, el aumento de los alcaloides nicotínicos y el rendimiento puede conseguirse mediante una combinación de técnicas de ingeniería genética y mejora convencional.

[00026] Todos los términos técnicos empleados en esta memoria descriptiva son de uso común en bioquímica, 50 biología molecular y agricultura: por consiguiente, son entendidos por los expertos en la técnica a la que pertenece esta invención. Estos términos técnicos pueden encontrarse, por ejemplo, en: MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 3^a edición, vols. 1-3, ed. Sambrook y Russel, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 2001; CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, ed. Ausubel y col., Greene Publishing Associates y Wiley-Interscience, Nueva York, 1988 (con actualizaciones periódicas); SHORT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY: A COMPENDIUM OF METHODS FROM CURRENT PROTOCOLS IN 55 MOLECULAR BIOLOGY, 5^a ed., vols. 1-2, ed. Ausubel y col., John Wiley & Sons, Inc., 2002; GENOME ANALYSIS: A LABORATORY MANUAL, vols. 1-2, ed. Green y col., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1997; PRODUCTION, CHEMISTRY AND TECHNOLOGY, D. L. Davis y M. T. Nielson (eds.) Coresta, 1999 (denominado comúnmente como "informe del IOM").

60 **[00027]** La metodología que incluye técnicas de biología de plantas se describe en este documento y también se describe en detalle en tratados como METHODS IN PLANT MOLEULAR BIOLOGY: A LABORATORY COURSE MANUAL, ed. Maliga y col., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1995. Diversas técnicas que usan PCR se describen, por ejemplo en Innis y col., PCR PROTOCOLS: A GUIDE TO METHODS AND APPLICATIONS, Academic Press, San Diego, 1990 y en Dieffenbach y Dveksler, PCR PRIMER: A LABORATORY 65 MANUAL, 2^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 2003. Los pares de cebadores para PCR pueden derivarse de secuencias conocidas por técnicas conocidas, como el uso de programas de

ordenador destinados a este fin, por ejemplo, Primer, versión 0.5, 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA, EE. UU. Los procedimientos para la síntesis química de ácidos nucleicos se describen, por ejemplo, en Beaucage y Caruthers, Tetra. Letts. 22: 1859-62 (1981) y Matteucci y Caruthers, J. Am. Chem. Soc. 103: 3185 (1981).

5

[00028] Las digestiones con enzimas de restricción, fosforilaciones, ligaciones y transformaciones se llevaron a cabo según se describe en Sambrook y col., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2^a ed. (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press. Todos los reactivos y materiales usados para el cultivo y mantenimiento de las células bacterianas se obtuvieron de Aldrich Chemicals (Milwaukee, Wis. EE. UU.), DIFCO Laboratories (Detroit, Mich. EE. UU.), Invitrogen (Gaithersburg, Md., EE. UU.) o Sigma Chemical Company (San Luis, Mo. EE. UU.), a menos que se especifique de otro modo.

[00029] Los términos "codificante" y "codifica" se refieren al proceso por el que un gen, a través de los mecanismos de transcripción y traducción, proporciona información a una célula, a partir de la cual puede ensamblarse una serie de aminoácidos en una secuencia aminoacídica específica para producir una enzima activa. A causa de la degeneración del código genético, algunos cambios de bases en la secuencia de ADN no cambian la secuencia aminoacídica de una proteína. Por lo tanto, se entiende que se contemplan modificaciones en las secuencias de ADN que codifican A622 y NBB1, respectivamente, que no afectan sustancialmente a las propiedades funcionales de cada una de las enzimas.

20

I. Aumento de los alcaloides nicotínicos en *Nicotiana* mediante la sobreexpresión de al menos uno de A622 y NBB1.

[00030] Aunque A622 y NBB1 se habían identificado previamente, antes de la presente divulgación, el campo desconocía totalmente que la sobreexpresión de al menos uno de A622 y NBB1 en una planta de *Nicotiana* aumentara el contenido de alcaloides nicotínicos. Por consiguiente, la presente divulgación abarca tanto la metodología como las construcciones para el aumento del contenido de alcaloides nicotínicos en una planta de *Nicotiana*, mediante la sobreexpresión de al menos uno de A622 y NBB1. La sobreexpresión de los dos genes, A622 y NBB1, según la presente invención, aumenta aún más los niveles de alcaloides nicotínicos en una planta de *Nicotiana*.

[00031] En la presente descripción, un "alcaloide" es un compuesto básico con nitrógeno que se encuentra en plantas y es producido por el metabolismo secundario. Un "alcaloide nicotínico" es nicotina o un alcaloide relacionado estructuralmente con la nicotina. En el caso del tabaco, el contenido de alcaloides nicotínicos y el contenido de alcaloides totales se usan como sinónimos.

[00032] Algunos alcaloides nicotínicos principales de *Nicotiana* ilustrativos incluyen, pero no se limitan a nicotina, nornicotina, anatabina y anabasina. Algunos alcaloides secundarios ilustrativos de *Nicotiana* incluyen, pero no se limitan a anatallina, N-metilanatabina, N-metilanabasina, miosmina, anabaseína, N'-formilnornicotina, nicotirina y cotinina. Otros alcaloides secundarios en tabaco se describen, por ejemplo en Hecht, S. S. y col., Accounts of Chemical Research 12: 92-98 (1979); Tso, T. C., PRODUCTION, PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY OF TOBACCO PLANT, Ideals Inc. (Beltsville, MD), 1990.

[00033] Muchas otras bases de piridilo además de numerosos derivados de nornicotina, anatabina y anabasina son alcaloides nicotínicos de los que se ha descrito que están presentes en tabaco y para los fines de la presente divulgación deberán incluirse dentro de los alcaloides secundarios en *Nicotiana*. La mayoría de estos, así denominados, alcaloides nicotínicos secundarios están presentes en cantidades inferiores a 50 µg/g (con respecto a peso seco) y muchos otros están presentes en cantidades de nanogramos. Bush, L. P., y col., "Biosynthesis and metabolism in nicotine and related alkaloids" en NICOTINE AND RELATED ALKALOIDS, J. W. Gorrod y J. Wahren (eds.), Chapman y Hall, London (1993); Bush, L. P., y col., "Alkaloid Biosynthesis" en TOBACCO PRODUCTION, CHEMISTRY AND TECHNOLOGY, D. L. Davis y M. T. Nielson (eds.) Coresta, 1999. Las estructuras químicas de varios alcaloides nicotínicos se presentan, por ejemplo, en Felpin y col., J. Org. Chem. 66: 6305-312 (2001).

[00034] La nicotina es el principal alcaloide en *N. tabacum*, así como en del 50 al 60 % de las otras especies de *Nicotiana*. Dependiendo de la variedad, de aproximadamente el 85 a aproximadamente el 95 % de los alcaloides totales de *N. tabacum* es nicotina. Bush y col. (1999), referencia anterior; Hoffmann a col., Journal of Toxicology and Environmental Health 41: 1-52 (1994). Sobre la base de la acumulación de alcaloides en las hojas, nornicotina, anatabina y anabasina son los otros alcaloides principales en *N. tabacum*. Anatabina no es normalmente el alcaloide principal en ninguna especie de *Nicotiana*, pero se acumula en relativamente grandes cantidades en tres especies; anabasina es el alcaloide principal en cuatro especies. Nornicotina es el alcaloide principal en del 30 al 40 % de las especies de *Nicotiana*.

[00035] En esta descripción, "expresión" indica la producción del producto proteínico codificado por una secuencia nucleotídica. "Sobreexpresión" se refiere a la producción de un producto proteínico en un organismo transgénico que supera los niveles de producción en un organismo normal y no manipulado por ingeniería genética. Como es convencional en la técnica, las secuencias nucleotídicas se indican en letra cursiva (por ejemplo, PTM),

mientras que las secuencias polipeptídicas no se escriben en letra cursiva (por ejemplo, PMT).

•A622

5 [00036] Se ha descrito que A622 muestra el mismo patrón de expresión que PMT. Shoji y col., Plant Cell Physiol. 41: 1072-76 (2000a) y Plant Mol. Biol. 50: 427-40 (2002). Ambos A622 y PMT se expresan específicamente en raíces, especialmente en el córtex y la endodermis de las partes apicales de las raíces y los pelos radicales. Además, A622 y PMT tienen un patrón de expresión común en respuesta a la regulación por N/C y la estimulación por metiljasmonato. A622 se induce en las raíces de *Nicotiana tabacum* en respuesta a lesiones de los tejidos 10 aéreos Cane y col., Func. Plant Biol. 32: 305-20 (2005). En *N. glauca*, A622 se induce en hojas lesionadas en condiciones que resultan en la inducción de QPT. Sinclair y col., Func. Plant Biol. 31: 721-29 (2004).

[00037] Los locus *NIC1* y *NIC2* son dos locus genéticos independientes en *N. tabacum*, anteriormente designados como A y B. Las mutaciones *nic1* y *nic2* reducen los niveles de expresión de las enzimas de la 15 biosíntesis de nicotina y el contenido de nicotina; generalmente el contenido de nicotina del tipo natural > el de plantas homocigotas para *nic2* > el de plantas homocigotas para *nic1* > el de plantas homocigotas para *nic1* y *nic2*. Legg y Collins Can. J. Cyto. 13: 287 (1971); Hibi y col., Plant Cell 6: 723-35 (1994); Reed y Jelesko, Plant Science 167: 1123 (2004). En esta descripción, "*nic1nic2*" indica genotipos de tabaco homocigotos para las dos mutaciones *nic1* y *nic2*.

20 [00038] La secuencia de ácido nucleico de A622 (SEQ ID NO: 3) ha sido determinada. Hibi y col. (1994), referencia anterior. La proteína A622 (SEQ ID NO: 4) codificada por esta secuencia de ácido nucleico es similar a las isoflavona-reductasas (IFR) y contiene un motivo de unión a NAPDH. A622 muestra homología con TP7, una reductasa de éter bencílico de fenilcumarano de tabaco (PCBER), implicada en la biosíntesis de lignina. Shoji y col. 25 (2002), referencia anterior. Sin embargo, no se observó actividad de PCBER al ensayar la proteína A622 expresada en *E. coli* con dos sustratos diferentes.

[00039] Sobre la base de la corregulación de A622 y PMT y la similitud de A622 a las IFR, se propuso para 30 A622 una función como reductasa en las etapas finales de la síntesis de alcaloides nicotínicos. Hibi y col. (1994); Shojo y col. (2000a). Sin embargo, no se observó ninguna actividad de IFR al expresar la proteína en bacterias (mismas referencias). Por lo tanto, de aquí no se dedujo que la sobreexpresión de A622 aumentara los niveles de nicotina.

[00040] La "expresión de A622" se refiere a la biosíntesis de un producto génico codificado por SEQ ID NO: 3. 35 La "sobreexpresión de A622" indica un aumento de la expresión de A622. La sobreexpresión de A622 ocasiona un aumento del contenido de alcaloides nicotínicos en una planta o célula en la que tiene lugar dicha sobreexpresión. La sobreexpresión de A622 incluye la biosíntesis de un producto génico codificado por los siguientes: la secuencia de ácido nucleico de longitud completa de A622 desvelada en Hibi y col. (1994), referencia anterior (SEQ ID NO: 3), SEQ ID NO: 3B y todas las variantes polinucleotídicas de A622.

40 •NBB1

[00041] La secuencia de NBB1 se identificó como un ADNc preparado a partir de una colección de ADNc derivada de *Nicotiana sylvestris*, conforme al protocolo de Katoh y col., Proc. Japan Acad. 79 (Serie B): 151-54 45 (2003). Al igual que A622, NBB1 está controlado los locus reguladores de la biosíntesis de nicotina, *NIC1* y *NIC2*. NBB1 y PMT tienen el mismo patrón de expresión en las plantas de tabaco. La participación de NBB1 en la biosíntesis de nicotina está indicada por el hecho de que NBB1, al igual que PMT y A622, está bajo el control de los genes N/C y muestra un patrón de expresión similar.

50 [00042] La secuencia de ácido nucleico de NBB1 (SEQ ID NO: 1) ha sido determinada y codifica la secuencia polipeptídica mostrada en SEQ ID NO: 2. La "expresión de NBB1" se refiere a la biosíntesis de un producto génico codificado por SEQ ID NO: 1. La "sobreexpresión de NBB1" indica un aumento de la expresión de NBB1. La sobreexpresión de NBB1 ocasiona un aumento del contenido de alcaloides nicotínicos en una planta o célula en la que tiene lugar dicha sobreexpresión. La sobreexpresión de NBB1 incluye la biosíntesis de un producto génico 55 codificado por los siguientes: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 1B y todas las variantes polinucleotídicas de NBB1.

II. Aumento de los alcaloides nicotínicos en *N. tabacum* mediante la sobreexpresión de PMT

[00043] El único informe anterior que demuestra la sobreexpresión de un gen de la biosíntesis de nicotina en 60 una especie de *Nicotiana* fue en *N. sylvestris*, en la que la sobreexpresión de PMT resultó en un aumento moderado del 40 % de la nicotina en la hoja. Sato y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 98: 367-72 (2001). Mientras que la sobreexpresión de un gen de la biosíntesis de alcaloides nicotínicos en una especie vegetal como *N. sylvestris*, resulta en un aumento de la acumulación de metabolitos secundarios, esto no quiere decir necesariamente que se vaya a producir una acumulación similar de metabolitos secundarios en una especie relacionada como *N. tabacum*. 65 Saitoh y col., Phytochemistry 24: 477-80 (1985). Esto es especialmente relevante para la sobreexpresión de PMT, dado que *N. tabacum* contiene cinco genes PMT expresados y *N. sylvestris* contiene tres genes PMT expresados.

Hashimoto y col., Plant Mol. Biol. 37: 25-37 (1998); Reichers y Timko, Plant Mol. Biol. 41: 387-401 (1999). De hecho, cuando el gen *PTM* de *N. tabacum* se expresó en exceso en cultivos de raíces capilares de *Duboisia*, los niveles de nicotina, hiosciamina y escopolamina no aumentaron significativamente. Moyano y col., Phytochemistry 59, 697-702 (2002). Igualmente, la sobreexpresión del mismo gen *PTM* en plantas y cultivos de raíces capilares transgénicos de 5 *Atropa belladonna* no afectó a los niveles de hiosciamina y escopolamina. Sato y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 98: 367-72 (2001); Rothe y col., J. Exp. Bot. 54: 2065-070 (2003).

[00044] En especies solanáceas, como el tabaco, parece ser que la misma ruta de biosíntesis de alcaloides en dos especies de plantas relacionadas puede regularse de manera diferente y la sobreexpresión de un gen dado no 10 conduce necesariamente a un patrón similar de acumulación de metabolitos secundarios. Moyano y col., J. Exp. Bot. 54: 203-11 (2003). Por ejemplo, en el análisis de sesenta especies de *Nicotiana* se observó una variación considerable en el contenido de alcaloides totales y en el perfil de alcaloides entre las especies. Saitoh y col., Phytochemistry 24: 477-80 (1985). Por ejemplo, mientras que *N. sylvestris* mostró el mayor contenido en peso seco de alcaloides totales (la suma de nicotina, nornicotina, anabasina y anatabina), con 29.600 µg/g o el 2,96 %, *N. alata* 15 mostró el menor contenido, con 20 µg/g o el 0,002 %. La proporción de nicotina en relación con los alcaloides totales en las hojas de *N. sylvestris* fue de aproximadamente el 80 %, en comparación con aproximadamente el 95 % para *N. tabacum* L. (misma referencia). Además, la proporción de nornicotina en relación con los alcaloides totales en las hojas de *N. sylvestris* fue del 19,1 % en comparación con el 3 % para *N. tabacum* L. (misma referencia). Sobre la base de estas amplias variaciones entre las sesenta especies de *Nicotiana*, Saitoh y col. concluyen que la cantidad y 20 la proporción de alcaloides totales e individuales presentes en una planta depende de la especie y que no parece existir una correlación clara entre el patrón de alcaloides y la clasificación del género *Nicotiana* (página 477 en la misma referencia).

[00045] Por consiguiente, la presente divulgación describe metodología y construcciones para aumentar los 25 alcaloides nicotínicos en *N. tabacum* mediante la sobreexpresión de *PTM*.

[00046] La secuencia de ácido nucleico de *PTM* (SEQ ID NO: 7) ha sido determinada y codifica la secuencia polipeptídica mostrada en SEQ ID NO: 8. La "expresión de *PTM*" se refiere a la biosíntesis de un producto génico codificado por SEQ ID NO: 7. La "sobreexpresión de *PTM*" indica un aumento de la expresión de *PTM*. La 30 sobreexpresión de *PTM* ocasiona un aumento del contenido de alcaloides nicotínicos en una planta o célula en la que tiene lugar dicha sobreexpresión. La sobreexpresión de *PTM* incluye la biosíntesis de un producto génico codificado por los siguientes: la secuencia de ácido nucleico de longitud completa de *PTM* desvelada en Hibi y col. (1994), referencia anterior (SEQ ID NO: 7), SEQ ID NO: 7B y todas las variantes polinucleotídicas de *PTM*.

35 III. Aumento de los alcaloides nicotínicos en *Nicotiana* mediante la sobreexpresión de *QPT* y *PMT*

[00047] Hasta ahora no se sabía que la sobreexpresión de *QPT* y *PTM* aumentara sinérgicamente los alcaloides nicotínicos. Es decir, que fuera posible alcanzar mayores aumentos de los niveles de nicotina mediante la sobreexpresión de *QPT* y *PTM*, en comparación con la sobreexpresión de solo *QPT* o *PTM*. Conforme a este 40 aspecto de la divulgación, se introduce una construcción de ácido nucleico que comprende ambos *QPT* y *PMT* en una célula vegetal de *Nicotiana*.

[00048] La secuencia de ácido nucleico de *QPT* (SEQ ID NO: 5) ha sido determinada y codifica la secuencia polipeptídica mostrada en SEQ ID NO: 6. La "expresión de *QPT*" se refiere a la biosíntesis de un producto génico codificado por SEQ ID NO: 5. La "sobreexpresión de *QPT*" indica un aumento de la expresión de *QPT*. La sobreexpresión de *QPT* ocasiona un aumento del contenido de alcaloides nicotínicos en una planta o célula en la que tiene lugar dicha sobreexpresión. La sobreexpresión de *QPT* incluye la biosíntesis de un producto génico codificado por los siguientes: la secuencia de ácido nucleico de longitud completa de *QPT* según se desvela en la 45 patente de los EE. UU. n° 6.423.520 (SEQ ID NO: 5), SEQ ID NO: 5B y todas las variantes polinucleotídicas de *QPT*.

50 IV. Aumento de los alcaloides nicotínicos en *Nicotiana* mediante la sobreexpresión de al menos dos o más de *A622*, *NBB1*, *QPT* y *PMT*

[00049] Aunque es bien sabido que *QPT* desempeña un papel en la biosíntesis de nicotina, véase el 55 documento WO 98/56923, la presente divulgación contempla mayores aumentos de la síntesis de nicotina mediante la sobreexpresión de al menos dos o más de *A622*, *NBB1*, *QPT* y *PMT* en *Nicotiana*. Conforme a este aspecto de la divulgación se introduce una construcción de ácido nucleico que comprende al menos dos de *A622*, *NBB1*, *QPT* y *PMT* en una célula vegetal de *Nicotiana*. Una construcción de ácido nucleico ilustrativa de la presente invención 60 puede comprender *QPT* y *A622*.

V. Aumento de los alcaloides nicotínicos y el rendimiento en *Nicotiana*

[00050] Las plantas con aumento de nicotina de la invención pueden producirse por mejora convencional o cruzamientos, según se describen por Wemsman y col., en 2 PRINCIPLES OF CULTIVAR DEVELOPMENT: CROP 65 SPECIES (Macmillan 1997). Por ejemplo, se emplea un transformante manipulado por ingeniería genética, regenerado a partir de material de tabaco que contiene el transgén adecuado, para introducir por introgresión un

carácter de alto nivel de nicotina en un fondo genético comercialmente aceptable y deseable, con lo que se obtiene un cultivar o variedad de tabaco que combina un alto nivel de nicotina con dicho fondo genético deseable.

[00051] De manera similar, por ejemplo, puede producirse una planta manipulada por ingeniería genética que exprese en exceso *QPT* y *A622* mediante el cruzamiento de una planta transgénica que expresa en exceso *QPT* con una planta transgénica que expresa en exceso *A622*. Después de varios ciclos sucesivos de cruzamiento y selección, puede seleccionarse una planta manipulada por ingeniería genética que expresa en exceso *QPT* y *A622*.

[00052] Mientras que cualquier gen deseable puede introducirse por introgresión en una variedad de alto nivel de nicotina, existe la necesidad crítica de introducir un carácter de alto nivel de nicotina en el fondo genético de un tabaco de alto rendimiento. Varios estudios indican que las mejoras del rendimiento han sido dificultadas por la correlación negativa que existe con la concentración de nicotina. PRODUCTION, CHEMISTRY AND TECHNOLOGY, D. L. Davis y M. T. Nielson (eds.) Coresta, en la página 46 (1999). En sus reflexiones sobre la mejora del tabaco, el Dr. Earl Wernsman afirma que la selección continuada en busca solamente de rendimiento resultará pronto en una población con una concentración de nicotina en la hoja curada tan baja que dichos tabacos serán inaceptables para la industria. Wernsman, Recent Advances in Tobacco, Science 25: 5-35 (1999). Wernsman postula que pueden necesitarse procedimientos genéticos de regulación por aumento de la síntesis de nicotina para permitir aumentos adicionales de la capacidad de rendimiento, mientras se mantiene la concentración de nicotina (misma referencia).

[00053] Por consiguiente, la presente divulgación proporciona un modo de corregir la “correlación negativa” entre el rendimiento y el contenido de nicotina en plantas de *Nicotiana* mediante la sobreexpresión de un gen que codifica una enzima de la biosíntesis de nicotina en una planta de *Nicotiana* de alto rendimiento. Las enzimas de la biosíntesis de nicotina de ejemplo incluyen, pero no se limitan a *QPTasa*, *PMTasa*, *A622*, *NBB1*, arginina-descarboxilasa (*ADC*), metilputrescina-oxidasa (*MPO*), NADH-deshidrogenasa, ornitina-descarboxilasa (*ODC*) y S-adenosilmetionina-sintetasa (*SAMS*). Las plantas con aumento de nicotina que resultan de aquí se cruzan después con cualquier fondo genético comercialmente aceptable y deseable que mantenga un alto rendimiento. Las plantas de *Nicotiana* de alto rendimiento adecuadas incluyen, pero no se limitan a los cultivares de *Nicotiana tabacum* K326, NC71, NC72 y RG81. Después de ciclos sucesivos de cruzamiento y selección se produce consiguientemente una planta manipulada por ingeniería genética con aumento de nicotina y del rendimiento.

[00054] Un aspecto adicional de la divulgación proporciona el cruzamiento de una planta con aumento de nicotina con una planta con aumento del rendimiento puede usarse como otra estrategia para romper la correlación negativa entre el contenido de nicotina y el rendimiento.

[00055] Los “genes de aumento del rendimiento” abarcan cualquier gen cuya expresión se correlaciona con un aumento de la capacidad de producción, según se refleja, por ejemplo, por un aumento de la producción de fotoasimilado, aumento de la tasa de crecimiento, mejor vigor, mayor rendimiento, mayor fijación de CO₂, más biomasa, aumento de la producción de semillas, mejor almacenamiento, aumento de la tolerancia a enfermedades, aumento de la tolerancia a insectos, aumento de la tolerancia al estrés hídrico, mayor dulzor, mejor composición de almidón, mejor acumulación y exportación de sacarosa y mejor respuesta al estrés oxidativo, en comparación con una planta de control natural.

[00056] Igualmente, una “planta con aumento del rendimiento” se refiere a una planta o cualquier porción de la misma que expresa en exceso un “gen de aumento del rendimiento” y muestra un aumento de la capacidad de producción, según se refleja, por ejemplo, por un aumento de la producción de fotoasimilado, aumento de la tasa de crecimiento, mejor vigor, mayor rendimiento, mayor fijación de CO₂, más biomasa, aumento de la producción de semillas, mejor almacenamiento, aumento de la tolerancia a enfermedades, aumento de la tolerancia a insectos, aumento de la tolerancia al estrés hídrico, mayor dulzor, mejor composición de almidón, mejor acumulación y exportación de sacarosa y mejor respuesta al estrés oxidativo, en comparación con una planta de control natural.

[00057] Por ejemplo, y sin limitar la invención de ningún modo, una planta con aumento del rendimiento puede producirse mediante la sobreexpresión de un gen relacionado con la patogénesis (PR). Se ha demostrado que la sobreexpresión de un gen *PRms* de maíz en tabaco produce plantas transgénicas de tabaco con más biomasa y mayor producción de semillas. Murillo y col., Plant J. 36: 330-41 (2003). Igualmente, una planta con aumento del rendimiento puede producirse mediante la sobreexpresión de un gen codificante de una enzima del ciclo de Calvin. Tamoi y col. Plant Cell Physiol. 47(3): 380-390 (2006). Por ejemplo, las plantas de tabaco que expresaban en exceso una fructosa-1,6-/sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa de cianobacterias mostraron mayor eficiencia fotosintética y eficiencia de crecimiento en comparación con el tabaco natural. Miyagawa y col., Nature Biotech. 19: 965-69 (2001).

[00058] La presente divulgación también contempla la producción de una planta con aumento del rendimiento y aumento de nicotina mediante la sobreexpresión de un gen que codifica una enzima de la biosíntesis de nicotina, como *QPT*, *PMT*, *A622* o *NBB1*, y la sobreexpresión de un gen de aumento del rendimiento, como *PRms*, fructosa-1,6-/sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa, fructosa-1,6-bisfosfatasa y sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa en la misma planta o célula.

VI. Producción de alcaloides nicotínicos y compuestos relacionados en células no productoras de nicotina.

[00059] A622 y NBB1 pueden introducirse en una planta o célula no productora de nicotina, con lo que se producirá nicotina o compuestos relacionados en un organismo o célula que de otro modo no produce estos compuestos. A partir de estos organismos o células manipulados pueden producirse diversos productos, incluida nicotina, análogos de nicotina y enzimas de la biosíntesis de la nicotina.

[00060] Una "planta no productora de nicotina" se refiere a cualquier planta que no produce nicotina ni alcaloides nicotínicos relacionados. Algunas plantas no productoras de nicotina ilustrativas incluyen, pero no se limitan a *Atropa belladonna* y *Arabidopsis thaliana*.

[00061] Las "células no productoras de nicotina" se refieren a células de cualquier organismo que no producen nicotina ni alcaloides nicotínicos relacionados. Algunas células ilustrativas incluyen, pero no se limitan a células de plantas como *Atropa belladonna* y *Arabidopsis thaliana*, así como células de insectos, mamíferos, levaduras, hongos, algas o bacterias.

[00062] Un "análogo de nicotina" tiene la estructura básica de la nicotina, pero puede tener, por ejemplo, diferentes sustituyentes en el anillo. Por ejemplo, un análogo de la nicotina puede sustituir un hidrógeno (-H) por el grupo metilo (-CH₃), con lo que se produce nornicotina, que es un análogo de la nicotina. Además de tener en común una estructura similar con la nicotina, los análogos de nicotina pueden producir efectos fisiológicos similares. Por ejemplo, la cotinina se ha citado por sus efectos positivos en la mejora de la concentración y la memoria y, consiguientemente, es un análogo de la nicotina. Por consiguiente, los análogos de la nicotina se definen ampliamente para cubrir todos y cada uno de los compuestos que tienen una estructura y actividad funcional similar a la de la nicotina.

25 **VII. Síntesis de compuestos mediante el uso de nuevas enzimas**

[00063] Recientemente, ha habido gran interés en la síntesis de análogos que reconozcan específicamente los receptores de la nicotina y proporcionen efectos terapéuticos para enfermedades neurodegenerativas y discapacidades cognitivas. Por ejemplo, Targacept, una empresa farmacéutica formada como extensión de R. J. Reynolds Tobacco Company, se esfuerza en desarrollar y comercializar fármacos análogos de la nicotina, basados en la activación selectiva de receptores neuronales nicotínicos de acetilcolina (NNR). Dado que la presente divulgación proporciona una nueva enzima de la biosíntesis de nicotina, puede ser valioso el uso de NBB1 solo, o NBB1 y A622 para el desarrollo de nuevos análogos de nicotina. Por ejemplo, mediante el uso de los procedimientos y construcciones de la presente invención, puede producirse un análogo de un alcaloide nicotínico al proporcionar un precursor análogo de la nicotina a un sistema de cultivo celular.

[00064] Adicionalmente, las enzimas de la presente invención pueden usarse para la síntesis *in vitro* de nicotina y compuestos relacionados. Es decir, pueden usarse A622 y NBB1 recombinantes para la síntesis o la síntesis parcial de un alcaloide nicotínico y un análogo de un alcaloide nicotínico.

Secuencias de biosíntesis de alcaloides nicotínicos

[00065] Se han identificado genes de biosíntesis de alcaloides nicotínicos en varias especies de plantas, como 45 por ejemplo, plantas de *Nicotiana*. Por consiguiente, la presente descripción abarca cualquier ácido nucleico, gen, polinucleótido o molécula de ADN, ARN, ARNm o ADNc aislada de una especie de plantas o producida sintéticamente que aumente la biosíntesis de alcaloides nicotínicos en *Nicotiana*. Adicionalmente, la expresión de tal secuencia de biosíntesis de alcaloides nicotínicos produce alcaloides nicotínicos en una célula no productora de nicotina, como una célula de un insecto. El ADN o ARN puede ser bicatenario o monocatenario. El ADN 50 monocatenario puede ser la hebra codificante, también denominada hebra sentido, o puede ser la hebra no codificante, también denominada hebra antisentido.

[00066] Se entiende que NBB1, A622, QPT y PMT incluyen las secuencias mostradas en SEQ ID NO: 1, 1B, 3, 3B, 5, 5B, 7 y 7B, respectivamente, así como moléculas de ácido nucleico compuestas por variantes de SEQ ID NO: 55 1, 1B, 3, 3B, 5, 5B, 7 y 7B, con una o más bases suprimidas, sustituidas, insertadas o añadidas, en que las variantes codifican un polipéptido con actividad de biosíntesis de alcaloides nicotínicos. Por consiguiente, las secuencias con "secuencias de bases con una o más bases suprimidas, sustituidas, insertadas o añadidas" retienen la actividad fisiológica incluso cuando la secuencia aminoácídica codificada tiene uno o más aminoácidos sustituidos, suprimidos, insertados o añadidos. Adicionalmente, pueden existir múltiples formas de A622, NBB1, QTPasa y PTMasa, que pueden deberse a la modificación postraduccional de un producto génico o a múltiples formas de los genes PMT, QPT, A622 o NBB1 respectivos. Las secuencias nucleotídicas que tienen tales modificaciones y que codifican una enzima de biosíntesis de alcaloides nicotínicos están incluidas dentro del alcance de la presente invención.

65 **[00067]** Por ejemplo, pueden suprimirse las regiones no traducidas de la cola de poli A o los extremos 5' o 3' y pueden suprimirse bases hasta llegar a la supresión de aminoácidos. También es posible sustituir bases, siempre

que no se produzcan cambios en el marco de lectura. Asimismo pueden "añadirse" bases hasta llegar a añadir aminoácidos. Sin embargo, es esencial que ninguna de tales modificaciones resulte en la pérdida de la actividad enzimática de biosíntesis de alcaloides nicotínicos. Un ADN modificado en este contexto puede obtenerse por modificación de las secuencias de bases del ADN de la invención, de modo que se sustituyan, supriman, inserten o 5 añadan aminoácidos en sitios específicos, por ejemplo, por mutación específica. Zoller y Smith, Nucleic Acid Res. 10: 6487-500 (1982).

[00068] Una secuencia de biosíntesis de alcaloides nicotínicos puede sintetizarse desde el principio a partir de las bases apropiadas, por ejemplo, mediante el uso de una secuencia proteínica apropiada desvelada en este 10 documento como guía para crear una molécula de ADN que, aunque diferente de la secuencia nativa de ADN, resulta en la producción de una proteína con la misma secuencia de aminoácidos o una secuencia similar. Este tipo de molécula sintética de ADN es útil a la hora de introducir en una célula no vegetal una secuencia de ADN que codifica una proteína heteróloga que refleja frecuencias de uso de codones diferentes (distintas de las de plantas) y que si se usa sin modificar puede resultar en una traducción ineficiente por la célula huésped.

15

[00069] Con molécula(s) de ácido nucleico "aislada(s)" se indica una molécula o moléculas de ácido nucleico, ADN o ARN, extraída(s) de su entorno nativo. Por ejemplo, las moléculas de ADN recombinante contenidas en una construcción de ADN se consideran aisladas para los fines de la presente invención. Otros ejemplos de moléculas de ADN aisladas incluyen moléculas de ADN recombinante mantenidas en células huésped heterólogas o moléculas 20 de ADN que están purificadas, parcial o sustancialmente, en disolución. Las moléculas de ARN aisladas incluyen transcritos de ARN, producidos *in vitro*, de las moléculas de ADN de la presente invención. Las moléculas de ácido nucleico aisladas de acuerdo con la presente invención incluyen además aquellas moléculas producidas sintéticamente.

25 **[00070]** Un "ácido nucleico exógeno" se refiere a un ácido nucleico, ADN o ARN, que ha sido introducido en una célula (o su organismo de procedencia) mediante una actividad humana. Tal ácido nucleico exógeno puede ser una copia de una secuencia que se encuentra de forma natural en la célula en la que se ha introducido o fragmentos de la misma.

30 **[00071]** Por el contrario, un "ácido nucleico endógeno" se refiere a un ácido nucleico, gen, polinucleótido o molécula de ADN, ARN, ARNm o ADNc que está presente en el genoma de una planta u organismo que va a manipularse por ingeniería genética. Una secuencia endógena es "nativa", es decir, autóctona de la planta u organismo que va a manipularse por ingeniería genética.

35 **[00072]** Un "ácido nucleico heterólogo" se refiere a un ácido nucleico, ADN o ARN, que ha sido introducido en una célula (o su organismo de procedencia), que no es una copia de una secuencia que se encuentre de forma natural en la célula en la que se introduce. Tal ácido nucleico heterólogo puede comprender segmentos que son copia de una secuencia que se encuentra de forma natural en la célula en la que se ha introducido o fragmentos de la misma.

40

[00073] Un "ácido nucleico químérico" comprende una secuencia codificante o un fragmento de la misma unido a una región de iniciación de la transcripción que es diferente de la región de iniciación de la transcripción con la que está asociada en las células en las que la secuencia se encuentra de forma natural.

45 **[00074]** A menos que se indique de otro modo, todas las secuencias nucleotídicas determinadas por secuenciación de una molécula de ADN en este documento se determinaron mediante un secuenciador automático de ADN, como el modelo 373 de Applied Biosystems, Inc. Por lo tanto, como es sabido en la técnica para toda secuencia determinada mediante esta estrategia automática, cualquier secuencia nucleotídica determinada en este documento puede contener algunos errores. Las secuencias nucleotídicas determinadas de manera automática son 50 típicamente idénticas en al menos aproximadamente el 95 %, más típicamente, idénticas en al menos de aproximadamente el 96 % a al menos aproximadamente el 99,9 % a la secuencia nucleotídica real de la molécula de ADN secuenciada. La secuencia real puede determinarse de manera más precisa por otras estrategias, incluidos los procedimientos de secuenciación manual de ADN bien conocidos en la técnica. Como también se sabe en la técnica, una única inserción o delección en una determinada secuencia nucleotídica en comparación con la secuencia 55 real causará un cambio del marco de lectura en la traducción de dicha secuencia nucleotídica, de modo que la secuencia aminoacídica prevista codificada por una secuencia nucleotídica determinada puede ser completamente diferente de la secuencia aminoacídica codificada realmente por la molécula de ADN secuenciada, a partir del punto de tal inserción o delección.

60 **[00075]** Para los fines de la invención, dos secuencias hibridan cuando forman un complejo bicatenario en una disolución de hibridación de 6x SSC, SDS al 0,5 %, 5x disolución de Denhardt y 100 µg de un ADN vehículo inespecífico. Véase Ausubel y col, referencia anterior, en la sección 2.9, suplemento 27 (1994). Las secuencias pueden hibridar en condiciones de "astringencia moderada", que se definen como una temperatura de 60 °C en una disolución de hibridación de 6x SSC, SDS al 0,5 %, 5x disolución de Denhardt y 100 µg de un ADN vehículo 65 inespecífico. Para una hibridación de "alta astringencia", la temperatura se eleva a 68 °C. Después de la reacción de hibridación de astringencia moderada, los nucleótidos se lavan en una disolución de 2x SSC más SDS al 0,05 %

cinco veces a temperatura ambiente, con lavados subsiguientes con 0,1x SSC más SDS al 0,1 % a 60 °C durante 1 h. Para una alta astringencia, la temperatura de lavado se aumenta a 68 °C. Para los fines de la invención, los nucleótidos hibridados son aquellos que se detectan al usar 1 ng de una sonda radiomarcada con una radiactividad específica de 10.000 cuentas por minuto/ng, en que los nucleótidos hibridados son claramente visibles después de 5 la exposición a una película de rayos X a -70 °C durante no más de 72 horas.

[00076] La presente divulgación se dirige a aquellas moléculas de ácido nucleico que son idénticas en al menos el 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o el 100 % a la secuencia de ácido nucleico descrita en cualquiera de SEQ ID NO: 1, 1B, 3, 3B, 5, 5B, 7 y 7 B. Se prefieren moléculas de ácido 10 nucleico idénticas en al menos el 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o el 100 % a la secuencia de ácido nucleico mostrada en cualquiera de SEQ ID NO: 1, 1B, 3, 3B, 5, 5B, 7 y 7 B. Las diferencias entre dos secuencias de ácido nucleico pueden tener lugar en las posiciones 5' o 3' terminales de la secuencia nucleotídica de referencia o en cualquier punto entre dichas posiciones terminales, intercaladas individualmente entre nucleótidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos dentro de la secuencia de referencia.

[00077] En la práctica, que una molécula de ácido nucleico concreta sea idéntica en al menos el 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o el 99 % a una secuencia nucleotídica de referencia se refiere a una comparación establecida entre dos moléculas llevada a cabo con el uso de algoritmos estándar bien conocidos en la técnica y puede determinarse convencionalmente mediante programas de ordenador disponibles al público como el algoritmo BLASTN. Véase 20 Altschul y col., Nucleic Acids Res. 25: 3389-402 (1997).

[00078] La presente divulgación proporciona además moléculas de ácido nucleico que comprenden la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO: 1, 1B, 3, 3B, 5, 5B, 7 y 7B, respectivamente, la cual codifica un enzima activa de la biosíntesis de nicotina, en que la enzima tiene la secuencia aminoacídica que corresponde a SEQ ID NO: 2, 4, 25 6 y 8, respectivamente, y en que la proteína de la divulgación comprende sustituciones, adiciones y delecciones de aminoácidos que no alteran la funcionalidad de la enzima de la biosíntesis de nicotina.

[00079] Una "variante" es una secuencia nucleotídica o aminoacídica que se desvía de la secuencia nucleotídica o aminoacídica estándar o dada de un gen o proteína en concreto. Los términos "isoforma", "isotipo" y 30 "análogo" también se refieren a formas "variantes" de una secuencia nucleotídica o aminoacídica. Una secuencia aminoacídica alterada por la adición, supresión o sustitución de uno o más aminoácidos o un cambio de la secuencia nucleotídica puede considerarse una secuencia "variante". La variante puede tener cambios "conservadores", en que el aminoácido sustitutivo tiene propiedades estructurales o químicas similares, por ejemplo, la sustitución de leucina por isoleucina. Una variante puede tener cambios "no conservadores", por ejemplo, la sustitución de una glicina por 35 un triptófano. Otras variaciones análogas secundarias pueden incluir también delecciones o inserciones de aminoácidos o ambas. Es posible obtener una orientación para determinar qué restos aminoacídicos pueden sustituirse, insertarse o suprimirse mediante programas de ordenador bien conocidos en la técnica como Vector NTI Suite (InforMax, MD, EE. UU.). Una "variante" también puede referirse a un "gen reordenado", como los descritos en las patentes asignadas a Maxygen.

Construcciones de ácidos nucleicos

[00080] Según un aspecto de la divulgación, una secuencia que aumenta la biosíntesis de alcaloides nicotínicos se incorpora a una construcción de ácido nucleico que es adecuada para la transformación de plantas o 45 células. De este modo, una construcción de ácido nucleico tal puede usarse para la sobreexpresión de al menos uno de A622, NBB1, PMT y QPT en una planta, así como para la expresión de A622 y NBB1, por ejemplo, en una célula no productora de nicotina.

[00081] Las construcciones de ácidos nucleicos recombinantes pueden llevarse a cabo mediante técnicas 50 estándar. Por ejemplo, la secuencia de ADN para transcripción puede obtenerse tratando un vector que contiene dicha secuencia con enzimas de restricción para escindir el segmento adecuado. La secuencia de ADN para transcripción puede generarse también por hibridación y ligación de oligonucleótidos sintéticos o mediante el uso de oligonucleótidos sintéticos en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para obtener sitios de restricción adecuados en cada extremo. La secuencia de ADN se clona después en un vector que contiene elementos de regulación adecuados, como un promotor en la región 5' y secuencias de terminación en la región 3'.

[00082] Un aspecto importante de la presente invención es el uso de construcciones de ácidos nucleicos en las que una secuencia codificante para la biosíntesis de alcaloides nicotínicos está unida operativamente a una o más secuencias de regulación que controlan la expresión de la secuencia codificante para la biosíntesis de alcaloides 60 nicotínicos en ciertos tipos de células, órganos o tejidos sin afectar excesivamente al desarrollo o fisiología normales.

[00083] El "promotor" designa una región de ADN en la región 5' con respecto al inicio de la transcripción que está implicada en el reconocimiento y la unión de la ARN polimerasa y otras proteínas para iniciar la transcripción. Un "promotor constitutivo" es un promotor que es activo durante toda la vida de la planta y en la mayoría de las 65 condiciones ambientales. Los promotores específicos de tejidos, con preferencia de tejidos, específicos de tipos celulares e inducibles constituyen la clase de "promotores no constitutivos". "Unido operativamente" se refiere a una

conexión funcional entre un promotor y una segunda secuencia, en que la secuencia promotora inicia e interviene en la transcripción de la secuencia de ADN correspondiente a la segunda secuencia. En general, "unido operativamente" significa que las secuencias de ácido nucleico que se unen son contiguas.

- 5 [00084] Los promotores útiles para la expresión de una secuencia de ácido nucleico introducida en una célula para aumentar la expresión de A622, NBB1, PMTasa o QPTasa pueden ser promotores constitutivos, como el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), o promotores específicos de tejidos, con preferencia de tejidos, específicos de tipos celulares e inducibles. Los promotores preferidos incluyen promotores que son activos en tejidos radicales, como el promotor RB7 de tabaco (Hsu y col. Pestic. Sci. 44: 9-19 (1995); patente de los EE. UU. 10 n° 5.459.252), el promotor CRWAAQ81 de maíz (solicitud de patente publicada de los EE. UU. 20050097633); el promotor ARSK1 de *Arabidopsis* (Hwang y Goodman, Plant J. 8: 37-43 (1995)), el promotor MR7 de maíz (patente de los EE. UU. n° 5.837.848), el promotor ZRP2 de maíz (patente de los EE. UU. n° 5.633.363), el promotor MTL de maíz (patentes de los EE. UU. n° 5.466.785 y n° 6.018.099), los promotores MRS1, MRS2, MRS3 y MRS4 de maíz (solicitud de patente de los EE. UU. 20050010974), un promotor críptico de *Arabidopsis* (solicitud de patente de los EE. UU. 20030106105) y promotores que se activan en condiciones que resultan en la elevada expresión de enzimas implicadas en la biosíntesis de nicotina como el promotor RD2 de tabaco (patente de los EE. UU. n° 5.837.876), los promotores de PMT (Shoji T. y col., Plant Cell Physiol. 41: 831-39 (2000b); documento WO 2002/038588) o un promotor de A622 (Shoji T. y col., Plant Mol. Biol. 50: 427-40 (2002)).
- 15 20 [00085] Los vectores de utilización en la presente invención pueden contener también secuencias de terminación, que se sitúan en la región 3' de las moléculas de ácido nucleico de la presente invención, para terminar dicha transcripción de ARNm y añadir secuencias de poli A. Algunos ejemplos de tales terminadores son el terminador 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y el terminador del gen de la nopalina-sintasa (Tnos). El vector de expresión puede contener también potenciadores, codones de inicio, secuencias señal de corte y empalme 25 y secuencias localizadoras.

[00086] Los vectores de expresión de utilización en la presente invención pueden contener también un marcador de selección, mediante el que pueden identificarse las células transformadas en cultivo. El marcador puede estar asociado con la molécula de ácido nucleico heteróloga, es decir, el gen unido operativamente a un 30 promotor. Según se usa en este documento, el término "marcador" se refiere a un gen que codifica un carácter o un fenotipo que permite la selección o la identificación de plantas o células que contienen el marcador. En plantas, por ejemplo, el gen marcador codificará la resistencia a un antibiótico o un herbicida. Esto permite la selección de las células transformadas entre las células que no están transformadas o transfectadas.

35 [00087] Algunos ejemplos de marcadores seleccionables adecuados incluyen adenosina-desaminasa, dihidrofolato-reductasa, higromicina-B-fosfotransferasa, timidina-cinasa, xantina-guanina-fosforribosiltransferasa, resistencia a glifosato y glufosinato y aminoglucósido-3'-O-fosfotransferasa (resistencia a kanamicina, neomicina y G418). Estos marcadores pueden incluir la resistencia a G418, higromicina, bleomicina, kanamicina y gentamicina. La construcción puede contener también el gen marcador seleccionable *Bar*, que confiere resistencia a análogos del 40 herbicida fosfinotricina, como glufosinato de amonio. Thompson y col., EMBO J. 9: 2519-23 (1987). También se conocen otros marcadores de selección adecuados.

[00088] Pueden usarse marcadores visibles como la proteína verde fluorescente (GFP). También se han descrito procedimientos para la identificación o selección de plantas transformadas basados en el control de la 45 división celular. Véanse los documentos WO 2000/052168 y WO 2001/059086.

[00089] También pueden incluirse secuencias de replicación de origen bacteriano o vírico para permitir la clonación del vector en un huésped bacteriano o fágico. Preferentemente se usa un origen de replicación procariótico de amplio espectro de huésped. También puede incluirse un marcador seleccionable para bacterias 50 para permitir la selección de células bacterianas que contienen la construcción deseada. Los marcadores seleccionables procarióticos adecuados incluyen además resistencia a antibióticos como kanamicina o tetraciclina.

[00090] También puede haber presentes en el vector otras secuencias de ácido nucleico codificantes de funciones adicionales, según se conocen en la técnica. Por ejemplo, si el huésped es *Agrobacterium*, pueden 55 incluirse secuencias de ADN-T para facilitar la transferencia posterior y la incorporación en los cromosomas de la planta.

Plantas para ingeniería genética

- 60 [00091] La presente invención comprende la manipulación genética de una planta de *Nicotiana* para aumentar la síntesis de alcaloides nicotínicos por medio de la introducción de una secuencia polinucleotídica que codifica una enzima de la ruta de la síntesis de alcaloides nicotínicos. Adicionalmente, la descripción proporciona procedimientos para la producción de alcaloides nicotínicos y compuestos relacionados en plantas no productoras de nicotina, como *Arabidopsis thaliana* y *Atropa belladonna*.
- 65 [00092] La "manipulación por ingeniería genética" (GE) abarca cualquier metodología para la introducción de

un ácido nucleico o una mutación específica en un organismo huésped. Por ejemplo, una planta de tabaco está manipulada por ingeniería genética cuando está transformada con una secuencia polinucleotídica que aumenta la expresión de un gen, como *A622* o *NBB1*, con lo que aumentan los niveles de nicotina. Por el contrario, una planta de tabaco que no está transformada con una secuencia polinucleotídica es una planta de control y se denomina 5 planta "sin transformar".

[00093] En el presente contexto, la categoría "manipuladas por ingeniería genética" incluye plantas y células "transgénicas" (véase la definición en la referencia a continuación), así como plantas y células producidas por medio de mutagénesis dirigida, efectuada, por ejemplo, a través del uso de oligonucleótidos químicos ARN/ADN, según 10 se describe en Beetham y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 96: 8774-8778 (1999) y Zhu y col., en la referencia citada, páginas 8768-8773, o las denominadas "oligonucleobases recombinogénicas", según se describen en la solicitud PCT WO 03/013226. Igualmente, una planta o célula manipulada por ingeniería genética puede producirse mediante la introducción de un virus modificado que, a su vez, causa una modificación genética en el huésped que resulta similar a las producidas en una planta transgénica, según se describe en este documento. Véase la patente de los 15 EE. UU. n° 4.407.956. Adicionalmente, una planta o célula manipulada por ingeniería genética puede ser el producto de cualquier estrategia nativa (es decir, que no implica secuencias nucleotídicas exógenas), implementada por la introducción solamente de secuencias de ácido nucleico derivadas de la especie huésped o de una especie sexualmente compatible. Véase, por ejemplo, la solicitud publicada de los EE. UU. n° 2004/0107455.

20 **[00094]** "Planta" es un término que abarca plantas enteras, órganos de plantas (por ejemplo, hojas, tallos, raíces, etc.), semillas, células vegetales diferenciadas o indiferenciadas y la descendencia de las mismas. El material vegetal incluye, sin limitación, semillas, cultivos en suspensión, embriones, regiones meristemáticas, tejidos de callo, hojas, raíces, brotes, tallos, frutos, gametofitos, esporofitos, polen y microesporas. La clase de plantas que pueden usarse en la presente invención es generalmente tan amplia como la clase de plantas superiores en la que es 25 posible aplicar técnicas de ingeniería genética, incluidas plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas, así como gimnospermas. Las plantas productoras de nicotina preferidas incluyen los géneros *Nicotiana*, *Duboisia*, *Anthoceros* y *Salpiglossis* en las solanáceas o los géneros *Eclipta* y *Zinnia* en las compuestas.

[00095] "Tabaco" se refiere a cualquier planta en el género *Nicotiana* que produce alcaloides nicotínicos. 30 Tabaco también se refiere a productos que comprenden material producido a partir de una planta de *Nicotiana* e incluye, por lo tanto, tabaco expandido, tabaco reconstituido, cigarrillos, cigarros, tabaco de mascar o formas de tabaco sin humo, rapé y snus preparados a partir de tabaco con aumento de nicotina manipulado por ingeniería genética. Algunos ejemplos de la especie *Nicotiana* incluyen, pero no se limitan a los siguientes: *Nicotiana acaulis*, *Nicotiana acuminata*, *Nicotiana acuminata* var. *multiflora*, *Nicotiana africana*, *Nicotiana alata*, *Nicotiana amplexicaulis*, 35 *Nicotiana arentsii*, *Nicotiana attenuata*, *Nicotiana benavidesii*, *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana bigelovii*, *Nicotiana bonariensis*, *Nicotiana cavicola*, *Nicotiana clevelandii*, *Nicotiana cordifolia*, *Nicotiana corymbosa*, *Nicotiana debneyi*, *Nicotiana excelsior*, *Nicotiana forgetiana*, *Nicotiana fragrans*, *Nicotiana glauca*, *Nicotiana glutinosa*, *Nicotiana goodspeedii*, *Nicotiana gossei*, *Nicotiana hybrid*, *Nicotiana ingulba*, *Nicotiana kawakamii*, *Nicotiana knightiana*, *Nicotiana langsdorffii*, *Nicotiana linearis*, *Nicotiana longiflora*, *Nicotiana maritima*, *Nicotiana megalosiphon*, *Nicotiana 40 miersii*, *Nicotiana noctiflora*, *Nicotiana nudicaulis*, *Nicotiana obtusifolia*, *Nicotiana occidentalis*, *Nicotiana occidentalis* subsp. *hesperis*, *Nicotiana otophora*, *Nicotiana paniculata*, *Nicotiana pauciflora*, *Nicotiana petunioides*, *Nicotiana plumbaginifolia*, *Nicotiana quadrivalvis*, *Nicotiana raimondii*, *Nicotiana repanda*, *Nicotiana rosulata*, *Nicotiana rosulata* subsp. *ingulba*, *Nicotiana rotundifolia*, *Nicotiana rustica*, *Nicotiana setchellii*, *Nicotiana simulans*, *Nicotiana solanifolia*, *Nicotiana spegazzinii*, *Nicotiana stocktonii*, *Nicotiana suaveolens*, *Nicotiana sylvestris*, *N. tabacum*, *Nicotiana 45 thrysiflora*, *Nicotiana tomentosa*, *Nicotiana tomentosiformis*, *Nicotiana trigonophylla*, *Nicotiana umbratica*, *Nicotiana undulata*, *Nicotiana velutina*, *Nicotiana wigandoides* y *Nicotiana x sanderae*.

[00096] En la presente descripción, las "raíces capilares de tabaco" se refieren a raíces de tabaco que tienen ADN-T de un plásmido Ri de *Agrobacterium rhizogenes* integrado en el genoma y crecen en cultivo sin la adición de 50 auxina u otras fitohormonas. Las raíces capilares de tabaco producen alcaloides nicotínicos al igual que las raíces de una planta de tabaco. Estos tipos de raíces se caracterizan por un crecimiento rápido, ramificación frecuente, plagiotropismo y la capacidad de sintetizar los mismos compuestos que las raíces de la planta intacta. David y col., Biotechnology 2: 73-76 (1984). Las raíces de las plantas solanáceas constituyen el lugar principal de biosíntesis de alcaloides tropánicos y, por lo tanto, los cultivos de raíces capilares son capaces de acumular altos niveles de estos 55 metabolitos. Por ejemplo, véase Oksman-Caldentey & Arroo, "Regulation of tropane alkaloid metabolism in plants and plant cell cultures," en METABOLIC ENGINEERING OF PLANT SECONDARY METABOLISM 253-81 (Kluwer Academic Publishers, 2000).

Células no productoras de nicotina para ingeniería genética

60 **[00097]** La descripción contempla la manipulación por ingeniería genética de "células no productoras de nicotina" con una secuencia de ácido nucleico codificante de una enzima implicada en la producción de alcaloides nicotínicos. Una célula no productora de nicotina se refiere a una célula de cualquier organismo que no produce nicotina. Algunas células ilustrativas incluyen, pero no se limitan a células de plantas como *Atropa belladonna*, *Arabidopsis thaliana*, así como células de insectos, mamíferos, levaduras, hongos, algas o bacterias. Las células huésped adecuadas se discuten más detalladamente en Goeddel, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY:

METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, California (1990).

[00098] Una “célula de insecto” se refiere a cualquier célula de un insecto que puede transformarse con un gen codificante de una enzima de la biosíntesis de nicotina y que es capaz de expresar la enzima o sus productos en 5 cantidades recuperables. Algunas células de insectos ilustrativas incluyen las células Sf9 (ATCC CRL 1711).

[00099] Una “célula fúngica” se refiere a cualquier célula de un hongo que puede transformarse con un gen codificante de una enzima de la biosíntesis de nicotina y que es capaz de expresar la enzima o sus productos en 10 cantidades recuperables. Algunas células fúngicas ilustrativas incluyen células de levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* (Baldari y col., 1987. EMBO J. 6: 229-234) y *Pichia pastoris* (por ejemplo, *P. pastoris* KM714, disponible de Invitrogen). También pueden usarse células de hongos filamentosos como *Aspergillus* y *Trichoderma*. Archer y 15 col., Antonie van Leeuwenhoek 65: 245-250 (2004).

[000100] Una “célula bacteriana” se refiere a cualquier célula bacteriana que puede transformarse con un gen 15 codificante de una enzima de la biosíntesis de nicotina y que es capaz de expresar la enzima o sus productos en cantidades recuperables. Algunas células bacterianas ilustrativas incluyen *E. coli*, como la cepa de *E. coli* M15/rep4, disponible comercialmente de QIAGEN.

[000101] Una “célula de mamífero” se refiere a cualquier célula de un mamífero que puede transformarse con un 20 gen codificante de una enzima de la biosíntesis de nicotina y que es capaz de expresar la enzima o sus productos en cantidades recuperables. Algunas células de mamíferos ilustrativas incluyen las células de ovario de hámster chino (CHO) o células COS. Las células de mamíferos pueden incluir también un ovocito fertilizado o una célula madre embrionaria no humana en la que se han introducido secuencias codificantes de una enzima de la biosíntesis 25 de alcaloides nicotínicos. Tales células huésped pueden usarse después para crear animales transgénicos no humanos. Algunos ejemplos de sistemas para la expresión regulada de proteínas en células de mamíferos incluyen los sistemas de expresión génica Tet-Off y Tet-On de Clontech y sistemas similares. Gossen y Bujard, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5547-5551 (1992).

[000102] Una “célula de alga” se refiere a cualquier especie de alga que puede transformarse con un gen 30 codificante de una enzima de la biosíntesis de nicotina sin afectar al desarrollo o la fisiología normal del alga. Algunas células de algas ilustrativas incluyen *Chlamydomonas reinhardtii* (Mayfield y Franklin, Vaccine 23: 1828-1832 (2005)).

[000103] Dado que la producción de alcaloides nicotínicos en una célula de un insecto podría afectar 35 negativamente al crecimiento y desarrollo del insecto, un sistema de expresión inducible puede mitigar los efectos adversos. Por ejemplo, las células de insecto pueden permitirse crecer primeramente en condiciones no inductoras hasta un estado deseado y entonces se induce la expresión de la enzima.

[000104] Adicionalmente, es posible suministrar precursores a las células que expresan los genes de la 40 biosíntesis de alcaloides nicotínicos para aumentar la disponibilidad de sustrato para la síntesis de dichos alcaloides nicotínicos. También pueden suministrarse a las células análogos de precursores que pueden incorporarse en análogos de alcaloides nicotínicos de origen natural.

Transformación y selección

[000105] Mientras que la nicotina es el principal alcaloide en *N. tabacum* y algunas otras especies del género *Nicotiana*, otras plantas tienen la capacidad de producir nicotina, por ejemplo los géneros *Duboisia*, *Anthoceros* y *Salpiglossis* en las solanáceas o los géneros *Eclipta* y *Zinnia* en las compuestas. Mediante el uso de las construcciones y procedimientos descritas, puede producirse nicotina en plantas no productoras de nicotina como 50 *Atropa belladonna* y *Arabidopsis thaliana* y en células, por ejemplo de insectos, hongos y bacterias.

[000106] Para los fines de esta descripción, una planta o célula no productora de nicotina, como una célula 55 fúngica, puede transformarse con un plásmido que comprende una o más secuencias, cada una de ellas unida operativamente a un promotor. Por ejemplo, un vector ilustrativo puede comprender una secuencia de *QPT* unida operativamente a un promotor. Igualmente, el plásmido puede comprender una secuencia de *QPT* unida operativamente a un promotor y una secuencia de *A622* unida operativamente a un promotor. Alternativamente, una planta o célula no productora de nicotina puede transformarse con más de un plásmido. Por ejemplo, una planta o célula no productora de nicotina puede transformarse con un primer plásmido que comprende una secuencia de *QPT* unida operativamente a un promotor, que es distinto de un segundo plásmido que comprende una secuencia de *A622* o *NBB1*. Por supuesto, el primero y el segundo plásmidos o porciones de los mismos se introducen en la 60 misma célula.

Transformación de plantas

[000107] Una “planta transgénica” se refiere a una planta que comprende una secuencia de ácido nucleico que 65 también está presente de por sí en otro organismo o especie o que se ha optimizado, con respecto al uso de

codones, a partir de otro organismo o especie. Pueden transformarse de diversas maneras conocidas en la técnica las células de plantas angiospermas, tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas, o gimnospermas. Por ejemplo, véase Klein y col., Biotechnology 4: 583-590 (1993); Bechtold y col., C. R. Acad. Sci. Paris 316: 1194-1199 (1993); Bent y col., Mol. Gen. Genet. 204: 383-396 (1986); Paszowski y col., EMBO J. 3: 2717-2722 (1984); Sagi y col., Plant 5 Cell Rep. 13: 262-266 (1994). Pueden usarse especies de *Agrobacterium* como *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes*, por ejemplo, de acuerdo con Nagel y col., Microbiol. Lett. 67: 325 (1990). Adicionalmente, las plantas pueden transformarse mediante transformación por *Rhizobium*, *Sinorhizobium* o *Mesorhizobium*. Broothearts y col., Nature 433: 629-633 (2005).

10 [000108] Por ejemplo, *Agrobacterium* puede transformarse con un vector de expresión en plantas, por ejemplo, por medio de electroporación, después de lo cual dicho *Agrobacterium* se introduce en las células de la planta, por ejemplo, por medio del procedimiento bien conocido de los discos de hoja. Otros procedimientos adicionales para conseguir esto incluyen, pero no se limitan a electroporación, bombardeo de partículas, precipitación con fosfato de calcio y fusión con polietilenglicol, transferencia a granos de polen en germinación, transformación directa (Lorz y 15 col., Mol. Genet. 199: 179-182 (1985)) y otros procedimientos conocidos en la técnica. Si se emplea un marcador de selección, como la resistencia a kanamicina, resulta más fácil determinar qué células se han transformado satisfactoriamente. Los genes marcadores pueden incluirse entre pares de sitios de recombinación reconocidos por recombinasas específicas como cre o flp para facilitar la eliminación del marcador después de la selección. Véase la solicitud publicada de los EE. UU. n° 2004/0143874.

20 [000109] Pueden producirse plantas transgénicas sin los genes marcadores mediante el uso de un segundo plásmido que comprende un ácido nucleico que codifica el marcador, distinto de un primer plásmido que comprende una secuencia de *A622* o *NBB1*. El primero y el segundo plásmidos o porciones de los mismos se introducen en la misma célula de la planta, de modo que las células de la planta transformadas se identifican por el gen del marcador 25 seleccionable que se expresa transitoriamente y se obtienen plantas transformadas en las que la secuencia de *A622* o *NBB1* está integrada de manera estable en el genoma y el gen marcador no está integrado de forma estable. Véase la solicitud publicada de los EE. UU. n° 2003/0221213. El primer plásmido que comprende una secuencia de *A622* o *NBB1* puede ser opcionalmente un vector binario con una región de ADN-T constituida en su totalidad por secuencias de ácido nucleico presentes en *N. tabacum* no transgénica natural o una especie de *Nicotiana* 30 sexualmente compatible.

[000110] Se sabe que los procedimientos de transformación mediante *Agrobacterium* expuestos anteriormente son útiles para la transformación de dicotiledóneas. Adicionalmente, de la Pena y col., Nature 325: 274-276 (1987), Rhodes y col., Science 240: 204-207 (1988) y Shimamoto y col., Nature 328: 274-276 (1989) han transformado 35 monocotiledóneas cereales mediante *Agrobacterium*. Véase también Bechtold y col., C.R. Acad. Sci. Paris 316 (1994), que ilustra la infiltración mediante vacío para la transformación por medio de *Agrobacterium*.

[000111] Los procedimientos para la regeneración de una planta transgénica a partir de una célula o cultivo transformado varían de acuerdo con la especie de planta, pero se basan en una metodología conocida. Por ejemplo, 40 los procedimientos para la regeneración de plantas de tabaco transgénico son bien conocidos. Se han seleccionado plantas manipuladas por ingeniería genética con un aumento de la expresión de al menos uno de *A622*, *NBB1*, *PMT* y *QPT*. Adicionalmente, las plantas manipuladas por ingeniería genética pueden presentar un aumento de los niveles de nicotina y del rendimiento.

45 Transformación de células no productoras de nicotina

[000112] Las construcciones de acuerdo con la descripción pueden usarse para transformar cualquier célula mediante una técnica de transformación adecuada, como la transformación de células de plantas por medio de *Agrobacterium*, el bombardeo de partículas, la electroporación y la fusión con polietilenglicol o la transfección 50 mediante fosfato de calcio, DEAE-dextrano o lípidos catiónicos.

[000113] Las células no productoras de nicotina pueden transformarse con construcciones de ácidos nucleicos de la presente descripción sin el uso de un marcador seleccionable o visible y los organismos transgénicos pueden identificarse mediante la detección de la presencia de la construcción introducida. Por ejemplo puede medirse la 55 presencia de una proteína, polipéptido o molécula de ácido nucleico en una célula concreta para determinar si la célula se transformado o transfectedo satisfactoriamente. Por ejemplo, y como rutina en la técnica, la presencia de la construcción introducida puede detectarse por PCR u otros procedimientos adecuados para la detección de un ácido nucleico o secuencia polipeptídica específicos. Adicionalmente, las células transformadas pueden identificarse mediante el reconocimiento de diferencias en la tasa de crecimiento o una característica morfológica de una célula 60 transformada en comparación con la tasa de crecimiento o una característica morfológica de una célula sin transformar cultivada en condiciones similares. Véase el documento WO 2004/076625.

[000114] Para los fines de la presente descripción, se seleccionan células manipuladas por ingeniería genética que expresan *A622* y *NBB1* heterólogamente.

Cuantificación del contenido de alcaloides nicotínicos

[000115] Las plantas y células manipuladas por ingeniería genética se caracterizan por un aumento del contenido de alcaloides nicotínicos. De manera similar, las células no productoras de nicotina transformadas se caracterizan por la producción de alcaloides nicotínicos.

5

[000116] Al describir una planta de la presente invención, la frase "aumento del contenido de nicotina o alcaloides nicotínicos" se refiere a un aumento de la cantidad de alcaloides nicotínicos en la planta o célula en comparación con una planta o célula de control sin transformar. Una "planta con aumento de nicotina" abarca una planta manipulada por ingeniería genética que tiene un aumento del contenido de nicotina superior al 10 % y preferentemente superior al 50 %, 100 % o 200 % del contenido de nicotina de una planta de control de la misma especie o variedad.

10 [000117] Una célula no productora de nicotina transformada satisfactoriamente se caracteriza por la síntesis de alcaloides nicotínicos. Por ejemplo, una célula no productora de nicotina transformada puede producir nicotina, mientras que una célula de control sin transformar no puede.

15 [000118] Un aumento cuantitativo de los niveles de alcaloides nicotínicos puede comprobarse por varios procedimientos como, por ejemplo, por cuantificación basada en cromatografía de gas-líquido, cromatografía líquida de alto rendimiento, radioinmunoensayos y ensayos de inmunoadsorción enzimática. En la presente invención, los niveles de alcaloides nicotínicos se midieron por cromatografía de gas-líquido, con una columna capilar y un detector de ionización de llama (FDI), según se describe en Hibi y col., *Plant Physiology* 100: 826-35 (1992).

Cuantificación del rendimiento

20 25 [000119] Las plantas y células manipuladas por ingeniería genética se caracterizan por un aumento del contenido de alcaloides nicotínicos y del rendimiento. La producción de alcaloides nicotínicos en las plantas manipuladas por ingeniería genética se alcanza preferentemente mediante la expresión de un gen de la ruta de la biosíntesis de nicotina, tal como *A622*, *NBB1*, *PMT* o *QPT*. Según la presente invención, se expresan *A622* y *NBB1*.

30 35 [000120] Al describir una planta de la presente invención, la expresión "aumento del rendimiento" o "alto rendimiento" se refiere a un aumento en la cantidad de rendimiento de una planta o un cultivo de dicha planta en comparación con una planta de control con aumento de nicotina o un cultivo de dicha planta. Una "planta con aumento del rendimiento" abarca una planta manipulada por ingeniería genética de modo que produce lo mismo como planta o cultivo de dicha planta que una planta con aumento de nicotina o un cultivo de dicha planta, preferentemente más del 110 % y con mayor preferencia más del 125 % del rendimiento de una planta de control de la misma variedad o especie enriquecida en nicotina.

40 45 [000121] Un aumento cuantitativo de la eficiencia fotosintética puede determinarse por varios procedimientos como, por ejemplo, mediante la cuantificación de tasas de fotosíntesis como el intercambio gaseoso y la fijación de CO₂ y la fluorescencia de la clorofila. Miyagawa y col., *Plant Cell Physiol.* 41: 311-320 (2000). Las tasas de fotosíntesis pueden cuantificarse también por medición de los niveles de metabolitos y carbohidratos, según se describe en Leegood, Carbon Metabolism in Photosynthesis and production in a changing environment: afield and laboratory manual (eds. Hall, Scurlock, Bolhar-Nordenkampf, Leegood y Long) 247-267 (Chapman y Hall, Londres; 1993). Alternativamente, la actividad fotosintética puede calcularse sobre la base de la actividad enzimática, como la actividad de la Rubisco. Portis, A. R., *J. Exp. Bot.* 46: 1285-1291 (1995).

50 [000122] Por supuesto, un aumento del rendimiento puede determinarse mediante la medición de características más fácilmente apreciables, incluidas, pero sin limitarse a la altura de la planta, el peso, el tamaño de la hoja, el momento de floración, el número de semillas producidas y el peso de las semillas.

50

Productos con aumento de nicotina.

55 [000123] La presente invención proporciona una planta manipulada por ingeniería genética que presenta un aumento de los niveles de nicotina. También se describe una célula no productora de nicotina manipulada por ingeniería genética que produce nicotina o compuestos relacionados, en que dicha célula deriva de un organismo que no produce nicotina. A partir de una planta manipulada por ingeniería genética semejante pueden obtenerse diversos productos. Igualmente, pueden obtenerse productos a partir de células manipuladas por ingeniería genética para la producción de nicotina o compuestos relacionados.

60 Plantas resistentes a herbívoros

[000124] La nicotina sirve como un plaguicida natural que ayuda a proteger a las plantas de tabaco del daño producido por plagas. Se ha demostrado que el tabaco mejorado convencionalmente o transgénico de bajo contenido de nicotina es más susceptible al daño por insectos. Legg, P. D. y col., *Can. J. Cyto.*, 13: 287-291 (1971); Voelckel, C. y col., *Chemoecology* 11: 121-126 (2001); Steppuhn, A. y col., *PLoS Biol.*, 2(8): e217: 1074-1080 (2004). Mediante el uso de los procedimientos y construcciones de la presente invención, pueden producirse plantas con

aumento de nicotina que presentan un aumento de la resistencia al daño por insectos u otras plagas. De manera similar, puede obtenerse un aumento de la resistencia a plagas en plantas no productoras de nicotina, como *A. belladonna* y *A. thaliana*, manipuladas por ingeniería genética de acuerdo con la presente descripción para producir nicotina.

5

Productos con aumento de nicotina

[000125] Las construcciones y procedimientos de la presente invención pueden usarse para producir, por ejemplo, cigarrillos, cigarros y otros productos tradicionales de tabaco como rapé y snus. Adicionalmente, pueden 10 producirse cigarrillos con aumento de nicotina que presentan una exposición reducida a componentes del humo como alquitrán, pero proporcionan un suministro de nicotina similar o mayor que los cigarrillos convencionales.

[000126] En la presente descripción, un producto de tabaco con aumento de nicotina puede estar en forma de tabaco de hoja, tabaco picado, tabaco cortado en hebras, tabaco molido, tabaco reconstituido, tabaco expandido o 15 inflado y fracciones de tabaco que incluyen, por ejemplo, nicotina. Un producto de tabaco con aumento de nicotina puede incluir cigarrillos, cigarros, tabaco de pipa y cualquier forma de tabaco sin humo como rapé, snus o tabaco de mascar.

[000127] En la técnica del tabaco es común la mezcla de diferentes tipos o cultivares de tabaco dentro de un 20 producto de tabaco como un cigarrillo. Por lo tanto, se apreciará que el tabaco con aumento de nicotina podría mezclarse en cualquier proporción con un tabaco sin transformar para obtener cualquier nivel deseado de contenido de nicotina, hasta el contenido de nicotina del tabaco con aumento de nicotina utilizado, para fabricar un producto de tabaco.

[000128] Los cigarrillos con aumento de nicotina son particularmente ventajosos porque existen estudios que demuestran que cuando se aumenta la nicotina, los fumadores inhalan menos alquitrán y monóxido de carbono. Véase Armitage y col., Psychopharmacology 96: 447-453 (1988); Fagerström, Psychopharmacology 77: 164-167 (1982); Russell, Nicotine and Public Health 15: 265-284 (2000) y Woodman y col., European Journal of Respiratory Disease 70: 316-321 (1987).

30

[000129] El humo de los cigarrillos es una mezcla extremadamente compleja de más de 4.000 compuestos diferentes. Green y Rodgman, Recent Advances in Tobacco Science 22: 131-304 (1996); Informe del IOM, página 9 del resumen ejecutivo. El humo de los cigarrillos está compuesto de dos fases: una fase particulada, denominada comúnmente "alquitrán" o materia particulada total, y una fase de vapor que contiene gases y compuestos 35 semivolátiles. Una definición común de "alquitrán" es el "humo seco sin nicotina" o la "materia particulada seca sin nicotina" (NFDPM) capturados por una almohadilla de Cambridge cuando un cigarrillo se fuma en una máquina de fumar. Más específicamente, el "alquitrán" es la materia particulada total aislada del humo, con exclusión del agua y la nicotina. El alquitrán constituye menos del diez por ciento del peso del humo del cigarrillo. Sin embargo, el alquitrán es el componente que contiene la mayor parte de los compuestos más dañinos del humo.

40

[000130] Los procedimientos analíticos combinados con ensayos biológicos sensibles han conducido a la identificación de 69 carcinógenos en el humo del tabaco. Véase THE CHANGING CIGARETTE: CHEMICAL STUDIES AND BIOASSAYS, capítulo 5, Smoking and Tobacco Control Monograph nº 13 (Publicación del NIH nº 02-5074, octubre de 2001). Sin embargo, resulta claro para los investigadores que no todos los componentes del humo 45 de los cigarrillos tienen la misma toxicidad. Notablemente, el primer informe del Surgeon General de los EE. UU. sobre el tabaco en 1964 llegó a la conclusión de que la nicotina probablemente no era tóxica en los niveles inhalados, con la implicación de que la fuente principal de gratificación farmacológica para los fumadores no presentaba un riesgo inmediato. El informe del General Surgeon de 1964 afirmaba en la página 74 que no hay pruebas aceptables de que una exposición prolongada a la nicotina creara cambios funcionales peligrosos de 50 naturaleza objetiva ni enfermedades degenerativas.

[000131] De hecho, la Administración de Alimentos y Medicamentos de los EE. UU. permite la venta de productos sustitutivos de nicotina como parches y chicle para uso en los tratamientos para dejar de fumar. Estos productos pueden suministrar más nicotina en un día que un paquete de cigarrillos. En la página 167 del informe del IOM se afirma que numerosos estudios sobre nicotina sugieren que no es probable que esta sea un agente cancerígeno en humanos o, cuánto más, que su carcinogenicidad sería insignificante en comparación con la de otros componentes del tabaco. Es decir, que la consideración de la nicotina como agente carcinógeno, si acaso, es insignificante en comparación con el riesgo de otros constituyentes del tabaco.

[000132] Los cigarrillos se evalúan generalmente mediante los métodos de la máquina de fumar de la Comisión Federal del Comercio (FTC) (en los EE. UU.) o la Organización Internacional de Normalización (ISO) que determinan, por ejemplo, la cantidad de alquitrán y nicotina generada cuando un cigarrillo se fuma en una máquina de acuerdo con condiciones estándar. Véanse Pillsbury y col., J. Assoc. Off. Analytical Chem. (1969); ISO: 4387 (1991). En general, la mayoría de los cigarrillos comerciales producen aproximadamente de 10 a 15 partes de 65 "alquitrán" por cada parte de nicotina, medidas en miligramos, según se analiza en la solicitud PCT WO 2005/018307.

- [000133]** Muchas autoridades sanitarias creen que el régimen actual de las máquinas de fumar FTC/ISO es imperfecto porque estas metodologías no tienen en cuenta el comportamiento del fumador humano, impulsado fundamentalmente por la búsqueda de nicotina. En otras palabras, estos procedimientos no consideran el fumar compensatoriamente. El fumar compensatoriamente o la compensación, como también se denomina, significa esencialmente fumar en exceso (fumar más intensivamente), debido a la menor presencia de nicotina en el humo del tabaco o fumar en defecto (fumar menos intensivamente) debido al aumento de la presencia de nicotina. Véase Benowitz, N. Compensatory Smoking of Low Yield Cigarettes, Monografía 13 del NCI.
- 5
- [000134]** Actualmente se están evaluando nuevos procedimientos de máquinas de fumar, especialmente aquellos que consideran fumar compensatoriamente marcas de baja producción. Un ejemplo es un procedimiento que implica el ajuste de los parámetros al fumar, de modo que las marcas con menores producciones de nicotina según el ISO se fuman en la máquina con mayor intensidad. Kozlowski y O'Connor Lancet 355: 2159 (2000). Otros procedimientos propuestos miden la producción de toxinas con respecto a unidades de nicotina o para una 15 producción de nicotina "objetivo" definida. Esto se consigue, por ejemplo, por variación sistemática del volumen de bocanada y el intervalo de bocanadas y el bloqueo de los orificios de ventilación hasta alcanzar la producción de nicotina objetivo. Los cigarrillos pueden evaluarse entonces según el esfuerzo requerido para conseguir la producción de nicotina objetivo, así como según el suministro de toxinas para tal producción. Los consumidores se beneficiarían de estos procedimientos de máquinas de fumar, dado que podrían llevarse a cabo comparaciones de 20 toxinas específicas entre marcas diferentes.
- [000135]** Algunos estudios han sugerido que muchos fumadores inhalan la misma cantidad de humo con la mayoría de los cigarrillos "light" y "ultra-light" que con los cigarrillos de sabor pleno (Gori y Lynch, Regulatory Toxicology and Pharmacology 5: 314-326). Los fumadores pueden compensar o fumar los cigarrillos de menor 25 producción de humo (según el procedimiento de la FTC o el ISO) de manera más agresiva (que los cigarrillos de mayor producción) con el fin de obtener el deseado impacto de nicotina y la sensación de humo en la boca, que importantes propiedades sensoriales. Rose J. E. "The role of upper airway stimulation in smoking," en Nicotine Replacement: A Critical Evaluation, págs. 95-106, 1988.
- [000136]** La manera en que un fumador puede compensar incluye la frecuencia de bocanadas por cigarrillo y el volumen de inhalación de humo en dichas bocanadas, el tiempo que se retiene el humo inhalado antes de exhalarlo, el número de cigarrillos fumados durante un periodo de tiempo específico y el porcentaje de cada cigarrillo que se fuma (hasta donde se fuma el cigarrillo).
- 30
- [000137]** Cuando el porcentaje de nicotina por unidad de volumen de humo inhalado aumenta, muchos fumadores pueden compensar e inhalar menos humo. Gori G. B., Virtually Safe Cigarettes. Reviving an opportunity once tragically rejected. IOS Press. Ámsterdam, (2000). Cuanto mayor es el porcentaje de nicotina en el tabaco de un cigarrillo, mayor es el porcentaje de nicotina en el humo del cigarrillo. Más específicamente, cuanto mayor es el porcentaje de nicotina en el relleno de un cigarrillo, mayor es el porcentaje de nicotina en el humo del cigarrillo.
- 35
- [000138]** "Relleno" significa cualquier material fumable que se enrolla dentro de un cigarrillo o dispositivo similar a un cigarrillo e incluye (a) todos los tabacos, incluidos, pero sin limitarse a los tabacos reconstituidos y expandidos, (b) cualquier sustitutivo distinto del tabaco que puede acompañar a (a), (c) envoltorios de tabaco, (d) otros aditivos, incluidos saborizantes que se añaden a (a), (b) o (c). Un dispositivo similar a un cigarrillo es cualquier dispositivo destinado específicamente al suministro de nicotina a través de un aerosol de "humo" alternativo formado por el calentamiento 40 de materiales de tabaco. Lo característico de tales dispositivos es que presentan un alto contenido de glicerina o un sustitutivo de glicerina con una combustión pirolítica mínima o nula. Cuando se calienta la glicerina, esta se vaporiza rápidamente y forma un aerosol que puede inhalarse y que es muy similar en aspecto y sensación al humo de los cigarrillos convencionales.
- 45
- [000139]** Por lo tanto, el contenido de nicotina del relleno de tabaco contenido en un cigarrillo o en un dispositivo similar a un cigarrillo, cuando todos los demás factores se mantienen constantes (incluidos, pero sin limitarse al tipo de filtro, el papel del cigarrillo, incluida su porosidad, la envoltura del filtro y el papel boquilla utilizados y el grado de ventilación del filtro), tendrá que duplicarse aproximadamente para una duplicación correspondiente de la nicotina en el humo de un cigarrillo corriente. Además, el contenido de nicotina del relleno de tabaco contenido en un cigarrillo o 50 un dispositivo similar a un cigarrillo, cuando todos los demás factores se mantienen constantes, tendrá que triplicarse aproximadamente para una triplicación correspondiente de la nicotina en el humo de un cigarrillo corriente. Los cálculos en esta sección se refieren a nicotina protonada en el humo corriente de un cigarrillo con el aumento descrito de los niveles de nicotina y no a nicotina "libre" o "volátil".
- 55
- [000140]** En un caso preferido de la divulgación se fabrica un cigarrillo de exposición reducida que comprende una planta de tabaco con aumento de nicotina, en que el aumento de nicotina es de hasta el doble. En otro caso preferido de la presente divulgación se fabrica un cigarrillo de exposición reducida que comprende tabaco con aumento de nicotina, en que el aumento de nicotina es superior al doble.
- 60
- [000141]** El programa de ensayo de variedades llevado a cabo por el Servicio de Investigación Agrícola de la Universidad del Estado de Carolina del Norte evalúa las líneas de mejora a través del *Programa Regional de*

Mínimos Estándares y las líneas comerciales a través del *Ensayo Oficial de Variedades de Carolina del Norte* (NCOVT). La concentración total de alcaloides de variedades comerciales curadas al humo descrita en la media de tres años del NCOVT, desde 2001 a 2003, varía del 2,45 al 3,17 %. Smith y col., "Variety Information," capítulo 3 en: NORTH CAROLINA OFFICIAL VARIETY TEST (2004), tabla 3.1. La media de tres años de la concentración total de 5 alcaloides fue del 2,5 % para K-326, el cultivar utilizado en los ejemplos 4-6 y 9-14. Para medir el contenido de alcaloides totales de los cultivares de tabaco en el NCOVT anterior y con el fin de medir el contenido de alcaloides totales del tabaco y las plantas con aumento de nicotina de la presente invención se usa el procedimiento espectrométrico. Grupo de Asesoramiento Técnico de los EE. UU., ISO/TC 126 - Tobacco and tobacco products: ISO/DIS 2881. Según se describe en este documento, incluidas las figuras, parece que algunas plantas con 10 aumento de nicotina tienen la capacidad de al menos duplicar o incluso más que triplicar la acumulación de nicotina de los controles naturales K326. Igualmente, en los ejemplos 4 a 6, la sobreexpresión de *NBB1* y *A622* produce un aumento de nicotina del doble o incluso del triple en comparación con los controles naturales.

[000141] El "curado" es el proceso de envejecimiento que reduce la humedad y provoca la destrucción de la 15 clorofila, lo que da lugar a hojas de tabaco con un color dorado, y por el que el almidón se convierte en azúcar. Por lo tanto, el tabaco curado tiene mayor contenido de azúcares reductores y menor contenido de almidón que la hoja verde recolectada. El "tabaco curado al humo" se refiere a un procedimiento de secado de las plantas de tabaco en un granero ventilado con calor y se caracteriza por un color único, un alto contenido de azúcares reductores, un cuerpo de medio a pesado y excepcionalmente suave al fumar. Bacon y col., Ind. Eng. Chem. 44: 292 (1952).

[000142] Las nitrosaminas específicas del tabaco (TSNA) son una clase de carcinógenos que se forman predominantemente durante el curado y el procesamiento. Hoffman, D. y col., J. Natl. Cancer Inst. 58: 1841-4 (1977); Wiernik, A. y col., Recent Adv. Tob. Sci. 21: 39-80 (1995). Las TSNA como 4-(*N*-nitrosometilamino)-1-(3-piridil)-1-butanoa (NNK), *N'*-nitrosonornicotina (NNN), *N'*-nitrosoanatabina (NAT) y *N'*-nitrosoanabasina (NAB) se forman por 25 la *N*-nitrosación de nicotina y otros alcaloides secundarios de *Nicotiana*, como nornicotina, anatabina y anabasina.

[000143] Las plantas con aumento de nicotina pueden contener más nitrosaminas, ya que existe una correlación positiva entre el contenido de alcaloides en tabaco y la acumulación de TSNA. Por ejemplo, se ha encontrado un coeficiente de correlación significativa de 0,76 entre anatabina y NAT. Djordjevic y col., J. Agric. Food Chem., 37: 30 752-56 (1989). Sin embargo, las patentes de los EE. UU. nº 5.803.081, nº 6.135.121, nº 6.805.134, nº 6.895.974 y nº 6.959.712 y las solicitudes publicadas de los EE.UU. 2005/0034365, 2005/0072047, 2005/0223442, 2006/0041949, así como la solicitud PCT publicada WO 2006/091194 y otras describen metodología para reducir las nitrosaminas específicas del tabaco que puede aplicarse a un producto de tabaco que utiliza la presente divulgación.

[000144] Por consiguiente, la presente divulgación proporciona construcciones y metodología para la producción 35 de cigarrillos y otros productos de tabaco que contienen mayores niveles de nicotina. Un cigarrillo de exposición reducida deseable debería suministrar a un fumador el nivel deseado de nicotina por cigarrillo de la manera lo más eficiente posible mientras mantiene un sabor aceptable. Véase el documento WO 05/018307.

40 Tabaco reconstituido, tabaco expandido y mezcla

[000145] El tabaco con aumento de nicotina puede usarse también para producir láminas de tabaco reconstituido (Recon) y tabaco expandido o tabaco inflado. El Recon puede producirse a partir de los siguientes: 45 polvo de tabaco, tallos, pequeñas partículas de hojas, otros productos secundarios del procesamiento del tabaco y la fabricación de cigarrillos y en algunos casos directamente la hoja entera. El proceso Recon, que varía según el fabricante, es muy semejante al proceso típico de fabricación de papel y supone el procesamiento de diversas fracciones de tabaco y el cortado posterior de las láminas de Recon en una forma y tamaño que se asemeja al tabaco de los cigarrillos (tabaco cortado en hebras).

[000146] Además, el tabaco con aumento de nicotina puede usarse de acuerdo con la presente invención para producir tabaco expandido, también conocido como tabaco inflado, que es un componente importante en muchas marcas de cigarrillos. El tabaco expandido se prepara a través de la expansión de gases adecuados, en lo que el tabaco se "infla", lo que resulta en una menor densidad y mayor capacidad de relleno, lo que a su vez, reduce el peso del tabaco usado en los cigarrillos. Al usar el tabaco con aumento de nicotina como material de partida, los 55 cigarrillos fabricados con el tabaco expandido resultante producirán menores proporciones de sustancias químicas tóxicas, como alquitrán y monóxido de carbono, con respecto a nicotina.

[000147] El tabaco expandido con aumento de nicotina, el Recon con aumento de nicotina y el tabaco cortado en hebras con aumento de nicotina pueden mezclarse en cualquier proporción entre los tres o con cualquier 60 proporción de tabaco expandido sin transformar, Recon sin transformar o tabaco cortado en hebras sin transformar para producir relleno de cigarrillos con un contenido de nicotina diverso. Cualquiera de estas mezclas se incorpora después en el proceso de fabricación de cigarrillos de acuerdo con los procedimientos estándar conocidos en la técnica.

[000148] También se fabrican otros productos de tabaco distintos de los cigarrillos con el tabaco con aumento de nicotina manipulado por ingeniería genética, mediante el uso de cualquier material de plantas de tabaco descrito en

este documento de acuerdo con procedimientos estándar conocidos en la técnica. En una realización, se fabrican productos de tabaco que comprenden material obtenido de plantas de tabaco con aumento de nicotina. El mayor contenido de nicotina puede ser de hasta más del triple del contenido de los cultivares naturales.

5 Enzimas y análogos de alcaloides nicotínicos

[000149] Además de los productos de tabaco tradicionales, como cigarrillos y tabaco de mascar, la presente invención proporciona metodología para la producción de nicotina y análogos de nicotina, así como enzimas para la síntesis de nicotina y análogos de nicotina. Estos compuestos pueden ser producidos por plantas productoras de 10 nicotina y células no productoras de nicotina manipuladas por ingeniería genética, así como en un sistema sin células/*in vitro*.

[000150] Dado que existen estudios recientes que sugieren un papel para los receptores de nicotina en el tratamiento de diversas dolencias y trastornos, como la enfermedad de Alzheimer, la esquizofrenia, la disfunción de 15 los sistemas nerviosos central y autónomo, así como adicciones, existe la necesidad de fuentes de ligandos para receptores de nicotina. Por ejemplo, los procedimientos y construcciones de la presente invención pueden usarse para la producción de alcaloides nicotínicos. Se ha demostrado que cultivos de raíces capilares transgénicas que expresan *PTM* en exceso proporcionan un medio eficaz para la producción comercial a gran escala de escopolamina, un alcaloide tropánico de importancia farmacéutica. Zhang y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 101: 20 6786-91 (2004). Por consiguiente, pueden producirse cantidades a gran escala o comerciales de alcaloides nicotínicos en cultivos de raíces capilares de tabaco mediante la expresión de al menos uno de *A622* y *NBB1*. Igualmente, la presente descripción contempla sistemas de cultivos celulares como cultivos bacterianos o de células de insectos para la producción de cantidades a gran escala o comerciales de nicotina mediante la expresión de *A622* y *NBB1*.

[000151] Adicionalmente, pueden prepararse productos directamente mediante el uso de la actividad de las enzimas *NBB1* y *A622*. Por ejemplo, pueden usarse enzimas *NBB1* y *A622* recombinantes para la síntesis o síntesis parcial de alcaloides nicotínicos o análogos de alcaloides nicotínicos. Por consiguiente, pueden producirse cantidades a gran escala o comerciales de *A622* y *NBB1* por diversos procedimientos que incluyen la extracción de 30 la enzima recombinante de una planta, célula o sistema de cultivo manipulados por ingeniería genética, incluidos, pero sin limitarse a cultivos de raíces capilares, cultivos de células de insectos, bacterias, hongos, plantas, algas y mamíferos o *in vitro*.

[000152] A continuación se presentan algunos ejemplos específicos de procedimientos para la identificación de 35 secuencias codificantes de enzimas implicadas en la biosíntesis de nicotina, así como para la introducción del gen diana para producir plantas transformantes. Pretenden ser ejemplos y no limitaciones de la presente invención.

EJEMPLO 1: Identificación de *NBB1* como gen regulado por los locus NIC

[000153] Una micromatriz de ADNc preparada a partir de una colección de ADNc derivada de *Nicotiana sylvestris*, véase Katoh y col., Proc. Japan Acad. 79, serie B: 151-54 (2003), se usó para buscar nuevos genes controlados por los locus *NIC* reguladores de la biosíntesis de nicotina.

[000154] Los ADNc de *N. sylvestris* se amplificaron por PCR y se aplicaron sobre portaobjetos con un 45 recubrimiento especular (tipo 7 star, Amersham) mediante un aplicador de micromatrizes Lucidea de Amersham. El ADN se inmovilizó en la superficie del portaobjetos por entrecruzamiento con UV (120 mJ/m²). Se cultivaron 21 plántulas de *N. tabacum* Burley (tipo natural (WT) y *nic1nic2*) en ½x medio B5, enriquecido con sacarosa al 1,5 % (peso normalizado) y goma de gelano al 0,35 % (peso normalizado) (Wako) en recipientes Agripot (Kirin).

[000155] Se recolectaron las raíces de plántulas de ocho semanas, que se congelaron inmediatamente con 50 nitrógeno líquido y se mantuvieron a -80 °C hasta su uso. A partir de las raíces congeladas se aisló el ARN total mediante el kit Plant RNeasy Mini (Qiagen) y el ARNm se purificó con el kit para minipreparaciones de ARNm GenElute (Sigma). El ADNc se sintetizó a partir de 0,4 µg del ARNm purificado con el kit para micromatrizes LabelStar (Qiagen) en presencia de Cy3 o Cy5-dCTP (Amersham). La hibridación del ADNc con los portaobjetos con 55 las micromatrizes y los lavados tras la hibridación se realizaron con una máquina de hibridación Lucidea SlidePro (Amersham). Las micromatrizes se examinaron mediante un escáner FLA-8000 (Fujifilm). La intensidad de la señal en las imágenes de las micromatrizes obtenidas se cuantificó con el programa ArrayGauge (Fujifilm). Las sondas de ADNc del tabaco natural y del tabaco *nic1nic2* se marcaron con Cy3 y Cy5 en combinaciones de pares recíprocos. Las señales de hibridación se normalizaron teniendo en cuenta la intensidad total de la señal de los colorantes. Se 60 identificaron los clones de ADNc que hibridaron con las sondas naturales con una intensidad de más del doble en comparación con las sondas *nic1nic2* y estos incluyeron *NBB1*.

[000156] Un ADNc de *NBB1* de longitud completa se obtuvo por amplificación RACE de los extremos 5' y 3' a 65 partir de ARN total de *N. tabacum* mediante un kit de amplificación de ADNc SMART RACE (Clontech). El ADNc de *NBB1* de longitud completa resultante se clonó en el vector pGEM-T (Promega) para dar lugar a pGEMTNBB1cDNAfull.

[000157] La secuencia nucleotídica del inserto de ADNc de *NBB1* se determinó en las dos hebras mediante un analizador genético ABI PRISM® 3100 (Applied Biosystems) y un kit de secuenciación de ciclo BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems). El ADNc de *NBB1* de longitud completa se muestra en SEQ ID NO: 1. La secuencia 5 aminoacídica codificada por la secuencia nucleotídica se muestra en SEQ ID NO: 2. La secuencia proteínica incluye un motivo de unión a FAD. En el extremo N se encuentra un potencial péptido señal vacuolar.

EJEMPLO 2: caracterización de *NBB1*

10 **[000158]** La expresión de *NBB1* en plantas de tabaco se investigó por análisis de transferencia Northern.

[000159] Se cultivaron *in vitro* plantas de *Nicotiana tabacum* cv. Burley 21 (abreviada a continuación como WT) y líneas mutantes, en las cuales se habían introducido las mutaciones *nic1*, *nic2* o ambas *nic1* y *nic2* en el fondo genético Burley 21, durante dos meses a 25 °C con 150/1 mol de fotones/m² de luz (16 h de luz, 8 h de oscuridad) 15 en ½x medio B5 con sacarosa al 3 % y goma de gelano al 0,3 %. Las plantas se trataron con vapor de metiljasmonato mediante la adición de 0,5 ml de metiljasmonato 100 µM a un recipiente Agripot (Kirin, Tokio, Japón) con una capacidad para medio sólido de 80 cm³ y una capacidad de gas de 250 cm³ que contenía las plantas. Los momentos de tratamiento se fijaron a 0 h y 24 h. Se recogieron las partes de las raíces y las hojas (hojas 2^a a 6^a de una planta con un total de siete a diez hojas) de las plantas, que inmediatamente se almacenaron congeladas en 20 nitrógeno líquido.

[000160] El ARN se extrajo mediante un kit RNeasy Midi (Qiagen), de acuerdo con el protocolo del fabricante. Sin embargo, se añadió polivinilpirrolidona hasta una concentración del 1 % al tampón RL T del kit de Qiagen. La operación de la columna se llevó cabo dos veces para aumentar la pureza del ARN.

25 **[000161]** La transferencia de ARN se realizó de acuerdo con los procedimientos indicados por Sambrook y Russell (Sambrook, J. y col., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 7 (2001)).

30 **[000162]** Como molde para la sonda se usó el fragmento de secuencia desde 1.278 pb hasta el final (1.759 pb) de la secuencia nucleotídica de *NBB1* (SEQ ID NO: 1). El molde se preparó por amplificación del clon de ADNc por PCR mediante los cebadores siguientes:

cebador 1: GGAAAACATAACAACGGAATCTCT
cebador 2: GATCAAGCTATTGCTTCCCT

35 **[000163]** La sonda se marcó con ³²P mediante un kit de marcaje Bcabest (Takara) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La hibridación se llevó a cabo con el tampón ULTRAhyb (Ambion) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

40 **[000164]** La sonda de *PTM* se preparó a partir de una secuencia de *PTM* clonada en el vector pcDNAII en *E. coli* (Hibi y col., 1994). El plásmido se extrajo y purificó de *E. coli* mediante un kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen), se trató con las enzimas de restricción *Xba*I y *Hind*III por procedimientos ordinarios y el ADN digerido se sometió a electroforesis en un gel de agarosa. Los fragmentos de ADN de aproximadamente 1,5 kb se recogieron mediante el kit de extracción para geles QIAquick (Qiagen). Los fragmentos de ADN recogidos se marcaron con ³²P por los 45 mismos procedimientos usados para la sonda de *NBB1* y se hibridaron.

[000165] Como muestra la figura 1, *NBB1* y *PTM* tienen el mismo patrón de expresión en plantas de tabaco. La prueba de que *NBB1* está implicado en la biosíntesis de nicotina es que, al igual que *PTM*, *NBB1* está bajo el control de los genes *NIC* y muestra un patrón de expresión similar al de *PTM*.

50 **EJEMPLO 3: análisis filogenético de *NBB1***

[000166] El polipéptido *NBB1* tiene un 25 % de identidad y un 60 % de homología con la enzima del puente de la berberina de *Eschscholzia californica* (BBE). Dittrich y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 88: 9969-73 (1991)). Un 55 alineamiento del polipéptido *NBB1* con EcBBE se muestra en la figura 2.

[000167] Se construyó un árbol filogenético usando las secuencias del polipéptido *NBB1* y de polipéptidos de plantas similares a BBE, basado en Carter y Thornburg, Plant Physiol. 134: 460-69 (2004). El análisis filogenético se realizó por el procedimiento de unión de vecinos con el programa CLUSTAL W. Los números indican valores de 60 iniciales de 1.000 réplicas. Las secuencias usadas fueron EcBBE, BBE de amapola de California (nº de acceso de GenBank AFOOS655); PsBBE, probable reticulina-oxidasa de adormidera (*Papaver somniferum*) (AF025430); BsBBE, BBE de agracejo (*Berberis stolonifera*) (AF049347); VucPRD2, proteína inducida por la sequía de caupí (*Vigna unguiculata*) (AB056448); nectarina V de *Nicotiana* sp. (AFS034411AF503442); HaCHOX, carbohidrato-oxidasa de girasol (*Helianthus annuus*) (AF472609); LsCHOX, carbohidrato-oxidasa de lechuga (*Lactuca sativa*) 65 (AF472608); y 27 genes de *Arabidopsis* (Atlg01980, Atlg1770, Atlg26380, Atlg26390, Atlg26400, Atlg26410, Atlg26420, Atlg30700, Atlg30710, Atlg30720, Atlg30730, Atlg30740, Atlg30760, Atlg34575, At2g34790, At2g34810,

At4g20800, At4g20820, At4g20830, At4g20840, At4g20860, At5g44360, At5g44380, At5g44390, At5g44400, At5g44410 y At5g44440).

[000168] Los resultados se muestran en la figura 3. Las tres BBE conocidas forman un clado separado y están subrayadas e indicadas como “BBE verdaderas”. La secuencia de NBB1 no es muy similar a ninguna de las BBE ni a las proteínas similares a BBE y se separa de las otras secuencias en la base del árbol. La única otra proteína similar a BBE descrita del género *Nicotiana*, nectarina V, una proteína descrita en el néctar del híbrido ornamental de *Nicotiana langsdorffii* x *N. sanderae*, Carter y Thornburg (2004), se agrupa con la proteína inducida por la sequía de caupí y varias proteínas potencialmente similares a BBE de *Arabidopsis*. Dado que el néctar del tabaco ornamental carece de alcaloides y la nectarina V tiene actividad de glucosa-oxidasa, se concluyó que la nectarina V está implicada en la defensa contra microorganismos en las flores y no es probable que tenga ningún papel en la síntesis de alcaloides (misma referencia).

EJEMPLO 4: sobreexpresión de *NBB1* en raíces capilares de tabaco

15 *Preparación de la construcción para la sobreexpresión de NBB1*

[000169] Se amplificó un fragmento attB-*NBB1* por PCR con el vector pGEMTNBB1cDNAfull del ejemplo 1 como molde y dos pares de cebadores; un par para la amplificación específica del gen *NBB1* (cebadores específicos del gen) y otro par para añadir las secuencias attB (cebadores adaptadores). Las condiciones de PCR fueron las recomendadas por el fabricante. El clon de entrada para el sistema GATEWAY, pDONR221-*NBB1*, se creó por una reacción de recombinación BP entre el producto de PCR, attB-*NBB1*, y pDONR221 (Invitrogen).

25 Cebadores específicos del gen

NBB1-attB1 5' AAAAAGCAGGCTCACCATGTTCCGCTCATAATTCTG
NBB1-attB2 5' AGAAAGCTGGGTTCACTGCTATACTTGTGC

30 Cebadores adaptadores

adaptador attB1 5' GGGGACAAGTTGTACAAAAAGCAGGCT
adaptador attB2 5' GGGGACCACTTGTACAAGAAAGCTGGGT

35 *Descripción de pTobRD2-DEST*

[000170] La región promotora TobRD2 (SEQ ID NO: 5 en el documento WO9705261), de 1.031 pb, se amplificó usando el ADN genómico de Burley 21 como molde y los cebadores específicos del promotor TobRD2 y después se digirió con *Hind*III y *Xba*I.

40 **[000171]** Cebadores específicos del promotor TobRD2:

TobRD2-01F 5' AAAGCTTGGAAACATATTCAATACATTGTAG
se subraya el sitio *Hind*III
TobRD2-02R 5' TCTAGATTCTACTACTATTTATAAGTG
45 se subraya el sitio *Xba*I

[000172] El fragmento resultante se clonó entre los sitios *Hind*III y *Xba*I de pBI101H (suministrado por Dr. Shuji Yokoi de NAIST; ref.: Molecular Breeding 4: 269-275, 1998), lo que resultó en el plásmido pTobRD2-BI101H. Una casete para el sistema GATEWAY, que contenía los sitios de recombinación attR flankeando un gen *ccdB* y un gen 50 de resistencia a cloranfenicol, se clonó entre los sitios *Xba*I y *Sac*I del vector binario pTobRD2-BI101H para producir el vector binario pTobRD2-DEST, que tiene una región de ADN-T que contiene una casete de expresión del gen *NPTII* (promotor Nos - ORF II de neomicina-fosfotransferasa - terminador Nos) y una casete de expresión del gen *HPT* (promotor CaMV35S - ORF de higromicina-fosfotransferasa - terminador Nos) como marcadores de selección flankeando al promotor TobRD2 adyacente a una casete de GATEWAY. En la figura 4A se muestra un diagrama 55 de la región de ADN-T de pTobRD2-DEST.

[000173] La ORF de *NBB1* se transfirió mediante una reacción LR desde el vector pDONR221-*NBB1* al vector binario de GATEWAY pTobRD2-DEST, diseñado para expresar una ORF clonada bajo el control del promotor TobRD2. En la figura 4B se muestra un diagrama de la región de ADN-T del vector de expresión final pTobRD2-60 *NBB1ox*.

Producción de raíces capilares transgénicas

[000174] El vector binario pTobRD2-*NBB1ox* se introdujo por electroporación en la cepa 15834 de 65 *Agrobacterium rhizogenes*. Se transformaron plantas naturales de *Nicotiana tabacum* cv. K326 mediante *A. rhizogenes* por el procedimiento de los discos de hoja, básicamente según se describe en Kanegae y col., Plant

Physiol. 105:2: 483-90 (1994). Como marcador de selección para las líneas transformadas por pTobRD2-NBB1ox (líneas TN) se usó la resistencia a kanamicina (200 mg/l en medio B5). *A. rhizogenes* natural se usó para producir líneas de raíces capilares de control (WT). Las raíces capilares de tabaco se cultivaron en medio B5 líquido a 27 °C en condiciones de oscuridad durante dos semanas y después se recolectaron.

5

Procedimiento para el análisis de la expresión

[000175] Los niveles de expresión de la proteína NBB1 se analizaron por inmunotransferencia. Las raíces capilares se congelaron en nitrógeno líquido e inmediatamente se homogeneizaron con un mortero y mano en un tampón de extracción (Tris-HCl 100 mM, pH 6,8, SDS al 4 %, glicerol al 20 %) que contenía fluoruro de feniilmetsulfonilo 1 mM y ditiotreitol 200 mM. Después de la centrifugación de los homogeneizados, las proteínas en el sobrenadante se separaron por SDS-PAGE. Se llevó a cabo un análisis de inmunotransferencia con un suero de conejo dirigido contra NBB1. Los procedimientos detallados han sido descritos previamente. Shoji y col., Plant Mol. Biol., 50: 427-440 (2002). El análisis de inmunotransferencia con el antisuero contra NBB1 muestra un aumento de los niveles de la proteína NBB1 para las líneas de raíces capilares transgénicas TN9 y TN17. Véase la figura 5A.

Procedimiento para el análisis de los niveles de alcaloides

[000176] Las raíces capilares transgénicas se cultivaron durante dos semanas, se recolectaron y se liofilizaron. A 19 mg de la muestra liofilizada se le añadieron 2 ml de ácido sulfúrico 0,1 N. Esta suspensión se sometió a ultrasonidos durante 15 min y se filtró. Se añadió hidróxido de amonio (0,1 ml de NH₃ al 28 %; Wako) a 1 ml del filtrado y la mezcla se centrifugó durante 10 min a 15.000 rpm. Una muestra del sobrenadante (1 ml) se cargó en una columna Extrelut-1 (Merck) y se dejó reposar durante 5 min. Los alcaloides se eluyeron con 6 ml de cloroformo. La fracción de cloroformo eluida se secó a presión reducida y 37 °C en un evaporador (concentrador Taitec TC-8). La muestra seca se disolvió en 50 µl de una disolución de etanol que contenía dodecano al 0,1 %. Para el análisis de las muestras se usó un cromatógrafo de gases (GC-14B, Shimadzu) equipado con una columna capilar (columna Rtx-5Amine, Restec) y un detector FID. La temperatura de la columna se mantuvo a 100 °C durante 10 min, se elevó a 150 °C a 25 °C/min, se mantuvo a 150 °C durante 1 min, se elevó a 170 °C a 1 °C/min, se mantuvo a 170 °C durante 2 min, se elevó a 300 °C a 30 °C/min y entonces se mantuvo a 300 °C durante 10 min. La temperatura de inyección y del detector fue de 300 °C. Se injectó una muestra de 1 µl de la preparación de alcaloides purificados y el contenido de alcaloides se midió por el procedimiento del estándar interno.

[000177] Las líneas de raíces capilares transformadas con el vector para la sobreexpresión de NBB1, pTobRD2-NBB1ox, (TN9, TN17) muestran un aumento de los niveles de nicotina y nornicotina en comparación con las líneas de raíces capilares naturales. Véase la figura 6.

EJEMPLO 5: Sobreexpresión de A622 en raíces capilares de tabaco

Preparación de una construcción para la sobreexpresión de A622

[000178] Se amplificó un fragmento attB-A622 con el vector pcDNAII-A622, según Hibi y col, Plant Cell 6: 723-35 (1994), como molde, los cebadores específicos de A622 siguientes y los cebadores adaptadores según se describen anteriormente en el ejemplo 4.

45 Cebadores específicos del gen

A622-attB1 5' AAAAACAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGGTTGTATCAGAGAAAAGCA
A622-attB2 5' AGAAAGCTGGGTCCCTAGACAAATTGTTGTTAGAACTCGTCG

50 **[000179]** El fragmento de A622 amplificado se clonó en el vector pDONR221 mediante una reacción BR, lo que resultó en pDONR-A622, y después el fragmento de A622 se transfirió de pDONR-A622 a pTobRD2-DEST mediante una reacción LR. El vector de expresión resultante se denominó pTobRD2-A622ox. En la figura 4C se muestra un diagrama de la región de ADN-T de pTobRD2-A622ox.

55 *Producción de raíces capilares transgénicas*

[000180] Se transformaron plantas naturales de *N. tabacum* cv. K326 con *A. rhizogenes* 15834 que contenía el vector pTobRD2-A622ox, según se describe anteriormente en el ejemplo 4. Las raíces capilares transgénicas con el ADN-T de pTobRD2-A622ox se denominaron líneas TA y se cultivaron según se describe anteriormente en el 60 ejemplo 4.

Procedimiento para el análisis de la expresión

[000181] Se llevó a cabo un análisis de inmunotransferencia según se describe anteriormente en el ejemplo 4, 65 excepto porque para la detección de la proteína A622 se usó suero de ratón dirigido contra A622. Las líneas de raíces capilares TA11, TA14 y TA21 transformadas con el vector para la sobreexpresión de A622 demostraron tener

mayores niveles de la proteína A622. Véase la figura 5B.

Procedimiento para el análisis de los niveles de alcaloides

5 [000182] Los alcaloides del tabaco se extrajeron, purificaron y analizaron según se describe anteriormente en el ejemplo 4. Las líneas de raíces capilares TA11, TA14 y TA21, transformadas con el vector para la sobreexpresión de A622 presentaron mayores niveles de nicotina y nornicotina. Véase la figura 6.

EJEMPLO 6: sobreexpresión de NBB1 y A622 en raíces capilares de tabaco

10 *Preparación de la construcción para la sobreexpresión de A622 y NBB1*

[000183] Con el fin de expresar en exceso las dos proteínas A622 y NBB1 a partir de un único ADN-T, las cassetes de expresión TobRD2-A622 y TobRD2-NBB1 se clonaron en tandem en un vector binario. La cassette 15 TobRD2-A622 se escindió de pTobRD2-A622ox con HindIII y después se clonó en el sitio HindIII en el extremo 5' del promotor TobRD2 en pTobRD2-NBB1ox. El vector resultante para la sobreexpresión de ambos NBB1 y A622 se denominó pTobRD2-A622ox-NBB1ox. En la figura 4B se muestra un diagrama de la región de ADN-T de pTobRD2-A622ox-NBB1ox.

20 *Producción de raíces capilares transgénicas*

[000184] Se transformaron plantas naturales de *N. tabacum* cv. K326 con *A. rhizogenes* 15834 que contenía el vector pTobRD2-A622ox-NBB1ox, según se describe anteriormente en el ejemplo 4. Las raíces capilares transgénicas con el ADN-T de pTobRD2-A622ox-NBB1ox se denominaron líneas TNA y se cultivaron según se 25 describe anteriormente en el ejemplo 4.

Procedimiento para el análisis de la expresión

[000185] Se llevó a cabo un análisis de inmunotransferencia según se describe anteriormente en el ejemplo 4, 30 excepto porque para la detección de las proteínas se usó suero de ratón dirigido contra A622 y suero de conejo dirigido contra NBB1. La línea de raíces capilares TNA8, muestra un aumento del nivel de expresión de ambas proteínas NBB1 (véase la figura 5A) y A622 (véase la figura 5B) en comparación con las líneas de raíces capilares naturales.

35 *Procedimiento para el análisis de los niveles de alcaloides*

[000186] Los alcaloides del tabaco se extrajeron de la línea de raíces capilares TNA8, se purificaron y analizaron según se describe anteriormente en el ejemplo 4. Los niveles de nicotina y nornicotina son mayores en la línea TNA8 que en las líneas de raíces capilares naturales. (Véase la figura 6).

40 **EJEMPLO DE REFERENCIA 7: plantas transgénicas de *A. belladonna* que expresan la proteína A622.**

[000187] *Atropa belladonna* produce los alcaloides tropánicos hiosciamina y escopolamina, que derivan del catión N-metilpirrolinio, pero no contiene alcaloides nicotínicos, posiblemente debido a la ausencia de los genes NBB1 y 45 A622.

[000188] El ADNc de A622 de tabaco con un sitio Ncol introducido en el primer ATG se escindió del vector pcDNAII-A622 (Hibi y col., 1994) como fragmento Ncol-BamHI y se clonó en pRTL2 (Restrepo y col., Plant Cell 2: 987-98 (1990)) bajo el control del promotor CaMV35S con un potenciador duplicado. Esta cassette para la 50 sobreexpresión de A622 se escindió con HindIII y se clonó en el vector binario pGA482 (Amersham) para producir el vector de expresión de A622 pGA-A622.

Producción de plantas transgénicas

55 [000189] El vector binario pGA-A622 se introdujo por electroporación en la cepa EHA105 de *A. tumefaciens*. Se transformaron plantas de *A. belladonna* con *A. tumefaciens* con el procedimiento de los discos de hoja, básicamente según describen Kanegae y col. (Plant Physiol. 105(2): 483-90 (1994)). Como marcador de selección para la transformación por pGA-A622 se usó la resistencia a kanamicina (200 mg/l en medio MS/B5). A partir de los discos de hoja se regeneraron plantas transgénicas para 35S-A622, que se cultivaron a 22 °C en una cámara climática en 60 condiciones de luz continua.

Procedimiento para el análisis de la expresión

[000190] Las proteínas totales se extrajeron de las hojas de plantas naturales y plantas 35S-A622 T1, según se 65 describe anteriormente en el ejemplo 5. Se llevó a cabo un análisis de inmunotransferencia con suero de ratón dirigido contra A622. Para el análisis de alcaloides se usaron los tejidos de hojas de plantas de la generación T1

autopolinizadas que contenían grandes cantidades de la proteína A622, como la línea C1 n°3 (véase la figura 7).

Procedimiento para el análisis de los niveles de alcaloides

5 [000191] Los alcaloides nicotínicos en plantas transgénicas de *A. belladonna* se trajeron con H₂SO₄ 1M y se purificaron básicamente según se ha descrito (Hashimoto y col., 1992). Los alcaloides se identificaron por cromatografía de gases y espectrometría de masas (CG-EM) (Hewlett Packard 5890 serie II/JEOL MStation JMS700 con una columna HP-5ms) después de la comparación de su espectro de masas con los de estándares de autenticidad. La temperatura de la columna se mantuvo a 100 °C durante 10 min, se elevó a 150 °C a 25 °C/min, se 10 mantuvo a 150 °C durante 1 min, se elevó a 170 °C a 1 °C/min, se mantuvo a 170 °C durante 2 min, se elevó a 300 °C a 30 °C/min y entonces se mantuvo a 300 °C durante 10 min. La introducción de solo A622 en *A. belladonna* no resultó en la acumulación de nicotina ni de otros alcaloides nicotínicos.

EJEMPLO DE REFERENCIA 8: raíces capilares transgénicas de *A. belladonna* que expresan las proteínas NBB1 y A622

Preparación de la construcción para la sobreexpresión de NBB1

20 [000192] Para investigar si la combinación de NBB1 y A622 es suficiente para la reacción de acoplamiento de alcaloides nicotínicos, se produjeron raíces capilares transgénicas de *A. belladonna* que expresaban a la vez A622 y NBB1 mediante la transformación de hojas de las plantas de *Atropa* que expresaban A622 del ejemplo 7 con una cepa 15834 de *A. rhizogenes* que contenía un vector de expresión de NBB1.

Descripción de pBI101H-E2113-DEST

25 [000193] El vector binario pBE2113 que contiene el promotor CaMV35S con un potenciador duplicado (EI2) y la secuencia de la región 5' del virus del mosaico del tabaco (Ω) se obtuvo de Dr. Yuko Ohashi, Instituto Nacional de Recursos Agrobiológicos (Tsukuba, Japón), véase Plant Cell Physiol. 37: 49-59 (1996), y se convirtió en un vector de destino para el sistema GATEWAY, después de clonar la casete de GATEWAY, que contiene los sitios de recombinación attR flanqueando un gen *ccdB* y un gen de resistencia a cloranfenicol, entre los sitios *Xba*I y *Sac*I en el vector, lo que sustituyó el gen de la β -glucuronidasa por dicha casete de GATEWAY. El vector binario de destino resultante se dirigió con *Hind*III y *Sac*I y el fragmento *Hind*III-*Sac*I que contenía la casete EI2-35S-S2-GATEWAY se clonó entre los sitios *Hind*III y *Sac*I de pBI101H. El vector binario de destino resultante se denominó pBI101H-E2113-DEST. En la figura 4E se muestra un diagrama de la región de ADN-T de pBI101H-E2113-DEST.

35 [000194] La ORF de NBB1 se transfirió desde el vector pDONR221-NBB1-2 al vector binario de GATEWAY pBI101H-E2113-DEST mediante una reacción LR. El vector de expresión se denominó pEl235S Ω -NBB1. En la figura 4F se muestra un diagrama de la región de ADN-T de pEl235S Ω -NBB1.

40 *Producción de raíces capilares transgénicas*

[000195] El vector binario pEl235S Ω -NBB1 se introdujo en la cepa 15834 de *A. rhizogenes* por electroporación. A continuación, se transformaron tejidos de hoja de plantas de la generación T1 que contenían una casete 35S-A622 de expresión de A622 (línea C1 n° 3) con el *A. rhizogenes* que contenía pEl235S Ω -NBB1 mediante el procedimiento de los discos de hoja, según describen Kanegae y col. (Plant Physiol. 105(2): 483-90 (1994)). Como marcador de selección se usó la resistencia a higromicina (30 mg/l en medio B5). Las raíces capilares transgénicas que contenían el ADN-T de pEl235S Ω -NBB1 (línea E) y raíces capilares transgénicas infectadas con *A. rhizogenes* natural, sin ADN-T, como control (línea WT) se cultivaron en el medio líquido MS/B5 durante dos semanas y entonces se recolectaron.

50 *Análisis de la expresión*

[000196] Las proteínas totales se trajeron y se llevó a cabo un análisis de inmunotransferencia según se describe anteriormente en el ejemplo 4. Para la detección de la proteína A622 se usó suero de ratón dirigido contra A622, mientras que para la detección de la proteína NBB1 se usó suero de conejo dirigido contra NBB1. Una línea transgénica de raíces capilares de *A. belladonna* (E2) expresa grandes cantidades de las dos proteínas NBB1 y A622 (véase la figura 8).

Análisis de alcaloides

60 [000197] Las raíces capilares de *A. belladonna* transgénica E2 y WT se cultivaron durante tres semanas en 10 ml del medio líquido MS/B5 con 100 mg/ml de ácido nicotínico. Los alcaloides nicotínicos en las raíces capilares de E2 y WT se trajeron con H₂SO₄ 1M y se purificaron, básicamente según se ha descrito (Hashimoto et al., 1992). Los alcaloides se identificaron por cromatografía de gases y espectrometría de masas (CG-EM) (Hewlett Packard 5890 serie II/JEOL MStation JMS700 con una columna HP-5ms) después de la comparación de su espectro de masas con los de estándares de autenticidad. La temperatura de la columna se mantuvo a 100 °C durante 10 min, se elevó a

150 °C a 25 °C/min, se mantuvo a 150 °C durante 1 min, se elevó a 170 °C a 1 °C/min, se mantuvo a 170 °C durante 2 min, se elevó a 300 °C a 30 °C/min y entonces se mantuvo a 300 °C durante 10 min.

[000198] Se detectó un nuevo pico pequeño pero distinto (véase el pico 5 en la figura 9). En las raíces capilares de la línea WT no se detectó ningún pico correspondiente al pico 5. El compuesto del pico 5 mostró un perfil de fragmentación en EM idéntico al de la nicotina, según se muestra en la figura 10. Esto demuestra que la expresión de NBB1 y A622 exógenas es suficiente para la formación de nicotina en raíces capilares de *A. belladonna*.

EJEMPLO 9: aumento del contenido de nicotina por la expresión de *PMT* bajo el control del promotor de *A622*

Descripción de pA622pro-DEST

[000199] pA622pro-DEST tiene la casete de expresión del gen *NPTII* y la casete de expresión del gen *HPT* como marcadores de selección. El promotor de *A622* de 1.407 pb se amplificó mediante un vector que contenía el promotor de *A622* (Shoji y col., Plant Mol. Biol. 50: 427-440 (2002)) como molde y los cebadores específicos del promotor de *A622* que se muestran a continuación y se digirió con *HindIII* y *XbaI*. El fragmento resultante se clonó entre los sitios *HindIII* y *XbaI* en pBIIOIH. El vector binario se convirtió en un vector de destino para el sistema GATEWAY, después de clonar la casete de GATEWAY, que contiene los sitios de recombinación *attR* flanqueando un gen *ccdB* y un gen de resistencia a cloranfenicol, entre los sitios *XbaI* y *SacI* en el vector binario. Véase la figura 11A.

Cebadores específicos del promotor de *A622*

25 A622pro-OIF 5' AAAAGCTTAGATCTCTCTTATGTTTCATG
se subraya el sitio *HindIII*
A622pro-02R 5' TCTAGATTACTCCTAGGGGAAGAAAAAAAGTAGC
se subraya el sitio *XbaI*

30 *Preparación de la construcción para la sobreexpresión de PMT*

[0200] Se amplificó un fragmento attB-PMT usando un vector con *PMT* de tabaco, en el que la ORF de *PMT* (número de acceso de NCBI D28506) se había clonado en el sitio *BstXI* de pcDNAII (Invitrogen) (véase SEQ ID NO: 7B), como molde, los cebadores específicos del gen mostrados a continuación y cebadores adaptadores de la secuencia attB, según se describe anteriormente en el ejemplo 4. El clon de entrada para el sistema GATEWAY, pDONR221-PMT, se creó mediante una reacción de recombinación BP entre el producto de PCR, attB-PMT, y pDONR221 (Invitrogen).

Cebadores específicos del gen

40 PMT-attB1 5' AAAAAGCAGGCTAAAAATGGAAGTCATATC
PMT-attB2 5' AGAAAGCTGGGTTAACGACTCGATCATACTTC

[0201] La ORF de *PMT* se transfirió desde el vector pDONR221-PMT al vector binario de GATEWAY pA622pro-DEST mediante una reacción LR. El vector de expresión del gen se denominó pA622pro-PMTox. Véase la figura 11B.

Producción de plantas transgénicas de tabaco

[0202] El vector pA622pro-PMTox se transformó en la cepa EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens*, que se usó para transformar hojas de la variedad K326 natural. Se regeneraron brotes transgénicos T0 y se transfirieron al medio de enraizamiento. Varias plantas transgénicas enraizadas se transfirieron al suelo.

Análisis de alcaloides

55 **[0203]** Los alcaloides se extrajeron de las hojas del tabaco transgénico y se analizaron según se describe anteriormente en el ejemplo 4. Se analizó el contenido de nicotina en las hojas de plantas muestreadas 36 días después de su transferencia al suelo. Varias líneas transgénicas transformadas con pA622pro-PMTox mostraron mayor acumulación de nicotina que las líneas de control, en las que plantas K326 naturales habían sido transformadas con una casete AG-GUS. Véase la figura 12.

60 **EJEMPLO 10: aumento del contenido de nicotina por la expresión de *PMT* bajo el control del promotor *TobRD2***

Preparación de la construcción para la sobreexpresión de PMT

65 **[0204]** La ORF de *PMT* se transfirió desde el vector pDONR221-PMT al vector binario de GATEWAY

pTobRD2-DEST (véase la figura 4A) mediante una reacción LR. El vector de expresión del gen se denominó pTobRD2-PMTox. Véase la figura 11C.

Producción de plantas transgénicas de tabaco

5

[0205] El vector pTobRD2-PMTox se transformó en la cepa ERA105 de *Agrobacterium tumefaciens*, que se usó para transformar hojas de la variedad K326 natural. Se regeneraron brotes transgénicos T0 y se transfirieron al medio de enraizamiento. Varias plantas transgénicas enraizadas se transfirieron al suelo.

10 *Análisis de alcaloides*

[0206] Los alcaloides se extrajeron de las hojas del tabaco transgénico y se analizaron según se describe anteriormente en el ejemplo 4. Se analizó el contenido de nicotina en las hojas de plantas muestreadas 36 días después de su transferencia al suelo. Varias líneas transgénicas mostraron mayor acumulación de nicotina que las 15 líneas de control, en las que plantas K326 naturales habían sido transformadas con una casete TobRD2-GUS. Véase la figura 13.

EJEMPLO 11: aumento del contenido de nicotina mediante la expresión de QPT bajo el control del promotor de A622

20

Preparación de la construcción para la sobreexpresión de QPT

[0207] El fragmento de la ORF de QPT (SEQ ID NO: 5B) se amplificó usando el vector pBJY6 (proporcionado por Dr. Kenzo Nakamura, Universidad de Nagoya, Japón) como molde y los cebadores específicos del gen 25 mostrados a continuación. Se creó un clon de entrada de GATEWAY, pENTR-QPT, mediante una reacción de clonación TOPO.

Cebadores específicos del gen QPT

QPT-F 5' CACCATGTTAGAGCTATTCC

30 QPT-R 5' TCATGCTCGTTTGTCAGGCC

[0208] La ORF de QPT se transfirió desde el vector pENTR-QPT al vector binario de GATEWAY pA622pro-DEST (véase la figura 11A) mediante una reacción LR. El vector de expresión del gen se denominó pA622pro-QPTox. Véase la figura 11D.

35

Producción de plantas transgénicas de tabaco

[0209] El vector pA622-QPTox se transformó en la cepa ERA105 de *Agrobacterium tumefaciens*, que se usó para transformar hojas de la variedad K326 natural. Se regeneraron brotes transgénicos T0 y se transfirieron al 40 medio de enraizamiento. Varias plantas transgénicas enraizadas se transfirieron al suelo.

Análisis de alcaloides

[0210] Los alcaloides se extrajeron de las hojas del tabaco transgénico y se analizaron según se describe 45 anteriormente en el ejemplo 4. Se analizó el contenido de nicotina en las hojas de plantas muestreadas 36 días después de su transferencia al suelo. Varias líneas transgénicas mostraron mayor acumulación de nicotina que las líneas de control, en las que plantas K326 naturales habían sido transformadas con una casete A622-GUS. Véase la figura 14.

50 **EJEMPLO 12: aumento del contenido de nicotina mediante la expresión de QPT bajo el control del promotor TobRD2**

Preparación de la construcción para la sobreexpresión de QPT

55 **[0211]** La ORF de QPT se transfirió desde el vector pDONR221-QPT al vector binario de GATEWAY pTobRD2-DEST (véase la figura 4A) mediante una reacción LR. El vector de expresión del gen se denominó pTobRD2pro-QPTox. Véase la figura 11E.

Producción de plantas transgénicas de tabaco

60

[0212] El vector pTobRD2-QPTox se transformó en la cepa EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens*, que se usó para transformar hojas de la variedad K326 natural. Se regeneraron brotes transgénicos T0 y se transfirieron al medio de enraizamiento. Varias plantas transgénicas enraizadas se transfirieron al suelo.

65 *Análisis de alcaloides*

[0213] Los alcaloides se extrajeron de las hojas del tabaco transgénico y se analizaron según se describe anteriormente en el ejemplo 4. Se analizó el contenido de nicotina en las hojas de plantas muestreadas 36 días después de su transferencia al suelo. Varias líneas transgénicas mostraron mayor acumulación de nicotina que las líneas de control, en las que plantas K326 naturales habían sido transformadas con una casete TobRD2-GUS.

5 Véase la figura 15.

EJEMPLO 13: aumento del contenido de nicotina mediante la expresión de PMT y QPT bajo el control del promotor de A622

10 *Descripción de pBI221-A622pro-DEST*

[0214] pBI221-A622pro-DEST fue el vector básico para la construcción del vector binario de expresión multigénica. El promotor de *A622* de 1.407 pb se amplificó con el uso del vector pUC19-A622profull-LUC como molde y los cebadores específicos del promotor de *A622* y se digirió con *HindIII* y *XbaI*. El fragmento resultante se 15 clonó entre los sitios *HindIII* y *XbaI* en pBI221 (Clontech), con lo que se sustituyó el promotor CaMV35S por el promotor de *A622*. El vector se convirtió en un vector de destino para el sistema GATEWAY después de clonar la casete de GATEWAY, que contiene los sitios de recombinación *attR* flanqueando un gen *ccdB* y un gen de resistencia a cloranfenicol, entre los sitios *XbaI* y *SacI* en el vector, lo que sustituyó el gen de la β-glucuronidasa por dicha casete de GATEWAY. Después se insertó un adaptador *HindIII-EcoRI* en el sitio *EcoRI* en el extremo 3' del 20 terminador Nos, lo que dio lugar a pBI221-A622pro-DEST.

Preparación de la construcción para la sobreexpresión de PMT-QPT

[0215] Con el fin de expresar en exceso las dos proteínas PMT y QPT, las casetes de expresión A622pro-PM 25 T y A622pro-QPT se clonaron en tándem en un vector binario. Primeramente, la ORF de *PTM* se transfirió desde el vector pDONR221-PMT al vector binario de GATEWAY pBI221-A622pro-DEST mediante una reacción LR. El vector de expresión del gen se denominó pBI221-A622pro-PMT. pBI221-A622pro-PMT se digirió con *HindIII* y después se clonó en el sitio *HindIII* en el extremo 5' del promotor de *A622* del vector pA622pro-QPTox. El vector de expresión de *PTM-QPT* resultante se denominó pA622pro-PMTox-QPTox. En la figura 11F se muestra un diagrama 30 de la región de ADN-T de pA622pro-PMTox-QPTox.

Producción de plantas transgénicas de tabaco

[0216] El vector pA622pro-PMTox-QPTox se transformó en la cepa ERA1OS de *Agrobacterium tumefaciens*, 35 que se usó para transformar hojas de la variedad K326 natural. Se regeneraron brotes transgénicos TO y se transfirieron al medio de enraizamiento. Varias plantas transgénicas enraizadas se transfirieron al suelo.

Procedimiento para el análisis de los niveles de alcaloides

40 **[0217]** Los alcaloides se extrajeron de las hojas del tabaco transgénico y se analizaron según se describe anteriormente en el ejemplo 4. Se analizó el contenido de nicotina en las hojas de plantas muestreadas 36 días después de su transferencia al suelo. Varias líneas transformadas con pA622pro-PMTox-QPTox mostraron mayor acumulación de nicotina que las líneas de control, en las que plantas K326 naturales habían sido transformadas con una casete A622-GUS. Véase la figura 16.

45

EJEMPLO 14: aumento del contenido de nicotina mediante la expresión de PMT y QPT bajo el control del promotor TobRD2

Preparación de la construcción para la sobreexpresión de PMT-QPT

50

[0218] Con el fin de expresar en exceso las dos proteínas PMT y QPT bajo el control de TobRD2, las casetes de expresión TobRD2-PMT y TobRD2-QPT se clonaron en tándem en un vector binario. Primeramente, la ORF de *PTM* se transfirió desde el vector pDONR221-PMT al vector binario de GATEWAY pBI221-TobRD2-DEST mediante una reacción LR. El vector de expresión del gen se denominó pBI221-TobRD2-PMT. El vector pBI221-TobRD2-PMT 55 se digirió con *HindIII* y después se clonó en el sitio *HindIII* en el extremo 5' del promotor TobRD2 en pTobRD2-QPTox. El vector de expresión de *PTM-QPT* resultante se denominó pTobRD2-PMTox-QPTox. Véase la figura 11G.

Producción de plantas transgénicas de tabaco

60 **[0219]** El vector pTobRD2-PMTox-QPTox se transformó en la cepa EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens*, que se usó para transformar hojas de la variedad K326 natural. Se regeneraron brotes transgénicos TO y se transfirieron al medio de enraizamiento. Varias plantas transgénicas enraizadas se transfirieron al suelo.

Procedimiento para el análisis de los niveles de alcaloides

65

[0220] Los alcaloides se extrajeron de las hojas del tabaco transgénico y se analizaron según se describe

anteriormente en el ejemplo 4. Se analizó el contenido de nicotina en las hojas de plantas muestreadas 36 días después de su transferencia al suelo. Varias líneas transgénicas transformadas con TobRD2-PMTox-QPTox mostraron mayor acumulación de nicotina que las líneas de control, plantas K326 naturales transformadas con una casete TobRD2-GUS. Véase la figura 17.

5

EJEMPLO DE REFERENCIA 15: producción de alcaloides nicotínicos en *Arabidopsis* mediante la expresión de *NBB1* en combinación con enzimas de la biosíntesis de alcaloides adicionales

[0221] Las plantas de *Arabidopsis* no producen alcaloides nicotínicos. Sin embargo, un precursor de numerosos alcaloides nicotínicos, el ácido nicotínico, es un metabolito común. Se estudió el efecto de la expresión conjunta de *NBB1* y *A622* en *Arabidopsis*. Dado que la nicotina es un alcaloide de especial interés, se incluyó la expresión de *PMT* para aumentar la disponibilidad de metilputrescina, un precursor del anillo de pirrolidina en la nicotina.

15 *Preparación de la construcción para la sobreexpresión de A622*

[0222] El ADNc de *A622* de tabaco que contenía un sitio *Ncol* introducido en el primer ATG (Hibi y col., 1994) se escindió de pcDNAII (Invitrogen) como fragmento *Ncol-BamHI* y se clonó en pRTL2 (Restrepo y col., Plant Cell 2: 987-98 (1990)) bajo el control del promotor CaMV35S con un potenciador doble. Esta casete para la sobreexpresión de *A622* se escindió con *HindIII* y se clonó en el vector binario pGA482 (Amersham) para producir el vector de expresión de *A622* pGA-A622.

Producción de plantas transgénicas para 35S-A622

25 [0223] El vector binario pGA-A622 se introdujo por electroporación en la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens*. Se transformaron plantas de *A. thaliana* (ecotipo Wassilewskija (WS)) con *A. tumefaciens* mediante un procedimiento de inducción de callo y regeneración de plantas descrito básicamente por Akama y col., Plant Cell Reports 12: 7-11 (1992). Como marcador de selección para la transformación con pGA-A622 se usó la resistencia a kanamicina (50 mg/l en medio de inducción de brotes). A partir del callo se regeneraron plantas transgénicas, que se cultivaron a 23 °C en condiciones de 16 h de luz y 8 h de oscuridad en una cámara climática.

Preparación de la construcción para la sobreexpresión de NBB1 y PMT

[0224] La ORF de *NBB1* (SEQ ID NO: 1B) se transfirió desde el vector pDONR221-NBB1-2 al vector binario de GATEWAY pGWB2 (véase la figura 18A) mediante una reacción LR. El vector de expresión del gen, en el que *NBB1* está unido al promotor CaMV35S, se denominó p35S-NBB1. Véase la figura 18B. De manera similar, la ORF de *PMT* se transfirió desde el vector pDONR221-PMT a pGWB2, mediante una reacción LR. El vector de expresión del gen se denomina p35S-PMT. Véase la figura 18C.

40 *Producción de plantas transgénicas para 35S-A622-35S-NBB1, para 35S-A622-35S-PMT y para 35S-A622-35S-NBB1-35S-PMT*

[0225] Los vectores binarios p35S-NBB1 y p35S-PMT se introdujeron por electroporación en la cepa EHA105 de *A. tumefaciens*. Las plantas de la generación T1 que contenían pGA-A622 se transformaron con *A. tumefaciens* mediante un procedimiento de inmersión floral, básicamente según describen Clough y col., Plant J. 16: 735-43 (1998). Como marcador de selección para la transformación con p35S-NBB1 y p35S-PMT se usó la resistencia a higromicina (25 mg/l en medio de inducción de brotes). Las plantas transgénicas se cultivaron a 23 °C en condiciones de 16 h de luz y 8 h de oscuridad en una cámara climática. Las plantas transgénicas resultantes se identificaron por PCR genómica con los cebadores del promotor 35S y cebadores específicos de los genes *NBB1* y 50 *PMT*.

Cebadores para la identificación de las plantas con 35S-A622-35S-NBB1
 35S-F 5' ACCCTTCCTCTATATAAGGAAG
 NBB1-1140 5' TGAGCCCCAGCTGTTCAAGAACAGC

55 Cebadores para la identificación de las plantas con 35S-A622-35S-PMT
 35S-F 5' ACCCTTCCTCTATATAAGGAAG
 PMT-01R 5' CGCTAAACTCTGAAAACCAGC

60 [0226] Las plantas positivas para 35S-A622-35S-NBB1 y las plantas positivas para 35S-A622-35S-PMT se cruzaron para producir plantas con 35S-A622-35S-NBB1-35S-PMT. La descendencia F1 se analizó por PCR genómica con el par de cebadores específico de cada casete de expresión.

[0227] De las líneas positivas por PCR se extrajeron las proteínas totales. La raíces congeladas se 65 homogeneizaron inmediatamente en tampón de extracción (Tris-HCl 100 mM, pH 6,8, SDS al 4 %, glicerol al 20 %) que contenía fluoruro de fenilmetsulfonilo 1 mM y ditiotreitol 200 mM mediante un mortero y mano. Después de la

centrifugación de los homogeneizados, las proteínas solubles en el sobrenadante se separaron por SDS-PAGE. El análisis de inmunotransferencia se llevó a cabo con suero de ratón dirigido contra A622 para la detección de la proteína A622 y suero de conejo dirigido contra NBB1 para la detección de la proteína NBB1, según se describe en Shoji y col., Plant Mol. Biol. 50: 427-40 (2002). Se obtuvieron líneas transgénicas de expresión que contenían los 5 dos polipéptidos A622 y NBB1. Véase la figura 19.

Procedimiento para el análisis de los niveles de alcaloides

[0228] Se seleccionaron líneas transgénicas que expresaban *NBB1* y *A622* y se usaron para el análisis de 10 alcaloides. Los alcaloides se trajeron de las hojas del tabaco transgénico y se analizaron según se describe anteriormente en el ejemplo 4. Como se muestra en la figura 20, se encontró un nuevo pico correspondiente al tiempo de elución de la nicotina en la línea *NBB1-A622-PMT*, pero no en la línea *A622-PTM*. Esto demuestra que la expresión conjunta de *NBB1* y *A622* es más eficaz que la expresión de solo *A622* para la producción de alcaloides 15 nicotínicos en una planta que normalmente no produce alcaloides.

EJEMPLO DE REFERENCIA 16: expresión de *NBB1* y *A622* en células no vegetales

[0229] El sistema de expresión Bac-to-Bac (Invitrogen) de células de insectos y baculovirus se usó para expresar las proteínas *NBB1* y *A622* con una etiqueta 6x-His en células de insectos. Con el fin de construir el clon de 20 expresión, las ORF de *NBB1* y *A622* (SEQ ID NO: 1B y 3B, respectivamente) se transfirieron desde los vectores DONR respectivos (pDONR-NBB1-2, pDONR-A622) al vector de GATEWAY pDEST10 (Invitrogen) mediante reacciones LR. Los clones de expresión resultantes se denominaron pDEST10-NBB1 y pDEST10-A622.

[0230] pDEST10-NBB1 y pDEST10-A622 se transformaron en células MAX Efficiency DH10Bac (Invitrogen) 25 para recuperar el ADN de los bácmidos recombinantes. Para verificar la presencia de los bácmidos recombinantes con *A622* y *NBB1* se usó un análisis de PCR con un cebador específico de los genes y un cebador inverso de M13. Véase la figura 21A.

[0231] Los bácmidos recombinantes resultantes que contenían las casetes de expresión de los genes 30 respectivos se transfecaron en las células de insectos Sf9 con Cellfectin (Invitrogen). Las células Sf9 se infectaron con los cultivos de virus en dos tandas para amplificar y aumentar la producción de los virus.

[0232] *NBB1* y *A622* se produjeron en los cultivos de las células de insectos, según muestra la inmunotransferencia con los antisueros dirigidos contra *NBB1* y *A622*. Las proteínas recombinantes que contenían la 35 etiqueta de 6x-His se purificaron por adsorción en columnas de Ni-NTA, seguida de elución con imidazol 0,5 M. Véase la figura 21B.

[0233]

40 Cláusulas:

Cláusula 1. Un procedimiento para aumentar la nicotina en una planta de *Nicotiana* que comprende sobreexpresar al menos uno de *A622* y *NBB1* con respecto a una planta de control.

45 Cláusula 2. El procedimiento según la cláusula 1, en el que se sobreexpresa *A622*.

Cláusula 3. El procedimiento según la cláusula 1, en el que se sobreexpresa *NBB1*.

Cláusula 4. El procedimiento según la cláusula 1, en el que se sobreexpresan *A622* y *NBB1*.

50 Cláusula 5. El procedimiento según la cláusula 4, que comprende además sobreexpresar al menos uno de *QPT* y *PMT*.

Cláusula 6. El procedimiento según la cláusula 5, en el que se sobreexpresan *QPT* y *A622*.

55 Cláusula 7. Planta con mayor nicotina producida mediante cualquiera de los procedimientos según las cláusulas 1-5.

Cláusula 8. Producto con mayor nicotina producido a partir de la planta según la cláusula 7.

60 Cláusula 9. Producto según la cláusula 8, en el que dicho producto se selecciona del grupo que consiste en un cigarrillo, un producto farmacéutico y un producto nutracéutico.

Cláusula 10. Procedimiento para producir alcaloides nicotínicos, que comprende expresar *NBB1* y *A622* de manera heteróloga en una planta o célula que de otro modo no producen alcaloides nicotínicos.

65 Cláusula 11. Procedimiento según la cláusula 10, en el que la expresión de *NBB1* y *A622* tiene lugar en una célula

seleccionada del grupo que consiste en una célula bacteriana, de levadura, hongo filamentoso, alga, mamífero e insecto.

Cláusula 12. Planta con mayor cantidad de alcaloides nicotínicos producida mediante el procedimiento según la 5 cláusula 10.

Cláusula 13. Producto alcaloide nicotínico producido mediante el procedimiento según la cláusula 10.

Cláusula 14. Procedimiento para producir un alcaloide nicotínico, que comprende (a) disponer de una pluralidad de 10 células que expresan *A622* y *NBB1* y (b) obtener dicho alcaloide nicotínico de dicha pluralidad.

Cláusula 15. Procedimiento para incrementar la nicotina en una planta, que comprende sobreexpresar *PMT* y *QPT* en relación con una planta de control.

15 Cláusula 16. Planta con mayor nicotina producida mediante el procedimiento de la cláusula 15.

Cláusula 17. Producto con mayor nicotina producido a partir de la planta según la cláusula 15.

Cláusula 18. Procedimiento de producción de la enzima *NBB1*, que comprende transformar una célula con una 20 molécula de ácido nucleico aislada que codifica *NBB1* y crecer la célula transformada en condiciones de manera que se produce la enzima *NBB1*.

Cláusula 19. Procedimiento según la cláusula 18, en el que la célula transformada se selecciona del grupo que 25 consiste en células de bacterias, levadura, hongo filamentoso, alga, plantas verdes y mamíferos.

25 Cláusula 20. Procedimiento para incrementar la nicotina y el rendimiento en una planta de *Nicotiana*, que comprende:

- (a) cruzar una planta de *Nicotiana* con mayor nicotina con una planta de *Nicotiana* con mayor rendimiento; y
- (b) seleccionar la planta progenie con una mayor nicotina y un mayor rendimiento.

30 Cláusula 21. Procedimiento según la cláusula 20, en el que dicha planta con mayor nicotina se produce mediante:

- (a) transformar una planta de *Nicotiana* con una construcción que comprende, en la dirección 5' a 3', un promotor unido operativamente a un ácido nucleico heterólogo que codifica una enzima que incrementa la síntesis de nicotina;

35 (b) regenerar plantas de *Nicotiana* transgénicas a partir de la planta transformada; y

- (c) seleccionar una planta de *Nicotiana* transgénica que tiene un mayor contenido de nicotina en relación con una planta de control.

Cláusula 22. Procedimiento según la cláusula 21, en el que dicho ácido nucleico se selecciona del grupo que 40 consiste en *QPT*, *PMT*, *A622* y *NBB1*.

Cláusula 23. Planta con mayor nicotina y rendimiento producida mediante el procedimiento según la cláusula 20.

Cláusula 24. Procedimiento para incrementar la nicotina y el rendimiento en una planta de *Nicotiana*, que 45 comprende:

- (a) transformar una planta de *Nicotiana* con (i) una primera construcción que comprende, en la dirección 5' a 3', un promotor unido operativamente a un ácido nucleico heterólogo que codifica una enzima que incrementa la síntesis de nicotina; y (ii) una segunda construcción que comprende, en la dirección 5' a 3', un promotor unido operativamente a un ácido nucleico heterólogo que codifica una enzima que incrementa el rendimiento;

50 (b) regenerar plantas de *Nicotiana* transgénicas a partir de la planta transformada; y

- (c) seleccionar una planta de *Nicotiana* transgénica que tiene un mayor contenido de nicotina y un mayor rendimiento en relación con una planta de control.

55 Cláusula 25. Procedimiento según la cláusula 24, en el que dicha primera construcción comprende un ácido nucleico que codifica una enzima selecciona del grupo que consiste en *QPT*, *PMT*, *A622* y *NBB1*.

Cláusula 26. Procedimiento para incrementar la nicotina en *N. tabacum*, que comprende sobreexpresar *PMT* en relación con una planta de control.

60

Listado de secuencias

[0234]

SEQ ID NO: 1

(polinucleótido *NBB1*)

ACGCGGGGAGAAATACATACAACATGTTCCGCTCATATTCTGATCAGCTT
 TTCACTTGCTTCCTTGTCTGAAACTGCTACTGGAGCTGTTACAAATCTTCAG
 CCTGCTTAATCAACCACAATGTCCATAACTCTCTATTACCCCCACAAGTAG
 AAATTACTTAACTTGCTCCACTTCTCCCTCAAAATCTCGCTTGCTGCAC
 CTTTCATGCCGAAACCAACCTCATTATCCTACCAAGCAGTAAGGAGGAGC
 TCGTGAGCACCATTGGTGCAGAAAAGCATCTTATGAAATCAGAGTAAG
 GTGCGGCGGACACAGTTACGAAGGAACCTCTTACGTTCCCTTGACGCTTCT
 CCATTCTGATCGTTGACTTGATGAAATTAGACGACGTTCACTAGATTGG
 ATTCTGAAACAGCTGGGCTCAGGGCGCGCAACAATTGGCAAATTATT
 ATGCCATTGCCAAGGTAAGTGACGTTCATGCATTTCAGCAGGTTGGGACC
 AACAGTAGGATCTGGAGGTCATATTCAAGTGGTGGATTGGACTTTATCT
 AGAAAATTGGACTGCTGCTGATAATGTCGGTATGCTCTTATTGATG
 CTGATGGACGGTTATTAGACCGAAAAGCCATGGGCGAAGACGTGTTGG
 CAATCAGAGGTGGCGCGGTGGAAATTGGGGATTGTTATGCCTGGAAAAA
 TTCGATTACTCAAAGTGCCTAAAATCGTAACAACCTGTATGATCTATAGGCC
 TGGATCCAACAATACGTGGCTCAAATACCTGAGAAATGGCAAATAGTTAC
 TCCAAATTGGTCGATGATTACTCTAGGAGTACTGCTGAGACCTGCAGAT
 CTACCCCGGGATATGAAATATGGTAATACTACTCCTATTGAAATATTCCCC
 AATTCAATGCACATTATTGGGTCCAAAAACTGAAGTTCTTCCATATCGAA
 TGAGACATTCCGGAGCTAGGCGTTAAGAATGATGAGTGAAGGAAATGAC
 TTGGTAGAGTCAGCACTTCTTCCGAATTAGCTGACGTTAACGGGAAC
 TCGACTGGTGATATCTCCCGTCTGAAAGAACGTTACATGGACGGAAAAGGT
 TTTTCAAAGGCAAAACGGACTACGTGAAGAAGCCAGTTCAATGGATGG
 ATGCTAACATTCTTGTGAACTCGAGAAAAACCCGAAGGGATATCTTGTCT
 TTGATCCTTATGGCGGAGCCATGGACAAGATTAGTGTATGATCAAGCTATTGCTT
 CCCTCATAGAAAAGTAACCTTTCGCGATTCACTGAGTACAGTGGAAAT
 GAAGAGGACGATTACATGAGCGACGTTACATGGAGTGGATAAGAGGATT
 TACAATACAATGACGCCCTTGTGTTCAAGCTGCCAAGGGGAGCTTATATCA
 ACTACTGGATATGGATCTGGAGTGAATATGGTCGACGACTACTTATTGCG
 AAATGCTAGTAGCAGTAGTCCTCTTCTGTTGATGCTGTGGAGAGAGCT
 AGAGCGTGGGGTGAGATGTATTCTGCATAACTATGATAGGTTGGTAAA
 GCTAAGACACAAATTGATCCACTAAATGTTTGCACATGAACAGAGTATT
 CTCCTATGCTGGTCAACGCAAGAGCACAAGTATAGCAGTGAATGAGATT
 TAAAATGTACTACCTGAGAGAGATTCCGTTAGTTTCC

SEQ ID NO: 1B

(secuencia ORF de *NBB1* usada para la construcción de vectores)

ATGTTCCGCTCATAATTCTGATCAGCTTCACTGCTTCCTGCTGAAAC
TGCTACTGGAGCTGTTACAAATCTTCAGCCTGCTTAATCAACCACAATGTC
CATAACTTCTCTATTACCCCACAAGTAGAAATTACTTAAC TGCTCCACTT
CTCCCTCAAAATCTCGTTGCTGCACCTTCATGCCGAAACCAACCTTC
ATTATCCTACCAAGCAGTAAGGAGGAGCTCGTGAGCACCATTGGTTGCA
GAAAAGCATCTTATGAAATCAGAGTAAGGTGCGCGGACACAGTTACGAA
GGAACCTTCTTACGTTCCCTTGACGCTCTCCATTGATCGTTGACTTGAT
GAAATTAGACGACGTTCACTAGATTGGATTCTGAAACAGCTGGGGCTCA
GGCGGCGCAACAATTGGCAAATTATTATGCCATTGCCAAGGTAAAGTGA
CGTTCATGCATTTCAGCAGGTTGGGACCAACAGTAGGATCTGGAGGTCA
TATTTCAGGTGGTGGATTGGACTTTATCTAGAAAATTGGACTTGCTGCT
GATAATGTCGTTGATGCTCTTATTGATGCTGATGGACGGTTATTAGACC
GAAAAGCCATGGCGAAGACGTGTTGGCAATCAGAGGTGGCGCGGCGGT
GGAAATTGGGGCATTGTTATGCCCTGAAAATTGATTACTCAAAGTGCCTA
AAATCGTAACAACCTGTATGATCTATAGGCCCTGGATCCAAACAATACGTGG
CTCAAATACTTGAGAAATGGCAAATAGTTACTCCAAATTGGTCGATGATT
TACTCTAGGAGTACTGCTGAGACCTGCAGATCTACCCGCGGATATGAAATA
TGGTAATACTACTCCTATTGAAATATTCCCCAATTCAATGCACTTATTGG
GTCCAAAAACTGAAGTTCTTCCATATCGAATGAGACATTCCGGAGCTAG
GCGTTAAGAATGATGAGT GCAAGGAAATGACTTGGTAGAGTCAGCACTT
TCTTCTCCGAATTAGCTGACGTTAACGGGAACCTCGACTGGTATCTCCCG
TCTGAAAGAACGTTACATGGACGGAAAAGGTTTCAAAAGGCAAAACGGA
CTACGTGAAGAAGCCAGTTCAATGGATGGATGCTAACATTCTGTGGA
ACTCGAGAAAAACCGAAGGGATATCTTGTCTTGATCCTATGGCGGAGC
CATGGACAAGATTAGT GATCAAGCTATTGCTTCCCTCATAGAAAAGGTA
CCTTTCGCGATTCACTAGTACTGACAGTGGAAATGAAGAGGAAGATTACAT
GAGCGACGTTACATGGAGTGGATAAGAGGGATTACAATACAATGACGCC
CTTGTTCAAGCTGCCAAGGGGAGCTTATATCAACTACTTGGATATGGAT
CTTGGAGTGAATATGGTCGACGACTACTTATTGCGAAATGCTAGTAGCAGT
AGTCCTCTCCTCTGTTGATGCTGAGAGAGCTAGAGCGTGGGTGAG
ATGTATTCTGCATAACTATGATAGGTTGGTAAAGCTAACAGACACAAATTG
ATCCACTAAATGTTTCGACATGAACAGAGTATTCCCTCATGCTTGGITC
AACGCAAGAGCACAAGTATAGCAGTGAATGA

SEQ ID NO: 2

(polipéptido NBB1)

MFPLIILISFSLASLSETATGAVTNLSACLINHNVHFSIYPTSRNYFNLHHFSLQN
 LRFAAPFMPKPTFIILPSSKEELVSTIFCCRKASYEIRVRCGGHSYEGTSYVSFDA
 SPFVIVDLMKLDVSVLDSETAWAQGGATIGQIYYAIAKVSDVHAFSAGSGP
 TVGSGGHISGGGFGLLSRKFGLAADNVVDALLIDADGRLLDRKAMGEDFWAI
 RGGGGGNWGIVYAWKIRLLKVPKIVTTCMIYRPGSKQYVAQILEKWQIVTPNL
 VDDFTLGVLLRPADLPADMKYGNTPIEIFPQFNALYLGPKTEVLSISNETPEL
 GVKNDECKEMTWVESALFFSELADVNNGNSTGDISRLKERYMDGKGFFKGKTD
 YVKKPVSMGMLTFLVELEKNPKGYLVFDPYGGAMDKISDQIAFPHRKGNL
 FAIQYLAQWNEEDYMSDVYMEWIRGFYNTMTPVSSSPRGAYINYLDMDLG
 VNMVDDYLLRNASSSSPSSSDAVERARA WGEMYFLHNYDRLVKAKTQIDPL
 NVFRHEQSIPPMGLSTQEHKYSSE

5

SEQ ID NO: 3

(polinucleótido A622)

10

AAAAATCCGATTAAATTCTAGTTCTAGCCCCCTCACCTAACCGAAGCT
 ACTTTTTCTTCCCCTAGGAGTAAAATGGTTGTATCAGAGAAAAGCAAGAT
 CTTAATAATTGGAGGCACAGGCTACATAGGAAAATCTGGTGGAGACAAG
 TGCAAAATCTGGGCATCCAACCTTCGCTCTTATCAGAGAAAGCACACTCAA
 AAACCCCCGAGAAATCAAAACTCATCGACACATTCAAGAGTTATGGGTTAC
 GCTACTTTGGAGATATATCCAATCAAGAGAGCTTACTCAAGGCAATCAA
 GCAAGTTGATGTGGTGAATTCCACTGTCGGAGGACAGCAATTACTGATCA
 AGTGAACATCATCAAAGCAATTAAAGAAGCTGGAAATATCAAGAGATTCT
 TCCTTCAGAATTGGATTGATGTGGATCATGCTCGTCAATTGAACCAGCT
 GCATCACTCTCGCTCTAAAGGTAAAGAATCAGGAGGATGATAGAGGCAGAA
 GGAATTCCATACACATATGTAATCTGCAATTGGTTGCAGATTCTCTTG
 CCAACTGGGGCAGTTAGAGGCCAAAACCCCTCTAGAGACAAAGTTGTCA
 TTTTGGCGATGGAAATCCAAAGCAATATATGTGAAGGAAGAAGACATAG
 CGACATACACTATCGAAGCAGTAGATGATCCACGGACATTGAATAAGACTC
 TTCACATGAGACCACCTGCCAATTCTATCCTCAACGAGATAGTGTCTT
 GTGGGAGGACAAAATTGGGAAGACCCCTCGAGAAGTTATATCTATCAGAGGA
 AGATATTCTCCAGATTGTACAAGAGGGACCTCTGCCATTAGGACTAATTG
 GCCATATGCCATTCAAGTTGTTAATGGAGATTCTGCAAACCTTGAGGTT
 AGCCTCCTACAGGTGTCAGGCCACTGAGCTATATCCAAAAGTGAATACA
 CAACCGTCGACGAGTTCTACAACAAATTGTCTAGTTGTCGATATCAATCT
 GCGGTGACTCTATCAAACATTGTTCTATGAATCTATTGAGTGTAAATTG
 AATAATTTCGCTTCAGTGCTTTGCAACTGAAATGTACTAGCTAGTTGAAAC
 GCTAGCTAAATTCTTACTGTTGTTCTATTTCGTTATTCCA

SEQ ID NO: 3B

(secuencia ORF de A622 usada para la construcción de vectores)

ATGGTTGTATCAGAGAAAAGCAAGATCTAATAATTGGAGGCACAGGCTAC
ATAGGAAAATACTTGGTGGAGACAAGTGCAAAATCTGGGCATCCAACCTTC
GCTCTTATCAGAGAAAAGCACACTCAAAAAACCCCGAGAAATCAAACACTCATC
GACACATTCAAGAGTTATGGGGTTACGCTACTTTGGAGATATATCCAATC
AAGAGAGCTTACTCAAGGCAATCAAGCAAGTTGATGTGGTATTCCACTG
TCGGAGGACAGCAATTACTGATCAAGTGAACATCATCAAAGCAATTAAAG
AAGCTGGAAATATCAAGAGATTCTCCTTCAGAATTGGATTGATGTGGA
TCATGCTCGTCAATTGAACCAGCTGCATCACTCTCGCTCTAAAGGTAAGA
ATCAGGAGGATGATAGAGGCAGAAGGAATTCCATACACATATGTAATCTGC
AATTGGTTGCAGATTCTTCTGCCAACCTGGGGCAGTTAGAGGCCAAA
CCCCTCTAGAGACAAAGTGTCAATTGGCGATGGAAATCCAAAGCAA
TATATGTGAAGGAAGAAGACATAGCGACATACACTATCGAAGCAGTAGATG
ATCCACGGACATTGAATAAGACTCTCACATGAGACCACCTGCCAATATTCT
ATCCTCAACGAGATAGTGCCTTGTGGGAGGACAAAATTGGGAAGACCCT
CGAGAAGTTATCTATCAGAGGAAGATAATTGCCATTGCCATTCAAGAGGG
ACCTCTGCCATTAAGGACTAATTGGCCATATGCCATTCAAGTTGTTAAT
GGAGATTCTGCAAACTTGAGGTTAGCCTACAGGTGTCGAAGCCACT
GAGCTATATCCAAAAGTGAATACACAACCGTCGACGAGTTCTACAACAAA
5 TTTGTCTAG

5

SEQ ID NO: 4

(polipéptido A622)

10

MVVSEKS KILIIGGTGYIGKYLVETSAKSGHPTFALIRESTLKNPEKS KLIDTFKS
YGVTLFGDISNQESLLKAIKQVDVVISTVGGQQFTDQVNIIKAIKEAGNIKRFL
PSEFGFDVDHARAIPEAASLFALKVRIRRMIEAEGIPTYVICNWFADFFLPNLG
QLEAKTPPRDKVVIFGDGNPKAIYVKEEDIATYTIEAVDDPRTLNKTLHMRPPA
NILSFNEIVSLWEDKIGKTLEKLYLSEEDILQIVQEGLPLRTNLAICHSVFVNGD
SANFEVQPPTGVEATELYPKVKYTTVDEFYNKFV

SEQ ID NO: 5

(polinucleótido QPT)

CAAAAAACTATTTCCACAAAATTCAATTCAACAACCCCCCAAAAAAAACC
ATGTTAGAGCTATTCTTCACTGCTACAGTCATCCTATGCAATTACAG
CTCCAAGGTGGTGGTGAATGTCAGCAATGCCACCAAGAATACAAGAG
TGGAGTCATTAGAGGTGAAACCACCGCACACCCAACTTATGATTAAAGG
AAAGTTATGAAACTTGCACCTCTGAAGATGCTGGGAATTAGGAGATGTGA
CTTGTAAAGGCGACAATTCTCTGATATGGAATCCGATGCTCATTTCTAGC
AAAGGAAGACGGGATCATAGCAGGAATTGCACTTGCTGAGATGATATTCGC
GGAAGTTGATCCTTCATTAAAGGTGGAGTGGTATGTAATGATGGCGATAA
AGTTCATAAAGGCTGAAATTGGCAAAGTACAAGGAAACGCTTACAACAT
TGTTATAGCTGAGAGGGTTGTTCTCAATTATGCAAAGAATGAGTGGAAATA
GCTACACTAACTAAGGAAATGGCAGATGCTGCACACCCCTGCTACATCTG
GAGACTAGGAAAATGCTCTGGATTACGTTGGGATAATGGCGGTAA
TTGATCGGTGGGGGAAGAACATCACAGAATGGGCTTATTGATATGGTAATG
ATAAAAGACAATCACATATCTGCTGCTGGAGGTGCGGCAAAGCTCTAAA
TCTGGATCAGTATTGGAGCAAAATAACTCAAATAGGGTTGAGGTT
GAAACCAGGACAATTGAAGAAGTACGTGAGGTTCTAGACTATGCATCTCAA
ACAAAGACTCGTTGACTAGGATAATGCTGGACAATATGGITGTTCCATTAT
CTAACGGAGATATTGATGTATCCATGCTTAAGGAGGCTGTAGAATTGATCA
ATGGGAGGTTGATACGGAGGCTTCAGGAAATGTTACCTGAAACAGTAC
ACAAGATTGGACAAACTGGTGTACCTACATTCTAGTGGTGCCTGACGCA
TTCCGTGAAAGCACCTGACATTCCCTGAAGATCGATAACAGAGCTGCCCTT
GAAGTTGGAAGGCGTACAAAACGAGCATGAGGCCATTACTCTGCTATAG
GGTTGGAGTAAAGCAGCTGAATAAGCTGAAAGGTGCAAATAAGAATCATT
TACTAGTTGTCAAACAAAAGATCCTCACTGTGTAATCAAACAAAAGATG
TAAATTGCTGGAATATCTCAGATGGCTTTCCAACCTTATTGCTTGAGTT
GGTAATTCTTCAATTAGCTTGTTCATGTTCATGGAATTGTTACAATGAA
AATACTGATTATAAGTTGGTGTATGAAAATTCTGTGTTACTCAAATA
TTTGAGATGTT

SEQ ID NO: 5B

(secuencia ORF de QPT usada para la construcción de vectores)

ATGTTAGAGCTATTCCCTTCACTGCTACAGTGCATCCTTATGCAATTACAG
CTCCAAGGTGGTGGTAAAATGTCAGCAATGCCACCAAGAATACAAGAG
TGGAGTCATTAGAGGTGAAACCACCGACACACCCAACTTGATTTAAAGG
AAGTTATGAAACTGCACTCTCTGAAGATGCTGGGAATTAGGAGATGTGA
CTTGTAAAGGCGACAATTCCCTCTGATATGGAATCCGATGCTCATTTCTAGC
AAAGGAAGACGGGATCATAGCAGGAATTGCACTTGCTGAGATGATATTCGC
GGAAGTTGATCCTTCATTAAAGGTGGAGTGGTATGTAATGATGGCGATAA
AGTTCATAAAGGCTGAAATTGGCAAAGTACAAGGAAACGCTTACAACAT
TGTTATAGCTGAGAGGGTTGTTCTCAATTATGCAAAGAATGAGTGGAAATA
GCTACACTAACTAAGGAAATGGCAGATGCTGCACACCCCTGCTTACATCTTG
GAGACTAGGAAAATGCTCCTGGATTACGTTGGGATAAAATGGCGGTTA
TTGATCGGTGGGGGAAGAACATCACAGAATGGCTTATTGATATGGTAATG
ATAAAAAGACAATCACATATCTGCTGCTGGAGGTGTCGGCAAAGCTCTAAAA
TCTGTGGATCAGTATTGGAGCAAATAACTTCAAATAGGGGTTGAGGTT
GAAACCAGGACAATTGAAGAAGTACGTGAGGTTCTAGACTATGCATCTCAA
ACAAAGACTTCGTTGACTAGGATAATGCTGGACAATATGGTTGTTCCATTAT
CTAACGGAGATATTGATGTATCCATGCTTAAGGAGGCTGTAGAATTGATCA
ATGGGAGGTTGATA CGGAGGCTTCAGGAAATGTTACCCCTGAAACAGTAC
ACAAGATTGGACAAACTGGTGTACCTACATTCTAGTGGTGCCTGACGCA
TCCC GTGAAAGCACTTGACATTCCCTGAAGATCGATA CAGAGCTCGCCCTT
GAAGATGGAAGGCGTACAAACGAGCATGA

5

SEQ ID NO: 6

(polipéptido QPT)

10

MFRAIPFTATVHPYAITAPRLVVKMSAIATKNTRVESLEVKKPAHPTYDLKEVM
KLALSEDAGNLGDVTCKATIPLDMESDAHFLAKEDGIAGIALAEMFAEVDPSL
KVEWYVNDGDKVHKGLKFGKVQGNAYNIVIAERVVLNFMQRMSGIATLTKE
MADA AHPAYILETRKTAPGLRLVDKWAVLIGGGKNHRMGLFDMVMIKDNHIS
AAGGVGKALKSVDQYLEQNKLQIGVEVETRTIEEVREVLDYASQTKSLTRIM
LDNMVVPLSNGDIDVSMLEA VELINGRFDEASGNVTLETVHKIGQTGVTYIS
SGALTHSVKALDISLKIDTELALEVGRRTKRA

SEQ ID NO: 7

(polinucleótido PMT - ADNc de longitud completa según se describe en NCBI n° D28506)

5 Hibi y col., Plant Cell (1994)

GGAAAATACAAACCATAATACTTTCTCTTCAATTGTTAGTTAATT
GAAAATGGAAGTCATATCTACCAACACAAATGGCTCTACCATCTCAAGAA
TGGTGCCTTCCATGAACGGCCACCAAAATGGCACTTCTGAACACACTCAA
CGGCTACCAGAAATGGCACTCCAAACACCAAAACGGGCACCAAGAACGGCAC
TTTCGAACATCGGAACGGCCACCAAGAACGGACATCCGAACAACAGAACG
GGACAATCAGCCATGACAATGGCAACGAGCTACTGGGAAGCTCCGACTCTA
TTAACGCTGGCTGGTTTCAGAGTTAGCGCATTATGCCAGGTGAAGCATT
CTCACTTAAGGTTGAGAAGTTACTATTCCAGGGGAAGTCTGATTACCAAGA
TGTCACTGCTTTGAGTCAGCAACTATGGGAAGGTTCTGACTTTGGATGGA
GCAATTCAACATACAGAGAAATGGTGGATTCCATACACTGAAATGATTGTT
CATCTACCACCTGGTCCATCCAAACCCAAAAAAGGTTTGATCATCGGCG
GAGGAATTGGTTTACATTATCGAAATGCTCGTTATCCTCAATCGAAAA
AATTGACATTGAGATCGATGACGTGGTAGTTGATGTATCCAGAAAATT
TTCCCTTATCTGGCAGCTAATTAAACGATCCTCGTGTAAACCTAGTTCTCGG
AGATGGAGCTGCATTGAAAGGCTGCACAAGCGGGATATTATGATGCTAT
TATAGTGGACTCTCTGATCCCATTGGCCAGCAGGAGGAGTTGTATGC
CCATTCTTGAGGCAGTAGCCAAAGGCCCTAGGCCAGGAGGAGTTGTATGC
ACACAGGCTGAAAGCATTGGCTCATATGCATATTATTAAGCAAATCATTG
CTAACTGTCGTCAAGTCTTAAGGGTTCTGTCAGTATGCTCTGCTACTGAAGGG
TCCAACATATCCCACCGGTGTGATCGGTTATATGCTCTGCTACTGAAGGG
CCAGAAGTTGACTTCAAGAATCCAGTAAATCCAATTGACAAAGAGACAAC
CAAGTCAAGTCAAATTAGGACCTCTCAAGTTCTACAACCTGATATTACA
AAGCAGCATTGATTTACCATCTTCGCCAGAAGTATGATCGAGTCTTAATC
AAGTGAATAATGAACACTGGTAGTACAATCATTGGACCAAGATCGAGTCTT
AATCAAGTGAATAAAATAAGTGAATGCGACGTATTGTAGGAGAATTCTGCA
GTAATTATCATAATTCCAATTACAATCATTGAAAATTCTCTGTGGT
GTTCGTACTTAATATAAATTCTGCTGAAGTTGAATCG

SEQ ID NO: 7B

(secuencia ORF de PMT usada para la construcción de vectores)

ATGGAAGTCATATCTACCAACACAAATGGCTCTACCATCTTCAAGAATGGT
 GCCATTCCCATGAACGGCCACCAAAATGGCACTTCTGAACACCTCAACGGC
 TACCAGAATGGCACTTCAAACACCAAAACGGGCACCAGAACATGGCACTTTC
 GAACATCGGAACGGCCACCAGAACATGGACATCCGAACAAACAGAACGGGAC
 AATCAGCCATGACAATGGCAACGAGCTACTGGGAAGCTCGACTCTATTAA
 GCCTGGCTGGTTTCAGAGTTAGCGCATTATGCCAGGTGAAGCATTCTCA
 CTTAAGGTTGAGAAGTTACTATTCCAGGGAAAGTCTGATTACCAAGATGTC
 ATGCTCTTGAGTCAGCAACTTATGGGAAGGTTCTGACTTGGATGGAGCAA
 TTCAACATACAGAGAACGGTGGATTCCATACACTGAAATGATTGTTCATCT
 ACCACTGGTTCATCCAAACCCAAAAAGGTTTGATCATCGCGGAGG
 AATTGGTTTACATTATTCGAAATGCTCGTTATCCTTCAATCGAAAAAAATT
 GACATTGTTGAGATCGATGACGTGGTAGTTGATGTATCCAGAAAATTTC
 CTTATCTGGCAGCTAATTAAACGATCCTCGTGTAAACCTAGTTCTCGGAGA
 TGGAGCTGCATTGTAAGGCTGCACAAGCGGGATTATATGATGCTATTAT
 AGTGGACTCTCTGATCCCATTGGCCAGCAAAAGATTGTTGAGAGGCCA
 TTCTTGAGGCAGTAGCCAAAGCCCTAGGCCAGGAGGAGTTGTATGCACA
 CAGGCTGAAAGCATTTGGCTCATATGCATATTATAAGCAAATCATTGCTA
 ACTGTCGTCAAGTCTTAAGGGTTCTGTCACACTATGCTGGACAACCGCTCC
 AACATATCCCACCGBTGTGATCGTTATATGCTCTGCTCTACTGAAGGGCCA
 GAAGTTGACTTCAAGAACATCCAGTAAATCCAATTGACAAAGAGACAACCAA
 GTCAAGTCCAAATTAGGACCTCTCAAGTCTACAACCTGATATTACAAAG
 CAGCATTCAATTACCATCTTCGCCAGAAGTATGATCGAGTCTAA

5

SEQ ID NO: 8

(polipéptido PMT)

10

MEVISTNTNGSTIFKNGAIPMNGHQNGTSEHNGYQNGTSKHQNGHQNGTFEH
 RNGHQNGTSEQQNGTISHDNGNELLGSSDSIKPGWFSEFSALWPGEAFSLKVEK
 LLFQGKSDYQDVMLFESATYGKVLTLDGAIQHTENGGPYTEMIVHLPLGSIPN
 PKKVLIIIGGGIGFTLFEMLRYPSIEKIDIVEIDDVVVDVSRKFFPYLAANFNDPRV
 TLVLGDGAAFKAAQAGYYDAIIVDSSDPIGPAKDLFERPFFEAVAKALRPGGV
 VCTQAESIWLHMHIKQIIANCRCVKFGSVNYAWTTAPTYPTGVIGYMLCSTEG
 PEVDFKNPVNPIDKETTQVKSKLGPLKFYNSDIHKAAFLPSFARSMIES

LISTADO DE SECUENCIAS

15 [0235]

- <110> 22nd Century Limited, LLC
- <120> Aumento de los niveles de alcaloides nicotínicos
- <130> P33628EP-D1-PCT
- 20 <140> No asignado
- <141> 2006-09-13
- <150> EP06848676.0
- <151> 2006-09-13
- 25 <160> 33
- <170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 1749
 <212> ADN
 5 <213> Nicotiana sp.

<400>	1					
acgcggggag	aaatacatac	aacatgtttc	cgctcataat	tctgatcagc	tttcacttg	60
cttccttgtc	tgaaaactgct	actggagctg	ttacaatct	ttaatcaacc		120
10 acaatgtcca	taacttctct	atttacccca	caagtagaaa	ttacttaac	ttgctccact	180
tctcccttca	aaatcttcgc	tttgctgcac	cttcatgcc	gaaaccaacc	ttcattatcc	240
taccaaggcag	taaggaggag	ctcgtgagca	ccatttttg	ttgcagaaaa	gcatcttatg	300
aatcagagt	aagggtgcggc	ggacacagt	acgaaggaac	ttcttacgtt	tcctttgacg	360
cttctccatt	cgtgatcggt	gacttgatga	aatttagacga	cgttttagta	gatttggatt	420
15 ctgaaacacgc	ttgggcttag	ggcggcgc当地	caattggcca	aatttattat	gccattgcca	480
agtaagtgt	cgttcatgca	ttttcagcag	gttccc当地	aacagttagga	tctggaggc当地	540
atatttcagg	tggtgattt	ggactttat	ctagaaaatt	cggacttgc当地	gctgataatg	600
tcgttgc当地	tcttcttatt	gatgctgatg	gacggttatt	agacgaaaa	gccatggc当地	660
aagacgtgtt	ttgggcaatc	agaggtggc当地	gcggg当地	ttggggc当地	gtttatgc当地	720
20 gggaaaattcg	attactcaa	gtgcctaaa	tcgtaaacaac	ttgtatgatc当地	tataggc当地	780
gatccaaaca	atacgtggct	caaatacttg	agaaaatggca	aatagttact	ccaaatttgg	840
tcgatgatt	tactctagga	gtactgctga	gacctgc当地	tctaccccg当地	gatatgaaat	900
atggtaatac	tactcctatt	gaaatatttc	cccaattcaa	tgcaacttat	ttgggtcc当地	960
aaactgaagt	tctttccata	tcgaatgaga	catttccg当地	gctaggc当地	aagaatgatg	1020
25 agtgcaagga	aatgacttgg	gtagagtca	cactttctt	ctccgaatta	gctgacgtt当地	1080
acgggaactc	gactgggtat	atctccgct	tgaaaagaacg	ttacatggac当地	ggaaaagggt当地	1140
ttttcaaagg	caaaacggac	tacgtgaaga	agccagttt当地	aatggatgg当地	atgctaacat当地	1200
ttcttgc当地	actcgagaaa	aacccgaagg	gatatctgt当地	cttgc当地	tatggc当地	1260
ccatggacaa	gattagtat	caagctattt当地	ctttccctca当地	tagaaaaggt当地	aacctttc当地	1320
30 cgattcagta	tctagcacag	tggaatgaa	aggacgatta当地	catgagc当地	gtttacatgg当地	1380
agtggataag	aggattttac	aatacaatga当地	cgccctt当地	ttcaagctcg当地	ccaagggg当地	1440
cttatatcaa	ctactggat	atggatctt当地	gagtaat当地	ggtcgac当地	tacttattgc当地	1500
gaaatgctag	tagcagtagt	cctcttctt当地	ctgtgatgc当地	tgtggagag当地	gctagagc当地	1560
ggggtgagat	gtatttctt当地	cataactatg当地	ataggtt当地	taaagctaag当地	acacaattt当地	1620
35 accactaaa	tgttttgc当地	catgaacaga当地	gtattccctc当地	tatgctt当地	tcaacgcaag当地	1680
agcacaagta	tagcagtgaa当地	tgagat当地	aatgtactac当地	tttgagag当地	attccgtt当地	1740
	tagtttcc当地					1749

<210> 2
 40 <211> 559
 <212> PRT
 <213> Nicotiana sp.

<400>	2															
45 Met	Phe	Pro	Leu	Ile	Ile	Leu	Ile	Ser	Phe	Ser	Leu	Ala	Ser	Leu	Ser	
1				5			10				15					
Glu	Thr	Ala	Thr	Gly	Ala	Val	Thr	Asn	Leu	Ser	Ala	Cys	Leu	Ile	Asn	
					20		25				30					
50 His	Asn	Val	His	Asn	Phe	Ser	Ile	Tyr	Pro	Thr	Ser	Arg	Asn	Tyr	Phe	
					35		40				45					
Asn	Leu	Leu	His	Phe	Ser	Leu	Gln	Asn	Leu	Arg	Phe	Ala	Ala	Pro	Phe	
					50		55				60					
55 Met	Pro	Lys	Pro	Thr	Phe	Ile	Ile	Leu	Pro	Ser	Ser	Lys	Glu	Glu	Leu	
65					65		70				75			80		
Val	Ser	Thr	Ile	Phe	Cys	Cys	Arg	Lys	Ala	Ser	Tyr	Glu	Ile	Arg	Val	
					85		90				95					
Arg	Cys	Gly	Gly	His	Ser	Tyr	Glu	Gly	Thr	Ser	Tyr	Val	Ser	Phe	Asp	
					100		105				110					
60 Ala	Ser	Pro	Phe	Val	Ile	Val	Asp	Leu	Met	Lys	Leu	Asp	Asp	Val	Ser	
					115		120				125					
Val	Asp	Leu	Asp	Ser	Glu	Thr	Ala	Trp	Ala	Gln	Gly	Gly	Ala	Thr	Ile	
					130		135				140					
65 Gly	Gln	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Ile	Ala	Lys	Val	Ser	Asp	Val	His	Ala	Phe	
75					145		150				155			160		
Ser	Ala	Gly	Ser	Gly	Pro	Thr	Val	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	His	Ile	Ser	Gly
					165		170				175					
Gly	Gly	Phe	Gly	Leu	Leu	Ser	Arg	Lys	Phe	Gly	Leu	Ala	Ala	Asp	Asn	

		180			185			190								
	val	val	Asp	Ala	Leu	Leu	Ile	Asp	Ala	Asp	Gly	Arg	Leu	Leu	Asp	Arg
			195					200					205			
5	Lys	Ala	Met	Gly	Glu	Asp	Val	Phe	Trp	Ala	Ile	Arg	Gly	Gly	Gly	Gly
			210				215				220					
	Gly	Asn	Trp	Gly	Ile	Val	Tyr	Ala	Trp	Lys	Ile	Arg	Leu	Leu	Lys	Val
			225				230				235			240		
	Pro	Lys	Ile	Val	Thr	Thr	Cys	Met	Ile	Tyr	Arg	Pro	Gly	Ser	Lys	Gln
			245				250				255					
10	Tyr	Val	Ala	Gln	Ile	Leu	Glu	Lys	Trp	Gln	Ile	Val	Thr	Pro	Asn	Leu
			260				265				270					
	Val	Asp	Asp	Phe	Thr	Leu	Gly	Val	Leu	Leu	Arg	Pro	Ala	Asp	Leu	Pro
			275				280				285					
15	Ala	Asp	Met	Lys	Tyr	Gly	Asn	Thr	Thr	Pro	Ile	Glu	Ile	Phe	Pro	Gln
			290				295				300					
	Phe	Asn	Ala	Leu	Tyr	Leu	Gly	Pro	Lys	Thr	Glu	Val	Leu	Ser	Ile	Ser
			305				310				315			320		
	Asn	Glu	Thr	Phe	Pro	Glu	Leu	Gly	Val	Lys	Asn	Asp	Glu	Cys	Lys	Glu
			325				330				335					
20	Met	Thr	Trp	Val	Glu	Ser	Ala	Leu	Phe	Phe	Ser	Glu	Leu	Ala	Asp	Val
			340				345				350					
	Asn	Gly	Asn	Ser	Thr	Gly	Asp	Ile	Ser	Arg	Leu	Lys	Glu	Arg	Tyr	Met
			355				360				365					
25	Asp	Gly	Lys	Gly	Phe	Phe	Lys	Gly	Lys	Thr	Asp	Tyr	Val	Lys	Lys	Pr
			370				375				380					
	Val	Ser	Met	Asp	Gly	Met	Leu	Thr	Phe	Leu	Val	Glu	Leu	Glu	Lys	Asn
			385				390				395			400		
	Pro	Lys	Gly	Tyr	Leu	Val	Phe	Asp	Pro	Tyr	Gly	Gly	Ala	Met	Asp	Lys
			405				410				415					
30	Ile	Ser	Asp	Gln	Ala	Ile	Ala	Phe	Pro	His	Arg	Lys	Gly	Asn	Leu	Phe
			420				425				430					
	Ala	Ile	Gln	Tyr	Leu	Ala	Gln	Trp	Asn	Glu	Glu	Asp	Asp	Tyr	Met	Ser
			435				440				445					
35	Asp	Val	Tyr	Met	Glu	Trp	Ile	Arg	Gly	Phe	Tyr	Asn	Thr	Met	Thr	Pro
			450				455				460					
	Phe	Val	Ser	Ser	Ser	Pro	Arg	Gly	Ala	Tyr	Ile	Asn	Tyr	Leu	Asp	Met
			465				470				475			480		
	Asp	Leu	Gly	Val	Asn	Met	Val	Asp	Asp	Tyr	Leu	Leu	Arg	Asn	Ala	Ser
			485				490				495					
40	Ser	Ser	Ser	Pro	Ser	Ser	Ser	Val	Asp	Ala	Val	Glu	Arg	Ala	Arg	Ala
			500				505				510					
	Trp	Gly	Glu	Met	Tyr	Phe	Leu	His	Asn	Tyr	Asp	Arg	Leu	Val	Lys	Ala
			515				520				525					
45	Lys	Thr	Gln	Ile	Asp	Pro	Leu	Asn	Val	Phe	Arg	His	Glu	Gln	Ser	Ile
			530				535				540					
	Pro	Pro	Met	Leu	Gly	Ser	Thr	Gln	Glu	His	Lys	Tyr	Ser	Ser	Glu	
			545				550				555					

<210> 3

<211> 1179

<212> ADN

<213> Nicotiana sp.

<400> 3

55	aaaaatccga	ttaattccct	agtttcttagc	ccctccaccc	taacccgaag	ctactttttt		60
	tcttccctta	ggagtaaaat	ggttgtatca	gagaaaagca	agatcttaat	aattggaggc		120
	acaggctaca	tagaaaata	cttgggtggag	acaagtgc当地	aatctgggca	tccaactttc		180
	gctcttatca	gagaaggcac	actcaaaaac	cccggagaaat	caaaaactcat	cgacacatttc		240
	aagagttatg	gggttacgct	actttttgga	gatatatcca	atcaagagag	cttactcaag		300
60	gcaatcaagc	aagttgatgt	ggtgatttcc	actgtcggag	gacagcaatt	tactgatcaa		360
	gtgaacatca	tcaaagcaat	taaagaagct	ggaatataca	agagatttct	tccttcagaa		420
	tttggatttg	atgtggatca	tgctcgtgca	attgaaccag	ctgcatcact	cttcgctcta		480
	aaggtaagaa	tcaggaggat	gatagaggca	gaagggattc	catacacata	tgtatctgc		540
	aattgggtttg	cagatttctt	ttggcccaa	ttggggcag	tagaggccaa	aaccctccct		600
65	agagacaaag	ttgtcatttt	ttggcgatgg	aatcccaag	caatataatgt	gaagggagaa		660
	gacatagcgaa	catacaact	cgaaggcata	gatgatccac	ggacattgaa	taagactctt		720
	cacatgagac	cacccgcca	tattctatcc	ttcaacgaga	tagtgcctt	gtgggaggac		780
	aaaatttggga	agaccctcga	gaagtttat	ctatcagagg	aagatattct	ccagattgtga		840

caagaggac	ctctgccatt	aaggactaat	ttggccatat	gccattcagt	ttttgttaat	900
ggagattctg	caaacttga	ggttcagcct	cctacaggtg	tcgaagccac	ttagctata	960
ccaaaagtga	aatacacaac	cgtcgacgag	ttctacaaca	aatttgctta	gtttgtcgat	1020
5 atcaatctgc	ggtgactcta	tcaaacttgt	tgtttctatg	aatctattga	gtgttaattgc	1080
aataatttc	gcttcagtgc	ttttgcaact	gaaatgtact	agctagttga	acgctagcta	1140
aattctttac	tgttggtttc	tatTTTcgt	cttattcca			1179
<210>	4					
<211>	310					
10 <212>	PRT					
<213>	Nicotiana sp.					
<400>	4					
15 Met Val Val Ser Glu Lys Ser Lys Ile Leu Ile Ile Gly Gly Thr Gly						
1 Tyr Ile Gly Lys Tyr Leu Val Glu Thr Ser Ala Lys Ser Gly His Pro	5	10	15			
20 Thr Phe Ala Leu Ile Arg Glu Ser Thr Leu Lys Asn Pro Glu Lys Ser	20	25	30			
25 Lys Leu Ile Asp Thr Phe Lys Ser Tyr Gly Val Thr Leu Leu Phe Gly	35	40	45			
30 Asp Ile Ser Asn Gln Glu Ser Leu Leu Lys Ala Ile Lys Gln Val Asp	50	55	60			
35 Val Val Ile Ser Thr Val Gly Gly Gln Gln Phe Thr Asp Gln Val Asn	65	70	75	80		
40 Ile Ile Lys Ala Ile Lys Glu Ala Gly Asn Ile Lys Arg Phe Leu Pro	85	90	95			
45 Ser Glu Phe Gly Phe Asp Val Asp His Ala Arg Ala Ile Glu Pro Ala	100	105	110			
50 Ala Ser Leu Phe Ala Leu Lys Val Arg Ile Arg Arg Met Ile Glu Ala	115	120	125			
55 Glu Gly Ile Pro Tyr Thr Val Ile Cys Asn Trp Phe Ala Asp Phe	130	135	140			
60 60 Phe Leu Pro Asn Leu Gly Gln Leu Glu Ala Lys Thr Pro Pro Arg Asp	145	150	155	160		
65 Lys Val Val Ile Phe Gly Asp Gly Asn Pro Lys Ala Ile Tyr Val Lys	165	170	175			
70 Glu Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Ile Glu Ala Val Asp Asp Pro Arg	180	185	190			
75 75 Thr Leu Asn Lys Thr Leu His Met Arg Pro Pro Ala Asn Ile Leu Ser	195	200	205			
80 Phe Asn Glu Ile Val Ser Leu Trp Glu Asp Lys Ile Gly Lys Thr Leu	210	215	220			
85 Glu Lys Leu Tyr Leu Ser Glu Glu Asp Ile Leu Gln Ile Val Gln Glu	225	230	235	240		
90 Gly Pro Leu Pro Leu Arg Thr Asn Leu Ala Ile Cys His Ser Val Phe	245	250	255			
95 Val Asn Gly Asp Ser Ala Asn Phe Glu Val Gln Pro Pro Thr Gly Val	260	265	270			
100 Glu Ala Thr Glu Leu Tyr Pro Lys Val Lys Tyr Thr Thr Val Asp Glu	275	280	285			
105 Phe Tyr Asn Lys Phe Val	290	295	300			
110 110	305	310				
115 <210>	5					
<211>	1399					
<212>	ADN					
<213>	Nicotiana sp.					
120 <400>	5					
125 caaaaaactat	tttccacaaa	attcatttca	caacccccc	aaaaaaaaac	catgtttaga	60
130 gctattcctt	tcactgctac	agtgcacatct	tatgcaatta	cagctccaag	gttgggtgt	120
135 aaaatgtcag	caatagccac	caagaataca	agagtggagt	cattagaggt	gaaaccacca	180
140 65 gcacacccaa	cttatgattt	aaaggaagt	atgaaacttg	cactctctga	agatgctggg	240
145 aatTTAGGAG	atgtgacttg	taaggcgaca	attcctcttg	atatggaatc	cgatgctcat	300
150 tttctagcaa	aggaagacgg	gatcatagca	ggaattgcac	ttgctgagat	gatattcgcg	360

gaagttgatc	cttcattaaa	ggtggagtg	tatgtaaatg	atggcgataa	agttcataaa	420
ggcttgaat	ttggcaaagt	acaaggaac	gcttacaaca	ttgttatagc	tgagagggtt	480
gttctcaatt	ttatgcaaaag	aatgagtgga	atagctacac	taactaagga	aatggcagat	540
5 gataaatggg	cggtattgat	cggtgggggg	aagaatcaca	gaatgggctt	atttgatatg	600
gtaatgataa	aagacaatca	catactctgt	gctggaggtg	tcggcaaagc	tctaaaatct	660
gtggatcagt	atttggagca	aaataaactt	caaataaggg	ttgaggttga	aaccaggaca	720
attgaagaag	tacgtgaggt	tctagactat	gcatctcaaa	caaagacttc	gttgacttagg	780
ataatgctgg	acaatatggt	tgttccatta	tctaacggag	atattgatgt	atccatgctt	840
10 aaggaggctg	tagaattgat	caatggggagg	tttgatacgg	aggcttcagg	aaatgttacc	900
cttgcaccc	tacacaagat	tggacaaact	ggtgttacct	acatttcttag	tgggccctg	960
acgcattccg	tgaaagcact	tgacatttcc	ctgaagatcg	atacagagct	cggccctgaa	1020
gttggaaaggc	gtacaaaacg	agcatgagcg	ccattacttc	tgctataggg	ttggagtaaa	1080
15 acagactgaa	tagctgaaag	gtgcaaataa	gaatcatttt	actagttgtc	aaacaaaaga	1140
tccttcactg	tgtatcaaa	aaaaagatg	taaattgctg	gaatatctca	gatggctctt	1200
ttccaacacctt	attgctttag	ttggtaattt	cattatagct	ttgtttcat	gttcatggaa	1260
atttgttaca	atgaaaatac	ttgatttata	agttgggtgt	atgtaaaattt	ctgtgttact	1320
tcaaataattt	tgagatgtt					1380
						1399

20 <210> 6
 <211> 351
 <212> PRT
 <213> Nicotiana sp.

25 <400> 6

Met	Phe	Arg	Ala	Ile	Pro	Phe	Thr	Ala	Thr	Val	His	Pro	Tyr	Ala	Ile	
1				5				10						15		
Thr	Ala	Pro	Arg	Leu	Val	Val	Lys	Met	Ser	Ala	Ile	Ala	Thr	Lys	Asn	
30				20			25						30			
Thr	Arg	Val	Glu	Ser	Leu	Glu	Val	Lys	Pro	Pro	Ala	His	Pro	Thr	Tyr	
							35	40				45				
Asp	Leu	Lys	Glu	Val	Met	Lys	Leu	Ala	Leu	Ser	Glu	Asp	Ala	Gly	Asn	
					50		55			60						
35	Leu	Gly	Asp	Val	Thr	Cys	Lys	Ala	Thr	Ile	Pro	Leu	Asp	Met	Glu	Ser
							65	70		75				80		
Asp	Ala	His	Phe	Leu	Ala	Lys	Glu	Asp	Gly	Ile	Ile	Ala	Gly	Ile	Ala	
							85	90		95						
40	Leu	Ala	Glu	Met	Ile	Phe	Ala	Glu	Val	Asp	Pro	Ser	Leu	Lys	Val	Glu
					100			105					110			
Trp	Tyr	Val	Asn	Asp	Gly	Asp	Lys	Val	His	Lys	Gly	Leu	Lys	Phe	Gly	
							115	120		125						
Lys	Val	Gln	Gly	Asn	Ala	Tyr	Asn	Ile	Val	Ile	Ala	Glu	Arg	Val	Val	
							130	135		140						
45	Leu	Asn	Phe	Met	Gln	Arg	Met	Ser	Gly	Ile	Ala	Thr	Leu	Thr	Lys	Glu
							145	150		155				160		
Met	Ala	Asp	Ala	Ala	His	Pro	Ala	Tyr	Ile	Leu	Glu	Thr	Arg	Lys	Thr	
							165		170				175			
50	Ala	Pro	Gly	Leu	Arg	Leu	Val	Asp	Lys	Trp	Ala	Val	Leu	Ile	Gly	Gly
							180		185				190			
Gly	Lys	Asn	His	Arg	Met	Gly	Leu	Phe	Asp	Met	Val	Met	Ile	Lys	Asp	
							195	200		205						
Asn	His	Ile	Ser	Ala	Ala	Gly	Gly	Val	Gly	Lys	Ala	Leu	Lys	Ser	Val	
							210	215		220						
55	Asp	Gln	Tyr	Leu	Glu	Gln	Asn	Lys	Leu	Gln	Ile	Gly	Val	Glu	Val	Glu
							225	230		235				240		
Thr	Arg	Thr	Ile	Glu	Glu	Val	Arg	Glu	Val	Leu	Asp	Tyr	Ala	Ser	Gln	
							245		250				255			
60	Thr	Lys	Thr	Ser	Leu	Thr	Arg	Ile	Met	Leu	Asp	Asn	Met	Val	Val	Pro
							260		265				270			
Leu	Ser	Asn	Gly	Asp	Ile	Asp	Val	Ser	Met	Leu	Lys	Glu	Ala	Val	Glu	
							275		280				285			
Leu	Ile	Asn	Gly	Arg	Phe	Asp	Thr	Glu	Ala	Ser	Gly	Asn	Val	Thr	Leu	
							290	295		300						
65	Glu	Thr	Val	His	Lys	Ile	Gly	Gln	Thr	Gly	Val	Thr	Tyr	Ile	Ser	Ser
							305	310		315				320		
Gly	Ala	Leu	Thr	His	Ser	Val	Lys	Ala	Leu	Asp	Ile	Ser	Leu	Lys	Ile	

Asp Thr Glu Leu Ala Leu Glu Val Gly Arg Arg Thr Lys Arg Ala	325 340	330 345	335 350
---	------------	------------	------------

5 <210> 7
<211> 1386
<212> ADN
<213> Nicotiana sp.

10 <400> 7
ggaaaataca aaccataata ctttctcttc ttcaatttgt ttagtttaat tttgaaaatg 60
gaagtcatat ctaccaacac aaatggctt accatctca agaatgggc cattccatg 120
aacggccacc aaaatggcac ttctgaacac ctcaacggct accagaatgg cacttccaaa 180
caccaaaacg ggcaccagaa tggcacttgc gaacatcgga acggccacca gaatgggaca 240
15 tccgaacaac agaacgggac aatcagccat gacaatggca acgagctact gggaaagctcc 300
gactctatta agcctggctg gtttcagag tttagcgcattatggccagg tgaagcattc 360
tcacttaagg ttgagaagtt actattccag gggaaagtctg attaccaaga tgtcatgctc 420
tttgagtcag caacttatgg gaagggttctg actttggatg gagcaattca acatacagag 480
aatggtggat ttccatCACAC tgaaatgatt gttcatctac cacttggttc catcccaaac 540
20 ccaaaaaagg ttttgcatcat cggcggagga attggttta cattattcga aatgcttcgt 600
tattccttcaa tcgaaaaaat tgacattgtt gagatcgatg acgtggtagt ttagtgcattc 660
agaaaaatttt tcccttatct ggcagctaattttaacgatc ctcgtgtAAC cctagttctc 720
ggagatggag ctgcatttgtt aaggcgtcga caagcggat attatgatgc tattatagtg 780
gactcttcgt atccatttttgc tccagcaaaa gattgtttt agaggccatt ctttggggca 840
25 gtagccaaag cccttaggcc aggaggagtt gtatgcacac aggctgaaag catttggctt 900
catatgcata ttattaaagca aatcattgtt aactgtcgatc aagtctttaa gggttctgtc 960
aactatgctt ggacaaccgc tccaacatcccacccgggtg tgatcggtta tatgctctgc 1020
tctactgaag gcccagaagt tgacttcaag aatccagtaa atccaatttga caaagagaca 1080
actcaagtca agtccaaatttggaccttc aagttctaca actctgatata tcacaaagca 1140
30 gcattcattt taccatcttt cgccagaagt atgatcgatg cttaatcaag tgaataatga 1200
acactggtag tacaatcatttggaccaagat cgagtcttaa tcaagtgaat aaataagtga 1260
aatgcgacgt attgttaggag aattctcgatc taattatcat aatttccat tccacaatcat 1320
tgtaaaattt tttctctgtt gtgtttcgta ctttaatata aattttccctg ctgaagttt 1380
gaatcg 1386

35 <210> 8
<211> 375
<212> PRT
<213> Nicotiana sp.

40 <400> 8

Met Glu Val Ile Ser Thr Asn Thr Asn Gly Ser Thr Ile Phe Lys Asn
1 5 10 15
45 Gly Ala Ile Pro Met Asn Gly His Gln Asn Gly Thr Ser Glu His Leu
20 25 30
Asn Gly Tyr Gln Asn Gly Thr Ser Lys His Gln Asn Gly His Gln Asn
35 40 45
Gly Thr Phe Glu His Arg Asn Gly His Gln Asn Gly Thr Ser Glu Gln
50 55 60
55 Gln Asn Gly Thr Ile Ser His Asp Asn Gly Asn Glu Leu Leu Gly Ser
65 70 75 80
Ser Asp Ser Ile Lys Pro Gly Trp Phe Ser Glu Phe Ser Ala Leu Trp
85 90 95
Lys Ser Asp Tyr Gln Asp Val Met Leu Phe Glu Ser Ala Thr Tyr Gly
100 105 110
115 120 125
60 Lys Val Leu Thr Leu Asp Gly Ala Ile Gln His Thr Glu Asn Gly Gly
130 135 140
Phe Pro Tyr Thr Glu Met Ile Val His Leu Pro Leu Gly Ser Ile Pro
145 150 155 160
Asn Pro Lys Lys Val Leu Ile Ile Gly Gly Ile Gly Phe Thr Leu
165 170 175
65 Phe Glu Met Leu Arg Tyr Pro Ser Ile Glu Lys Ile Asp Ile Val Glu
180 185 190
Ile Asp Asp Val Val Val Asp Val Ser Arg Lys Phe Phe Pro Tyr Leu

25 <210> 9
<211> 1680
<212> ADN
<213> *Nicotiana* sp.

30	<400>	9	atgtttccgc	tcataattct	gatcagctt	tcacttgctt	ccttgtctga	aactgctact	60
	ggagctgtta	caaattttc	agccgttta	atcaaccaca	atgtccataa	cttctctatt			120
	taccccacaa	gtagaaaatta	ctttaacttg	ctccacttct	cccttcaaaa	tcttcgcctt			180
35	gctgcacatt	tcatgccgaa	accaacccctc	attatcctac	caaggcgttta	ggaggagctc			240
	gtgagcacca	ttttttgttgc	cagaaaagca	tcttatgaaa	tcaaggttaa	gtgcggcgga			300
	cacagttacg	aaggaaacttc	ttacgtttcc	tttgacgctt	ctccattcgt	gatcgttgc			360
	ttgatgaaat	tagacgacgt	ttcagtagat	ttggattctg	aaacagcttgc	ggctcagggc			420
	ggcgcaccaa	ttggccaaat	ttattatgcc	attgccaagg	taagtgcgt	tcatgcattt			480
	tcagcagggt	cgggaccaac	agttaggatct	ggaggtcata	tttcaggtgg	tggatttgg			540
40	cttttatcta	aaaaatttcgg	acttgctgt	gataatgtcg	ttgatgctct	tcttatttgc			600
	gctgtatggac	ggtttattaga	ccggaaaagcc	atggggcgaag	acgtgttttg	ggcaatcaga			660
	ggtggcggcg	gtggaaaattg	gggcattgtt	tatgccttgg	aaattcgtatt	actcaaagtgc			720
	cctaaaatcg	taacaacttg	tatgtatctat	aggcctggat	ccaaacaata	cgtggctcaa			780
	atacttgaga	aatggcaat	agttactccat	aatttggtcg	atgattttac	tcttaggagta			840
45	ctgctgagac	ctgcagatct	accgcggat	atgaaatatg	gtaataactac	tcctatttgc			900
	atatttcccc	aattcaatgc	acttttatttgc	ggtccaaaaaa	ctgaagttct	ttccatatcg			960
	aatgagacat	ttcccgagct	aggcgtaaag	aatgatgagt	gcaaggaaat	gacttgggt			1020
	gagtcagcac	ttttcttctc	cgaatttagct	gacgttaacg	ggaactcgcac	tggtgatatc			1080
	tcccgcttgc	aagaacgtt	catggacggat	aaaggttttt	tcaaaggcga	aacggactac			1140
50	gtgaagaagc	cagtttcaat	ggatggggat	ctaacatttgc	tttggttgc	cgagaaaaac			1200
	ccgaaggggat	atcttgcctt	tgatccctt	ggcggagcc	tggttttttt	tttttttttt			1260
	gctattgtctt	tccctcatag	aaaaggtaac	cttttgcgtt	ttcagttatct	tttttttttt			1320
	aatgaagagg	acgattacat	gagcgacgtt	tacatggagt	ggataagagg	tttttttttt			1380
	acaatgacgc	cctttgttgc	aagctcgccat	aggggagctt	atataactat	tttttttttt			1440
55	gatcttggag	tgaatatggt	cgacgactac	ttattgcgaa	atgtctgttt	cgtgtttttt			1500
	tcttcctctg	ttgatgttgt	ggagagagct	agagcgtggg	gtgagatgtt	tttttttttt			1560
	aactatgata	ggttgggttaa	agctaagaca	caaattgtatc	cactaaatgt	tttttttttt			1620
	qaacaqagta	ttccctccat	qcttqgttca	acqcaaqagc	acaqatataq	cagtqaatq			1680

60 <210> 10
<211> 933
<212> ADN
<213> Nicotiana sp.

65 <400> 10
atgggttat cagagaaaaag caagatctta ataattggag gcacaggcata catagaaaaaa
tacttqgtqq aqacaagtqc aaaaatctqqq catccaaactt tcgctcttat caqaaaaaqc

	acactcaaaa	accccgagaa	atcaaaaactc	atcgacacat	tcaagagttt	tggggttacg	180
	ctacttttg	gagatatatc	caatcaagag	agcttactca	aggcaatcaa	gcaagttgat	240
	gtggtgattt	ccactgtcgg	aggacagcaa	tttactgatc	aagtgaacat	catcaaagca	300
	attaaagaag	ctggaaatat	caagagattt	cttccttcag	aatttggatt	tgatgtggat	360
5	catgctcggt	caatttgaacc	agctgcatac	ctcttcgtct	taaaggttaag	aatcaggagg	420
	atgatagagg	cagaaggaat	tccatacaca	tatgtaatct	gcaattggtt	tgcagatttc	480
	ttcttgccca	acttggggca	gttagaggcc	aaaacccctc	ctagagacaa	agttgtcatt	540
	tttggcgatg	gaaatcccaa	agcaatata	gtgaaggaag	aagacatagc	gacatacact	600
10	atcgaagcag	tagatgatcc	acggacattt	aataagactc	ttcacatgag	accacctgcc	660
	aatattctat	ccttcaacga	gatagtgtcc	tttgtggagg	acaaaattgg	gaagaccctc	720
	gagaagttat	atctatcaga	ggaagatatt	ctccagattt	tacaagaggg	acctctgcca	780
	ttaaggacta	atttggccat	atgccattca	gttttgtta	atggagattc	tgcaaacttt	840
	gaggttcagc	ctcctacagg	tgtcgaagcc	actgagctat	atccaaaagt	gaaatacaca	900
	accgtcagc	agttctacaa	caaatttgc	tag			933
15	<210>	11					
	<211>	1056					
	<212>	ADN					
	<213>	Nicotiana sp.					
20	<400>	11					
	atgttttagag	ctattccctt	cactgctaca	gtgcattcctt	atgcatttac	agctccaagg	60
	ttgggtgtga	aaatgtcagc	aatagccacc	aagaatacaa	gagtggagtc	attagaggtg	120
	aaaccaccag	cacacccaaac	ttatgatttt	aaggaaagttt	tgaaaacttgc	actctctgaa	180
25	gatgctggga	atttaggaga	tgtgacttgt	aaggcgacaa	ttccctcttga	tatggaatcc	240
	gatgctcatt	ttctagcaaa	ggaagacggg	atcatagcag	gaattgcact	tgctgagatg	300
	atattcgcgg	aagttgatcc	ttcattaaag	gtggagtggt	atgtaaatga	tggcgataaa	360
	gttcataaaag	gcttggaaattt	tggcaaaagta	caaggaaacg	tttacaacat	tgttatacg	420
30	gagaggggtt	ttctcaattt	tatgcaaaaga	atgagtggaa	tagctacact	aactaaggaa	480
	atggcagatg	ctgcacacccc	tgcttacatc	ttggagacta	ggaaaactgc	tcctggatta	540
	cgtttgggtgg	ataaaatgggc	ggtatttgatc	ggtggggggga	agaatcacag	aatgggctt	600
	tttgatatgg	taatgataaa	agacaatcac	atatctgtt	ctggagggtt	cggcaaagct	660
	ctaaaatctg	tggatcgtt	tttggagcaa	aataaaacttc	aaatagggtt	ttaggttggaa	720
35	accaggacaa	ttgaagaagt	acgtgaggtt	ctagactatg	catctcaaac	aaagacttcg	780
	ttgacttagga	taatgcttga	caatatggtt	gttccattat	ctaacggaga	tattgtatgt	840
	tccatgctt	aggaggctgt	agaatttgatc	aatgggaggt	ttgatacgg	ggcttcagga	900
	aatgttaccc	ttgaaacagt	acacaagatt	ggacaaactg	gtgttaccta	catttctagt	960
	ggtgccctga	cgcattccgt	gaaagcactt	gacatttccc	tgaagatcga	tacagagctc	1020
	gcccttgaag	atgaaaggcg	tacaaaacga	gcatga			1056
40	<210>	12					
	<211>	1128					
	<212>	ADN					
	<213>	Nicotiana sp.					
45	<400>	12					
	atggaagtca	tatctaccaa	cacaaatggc	tctaccatct	tcaagaatgg	tgccatttccc	60
	atgaacggcc	acccaaatgg	cacttctgaa	caccccaacg	gctaccagaa	tggcacttcc	120
	aaacacccaa	acgggcacca	gaatggcact	ttcgaacatc	ggaacggcca	ccagaatggg	180
50	acatccgaac	aacagaacgg	gacaatcagc	catgacaatg	gcaacgagct	actgggaagc	240
	tccgactcta	ttaaggctgg	ctgggtttca	gagtttagcg	cattatggcc	aggtgaagca	300
	ttctcactta	aggttgagaa	tttactattt	caggggaaat	ctgatttacca	agatgtcatg	360
	ctctttgagt	cagcaacttta	tgggaaggtt	ctgactttgg	atggagcaat	tcaacatata	420
	gagaatgggt	gattttccata	cactgaaatg	attgttcatc	taccacttgg	ttccatccca	480
55	aacccaaaaaa	aggtttgtat	catcgccgga	ggaattgggtt	ttacattatt	cgaaatgctt	540
	cgttatcctt	caatcgaaaa	aatttgacatt	gttgagatcg	atgacgttgt	agtgtatgt	600
	tccagaaaaat	ttttccctta	tctggcagct	aattttaaacg	atccctgtgt	aaccctagtt	660
	ctcggagatg	gagctgcatt	tgtaaaggct	gcacaagccg	gatattatga	tgctattata	720
	gtggactctt	ctgatccat	tggtccagca	aaagattttgt	ttgagaggcc	attctttgag	780
60	gcagtagccaa	aaggcccttag	gccaggagga	gttgtatgc	cacaggctga	aagcatttgg	840
	cttcatatatgc	atattattaa	gcaaatcatt	gtcaactgtc	gtcaagtctt	taagggttct	900
	gtcaactatgt	cttggacaac	cgctccaaca	tatcccacgg	gtgtgatcgg	ttatgtctc	960
	tgtctactgt	aaggcccaga	agttgacttc	aagaatccag	taaatccat	tgacaaaagag	1020
	acaactcaag	tcaagtccaa	attaggacat	ctcaagttct	acaactctga	tattcacaaa	1080
65	gcagcattca	ttttaccatc	tttcgcccaga	agtatgtatc	agtcttaa		1128
	<210>	13					

<211> 538
<212> PRT
<213> Eschscholzia californica

5 <400> 13

Met Glu Asn Lys Thr Pro Ile Phe Phe Ser Leu Ser Ile Phe Leu Ser
1 5 10 15

10

Leu Leu Asn Cys Ala Leu Gly Gly Asn Asp Leu Leu Ser Cys Leu Thr
20 25 30

15

Phe Asn Gly Val Arg Asn His Thr Val Phe Ser Ala Asp Ser Asp Ser
35 40 45

20

Asp Phe Asn Arg Phe Leu His Leu Ser Ile Gln Asn Pro Leu Phe Gln
50 55 60

25

Asn Ser Leu Ile Ser Lys Pro Ser Ala Ile Ile Leu Pro Gly Ser Lys
65 70 75 80

30

Glu Glu Leu Ser Asn Thr Ile Arg Cys Ile Arg Lys Gly Ser Trp Thr
85 90 95

35

Ile Arg Leu Arg Ser Gly Gly His Ser Tyr Glu Gly Leu Ser Tyr Thr
100 105 110

40

Ser Asp Thr Pro Phe Ile Leu Ile Asp Leu Met Asn Leu Asn Arg Val
115 120 125

45

Ser Ile Asp Leu Glu Ser Glu Thr Ala Trp Val Glu Ser Gly Ser Thr
130 135 140

50

Leu Gly Glu Leu Tyr Tyr Ala Ile Thr Glu Ser Ser Ser Lys Leu Gly
145 150 155 160

55

60

65

ES 2 748 823 T3

Phe Thr Ala Gly Trp Cys Pro Thr Val Gly Thr Gly Gly His Ile Ser
 165 170 175

Gly Gly Gly Phe Gly Met Met Ser Arg Lys Tyr Gly Leu Ala Ala Asp
 5 180 185 190

Asn Val Val Asp Ala Ile Leu Ile Asp Ala Asn Gly Ala Ile Leu Asp
 10 195 200 205

Arg Gln Ala Met Gly Glu Asp Val Phe Trp Ala Ile Arg Gly Gly Gly
 210 215 220

Gly Gly Val Trp Gly Ala Ile Tyr Ala Trp Lys Ile Lys Leu Leu Pro
 15 225 230 235 240

Val Pro Glu Lys Val Thr Val Phe Arg Val Thr Lys Asn Val Ala Ile
 20 245 250 255

Asp Glu Ala Thr Ser Leu Leu His Lys Trp Gln Phe Val Ala Glu Glu
 260 265 270

Leu Glu Glu Asp Phe Thr Leu Ser Val Leu Gly Gly Ala Asp Glu Lys
 25 275 280 285

Gln Val Trp Leu Thr Met Leu Gly Phe His Phe Gly Leu Lys Thr Val
 30 290 295 300

Ala Lys Ser Thr Phe Asp Leu Leu Phe Pro Glu Leu Gly Leu Val Glu
 35 305 310 315 320

Glu Asp Tyr Leu Glu Met Ser Trp Gly Glu Ser Phe Ala Tyr Leu Ala
 325 330 335

Gly Leu Glu Thr Val Ser Gln Leu Asn Asn Arg Phe Leu Lys Phe Asp
 40 340 345 350

Glu Arg Ala Phe Lys Thr Lys Val Asp Leu Thr Lys Glu Pro Leu Pro
 45 355 360 365

Ser Lys Ala Phe Tyr Gly Leu Leu Glu Arg Leu Ser Lys Glu Pro Asn
 50 370 375 380

Gly Phe Ile Ala Leu Asn Gly Phe Gly Gly Gln Met Ser Lys Ile Ser
 55 385 390 395 400

Ser Asp Phe Thr Pro Phe Pro His Arg Ser Gly Thr Arg Leu Met Val
 405 410 415

60

Glu Tyr Ile Val Ala Trp Asn Gln Ser Glu Gln Lys Lys Lys Thr Glu
 420 425 430

5

Phe Leu Asp Trp Leu Glu Lys Val Tyr Glu Phe Met Lys Pro Phe Val
 435 440 445

10

Ser Lys Asn Pro Arg Leu Gly Tyr Val Asn His Ile Asp Leu Asp Leu
 450 455 460

15

Gly Gly Ile Asp Trp Gly Asn Lys Thr Val Val Asn Asn Ala Ile Glu
 465 470 475 480

20

Ile Ser Arg Ser Trp Gly Glu Ser Tyr Phe Leu Ser Asn Tyr Glu Arg
 485 490 495

25

Leu Ile Arg Ala Lys Thr Leu Ile Asp Pro Asn Asn Val Phe Asn His
 500 505 510

30

Pro Gln Ser Ile Pro Pro Met Ala Asn Phe Asp Tyr Leu Glu Lys Thr
 515 520 525

35

Leu Gly Ser Asp Gly Gly Glu Val Val Ile
 530 535

40

<210> 14
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> Cebador sintético

<400> 14
 50 ggaaaactaa caacgaaatc tct 23

55

<210> 15
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador sintético

60

<400> 15
 gatcaagcta ttgctttccc t 21

65

<210> 16
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>		
<223>	Cebador sintético	
<400>	16	
5	aaaaagcagg ctcaccatgt ttccgctcat aattctg	37
<210>	17	
<211>	34	
<212>	ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
<220>		
<223>	Cebador sintético	
15	<400> 17	
	agaaagctgg gttcattcac tgctatactt gtgc	34
<210>	18	
<211>	29	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
<220>		
<223>	Cebador sintético	
25	<400> 18	
	ggggacaagt ttgtacaaaa aaggcaggct	29
<210>	19	
30	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
<220>		
35	<223> Cebador sintético	
<400>	19	
	ggggaccact ttgtacaaga aagctgggt	29
40	<210> 20	
	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Cebador sintético	
<400>	20	
	aaagcttggaa aacatattca atacattgtatg	31
50	<210> 21	
	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> Cebador sintético	
<400>	21	
60	tcttagattct actactatTT tataagtgt	28
<210>	22	
<211>	51	
<212>	ADN	
65	<213> Secuencia artificial	
<220>		
<223>	Cebador sintético	

<400> 22		
aaaaagcagg cttcaagga gatagaacca tgggtgtatc agagaaaagc a		51
5 <210> 23		
<211> 41		
<212> ADN		
<213> Secuencia artificial		
10 <220>		
<223> Cebador sintético		
<400> 23		
agaaaagctgg gtccttagaca aatttgttgt agaactcgac g		41
15 <210> 24		
<211> 29		
<212> ADN		
<213> Secuencia artificial		
20 <220>		
<223> Cebador sintético		
<400> 24		
25 aaaagcttag atctctctta tgtttcatg		29
<210> 25		
<211> 35		
<212> ADN		
30 <213> Secuencia artificial		
<220>		
<223> Cebador sintético		
35 <400> 25		
tcttagattta ctccttagggg aagaaaaaaaaaa gtagc		35
<210> 26		
<211> 31		
40 <212> ADN		
<213> Secuencia artificial		
<220>		
<223> Cebador sintético		
45 <400> 26		
aaaaagcagg ctcaaaaatg gaagtcatat c		31
<210> 27		
50 <211> 32		
<212> ADN		
<213> Secuencia artificial		
<220>		
55 <223> Cebador sintético		
<400> 27		
agaaaagctgg gttaagact cgatcatact tc		32
60 <210> 28		
<211> 21		
<212> ADN		
<213> Secuencia artificial		
65 <220>		
<223> Cebador sintético		
<400> 28		

caccatgttt agagcttattc c	21
<210> 29	
<211> 20	
5 <212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Cebador sintético	
10 <400> 29	
tcatgctcgt tttgtacgcc	20
<210> 30	
15 <211> 22	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
20 <223> Cebador sintético	
<400> 30	
acccttcctc tatataagga ag	22
25 <210> 31	
<211> 24	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
30 <220>	
<223> Cebador sintético	
<400> 31	
tgagcccaag ctgtttcaga atcc	24
35 <210> 32	
<211> 22	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
40 <220>	
<223> Cebador sintético	
<400> 32	
45 acccttcctc tatataagga ag	22
<210> 33	
<211> 21	
<212> ADN	
50 <213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Cebador sintético	
55 <400> 33	
cgctaaactc tgaaaaccag c	21

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para incrementar la nicotina en una planta de *Nicotiana*, que comprende sobreexpresar el gen de A622 y el gen de NBB1 en relación con una planta de control de *Nicotiana* no transformada, en el que el gen de A622 comprende la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 3, o codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; y el gen de NBB1 comprende la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1 o codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.
2. Procedimiento, según la reivindicación 1, que comprende además sobreexpresar al menos uno de los genes de QPT y PMT, en el que el gen de QPT comprende la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 5, o codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; y el gen de PMT comprende la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 7 o codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8.
3. Planta de *Nicotiana* con mayor cantidad de nicotina que sobreexpresa el gen de A622 y el gen de NBB1 en relación con una planta de control de *Nicotiana* no transformada, en la que el gen de A622 comprende la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 3, o codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; y el gen de NBB1 comprende la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1 o codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.
4. Procedimiento para incrementar la nicotina en una planta de *Nicotiana*, que comprende:
 - (a) transformar una planta de *Nicotiana* con una construcción que comprende, en la dirección 5' a 3', (i) un primer promotor unido operativamente a un ácido nucleico heterólogo que codifica una enzima que incrementa la síntesis de nicotina; en el que el ácido nucleico es el gen de A622 y se sobreexpresa el gen de A622, y (ii) un segundo promotor unido operativamente a un ácido nucleico heterólogo que codifica una enzima que incrementa la síntesis de nicotina; en el que el ácido nucleico es el gen de NBB1 y se sobreexpresa el gen de NBB1;
 - (b) regenerar plantas de *Nicotiana* transgénicas a partir de la planta transformada; y
 - (c) seleccionar una planta de *Nicotiana* transgénica que tiene un mayor contenido de nicotina en relación con una planta de control de *Nicotiana* no transformada;
 en el que el gen de A622 comprende la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 3, o codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; y el gen de NBB1 comprende la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1 o codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.
5. Procedimiento, según la reivindicación 4, que incrementa además el rendimiento en una planta de *Nicotiana*, comprendiendo dicho procedimiento además transformar dicha planta de *Nicotiana* con: una segunda construcción que comprende, en la dirección 5' a 3', un promotor unido operativamente a un ácido nucleico heterólogo que codifica una enzima que incrementa el rendimiento;
 - en el que dicha planta de *Nicotiana* transgénica también se selecciona basándose en el mayor rendimiento en relación con una planta de control de *Nicotiana* no transformada;
 - en el que dicha construcción, tal como se define en la reivindicación 4, puede comprender también un gen de QPT y/o PMT en la dirección 5' a 3'; y
 - en el que el gen de A622 comprende la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 3, o codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; el gen de NBB1 comprende la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1 o codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; el gen de QPT comprende la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 5, o codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; y el gen de PMT comprende la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 7 o codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8.
6. Procedimiento, según la reivindicación 4 o 5, que comprende además (d) sobreexpresar al menos uno de los genes de QPT y PMT, en el que el gen de QPT comprende la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 5, o codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; y el gen de PMT comprende la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 7 o codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8.
7. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, que comprende además la etapa de producir un producto con mayor nicotina a partir de dicha planta o célula, en el que el producto tiene un aumento de dos veces o más de nicotina en relación con un producto producido a partir de una planta no transformada de control, y en el que el producto tiene mayores niveles de A622 y mayores niveles de NBB1.
8. Planta de *Nicotiana*, según la reivindicación 3, que comprende una primera y una segunda construcción, tal como se definen en la reivindicación 5.
9. Procedimiento de producción de un producto con mayor nicotina utilizando una planta, tal como se define en la reivindicación 3 u 8, en el que el producto tiene un aumento de dos veces o más de nicotina en relación con un producto producido a partir de una planta no transformada de control, y en el que el producto tiene mayores niveles de A622 y mayores niveles de NBB1.
10. Procedimiento, según la reivindicación 7 o 9, en el que el producto se selecciona del grupo que consiste en un cigarrillo, un producto farmacéutico y un producto nutracéutico.

11. Utilización de cualquiera de las plantas, según la reivindicación 3 u 8, para producir un producto seleccionado del grupo que consiste en un cigarrillo, un producto farmacéutico y un producto nutracéutico.

Figura 1

Análisis de transferencia de ARN de la expresión de NBB1

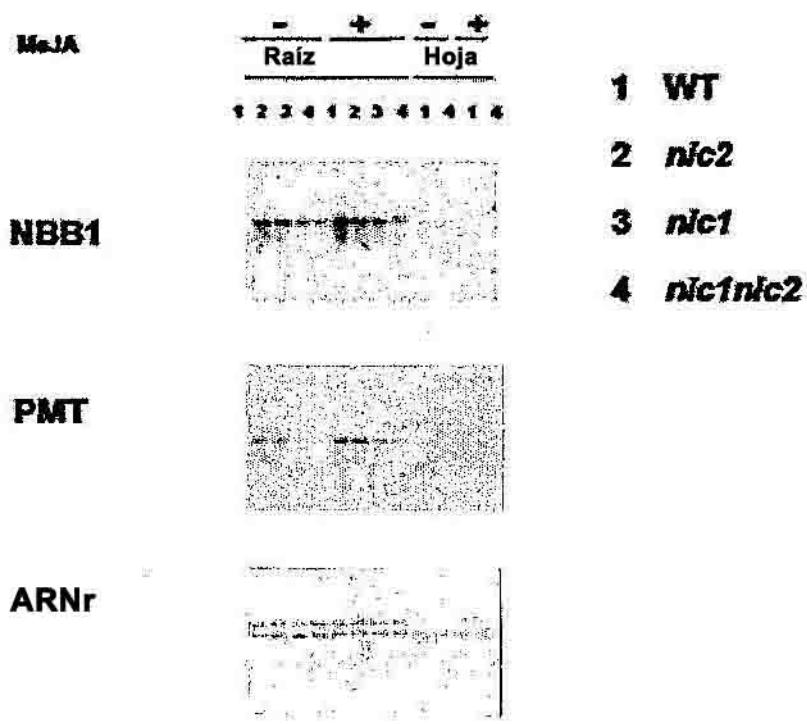


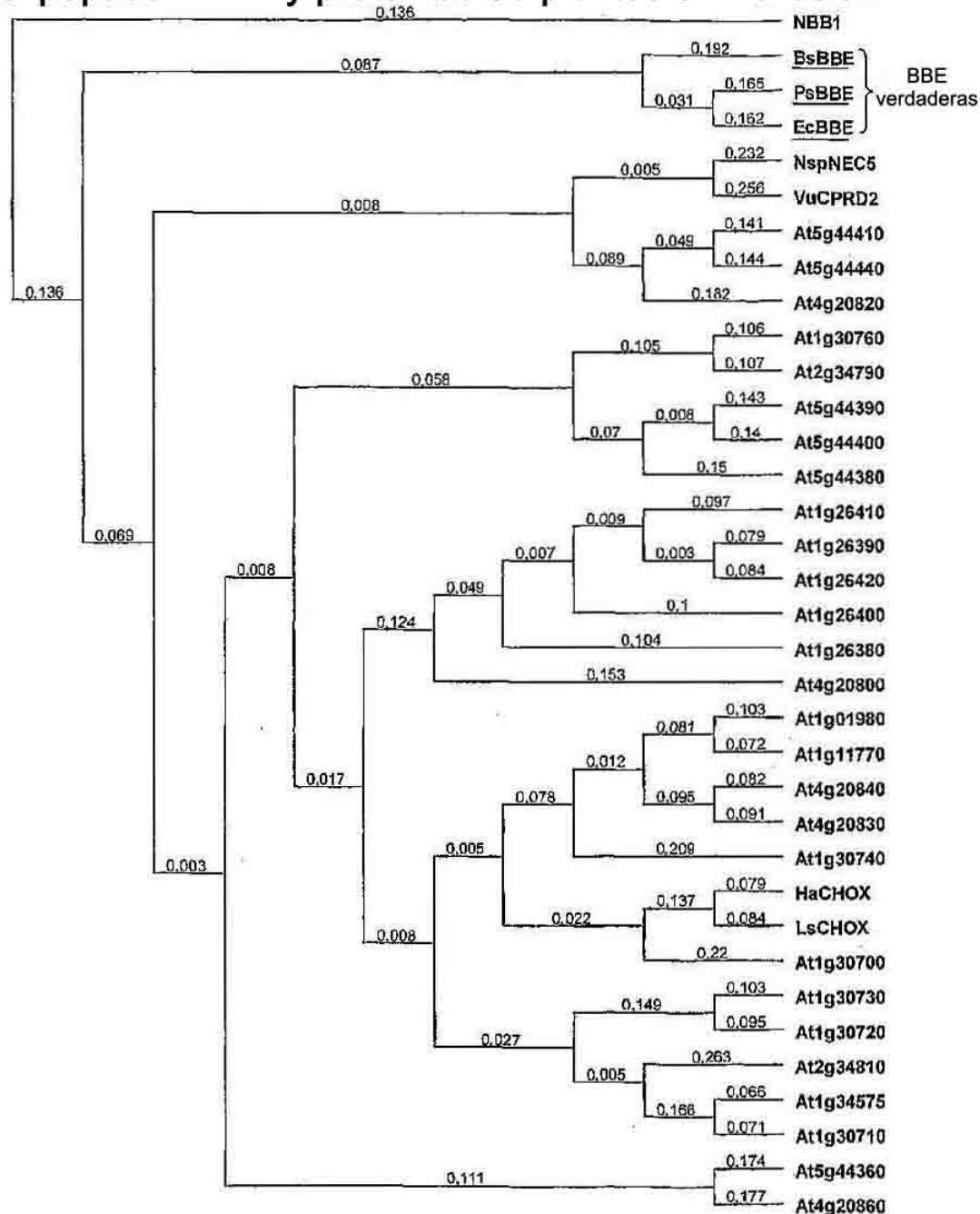
Figura 2

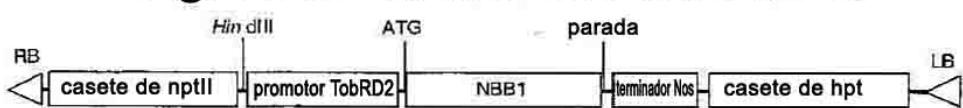
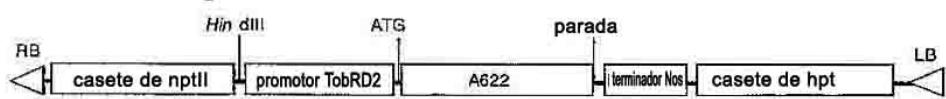
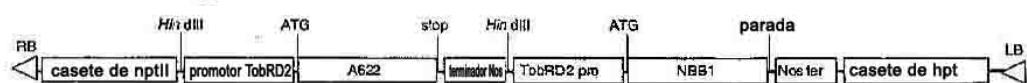
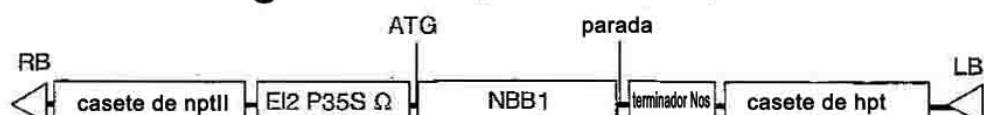
Alineamiento de NBB1 con la enzima del puente de la berberina de *Eschscholzia californica* (EcBBE)

NBB1	1	---MPLITISPSIASLSSETARCAVNTLACLUWNRVNNFSSIVPTSRN-	YFNLTHFSI	55
EcBBE	1	MENYTPPFSTSIEMSLPNCQLEA-NDLISCLPFGURNNTVFSAADSDDPNRFHL	SL	56
	56	DPRPAPRMPXPPTAIPSEEEELVSTIPDCKRASNEETIPRECHSYEGTSYVSDASP	115	
	59	QKPLFONSLSXPSAILESSKEELSNTICRKSSNTIR	YGS-DTGP	116
	116	FVIVDLSLDDVSVDLDSETAWAQGSHFICQYIAAKVSPVHPPAGSOPPIVGSSHTIS	175	
	117	FILIDUNNRRNVPDLESSETAWQVESSTLGELVYALPESSSKLGZTACGCCTVGT	SGHIS	176
	176	CCCFDLSRKPZCLAADNVYDADLIDADORELTDANGQAIIDRQANODDVWAIRGGGGKKGIVYANKI	KI	235
	177	ccccfkmksrkycqLAADNVYDADLIDANGQAIIDRQANODDVWAIRGGGGKKGIVYANKI		236
	236	RLLKWPXKIPPTCMTYPRPGSKQYVAQITTEKNOVTPNIVDPTTUSVLLRPADLPADMYRON	235	
	237	XIEPVPKVTTYPRVTKNVAYDEATSSLNKWQZPWAEELEDFTLSL	L.....	264
	296	TTPIELISPPQHNLVTCPTPVBLSISNETPELGVYKNDSCCKENTRYVESALFFSSLADYGH	355	
	283	ADEKQQVWLTQLOSPHRFCIKTKVAKSEFPDLPELGLYEDYXLENSSES..FAYAGLE..	339	
	356	STGDISSKXERYHD-QKQFFFKSKRDTDVXKPYSHDGHLTFLVVEFVYKQFVYVQDPPYGGAY	414	
	340	...TVSOQNNPZELKDERAPKPKVDPKXZEPKSKAFYGLERESXEPKXEPKXEPKXEPKXEP	396	
	415	DKISPOQIAFPIRQCHLIAQZKAKWHEBDDYNSDVYKHEWVFGFTTPEPVSSSPRGAVY	474	
	387	SKISSDPTPPPHRSQERLHVVKYEVVHNQSEQMKXTEFLDLEKVKYFMYXEPVSKNPRGY	456	
	475	IWYLDNPGLGNWWDYLRLPSSSSPSSSYDVERAAGMYPFLHNYDRLVKAXTOIDP	534	
	457	VRHIDPDEGGIDWGRKTVVKHAEIERSHGESVPLNENYERLIRAKTLIDENNNVFNHPQSI	516	
	535	LRVPRHEQSIPPHGSGTQEKYSSE	559	
	517	PPNARDILEXTREMESEEPEVVI..	538	

Figura 3

Árbol filogenético construido con las secuencias del polipéptido NBB1 y proteínas de plantas similares a BBE



Figuras 4A-4F**Figura 4A** Región de ADN-T de pTobRD2-DEST**Figura 4B** Región de ADN-T de pTobRD2-NBB1ox**Figura 4C** Región de ADN-T de pTobRD2-A622ox**Figura 4D** Región de ADN-T de pTobRD2-A622ox-NBB1ox**Figura 4E** Región de ADN-T de pBI101H-E2113-DEST**Figura 4F** Región de ADN-T de pE1235SΩ-NBB1

Figuras 5A y 5B

Figura 5A Análisis de inmunotransferencia de NBB1

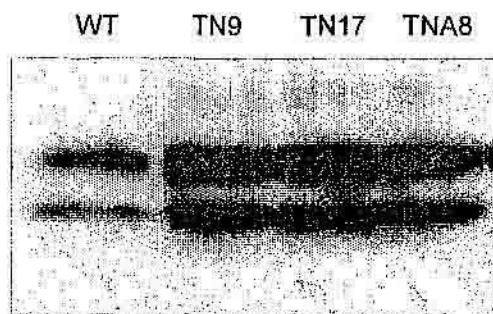


Figura 5B A622 en raíces capilares de tabaco

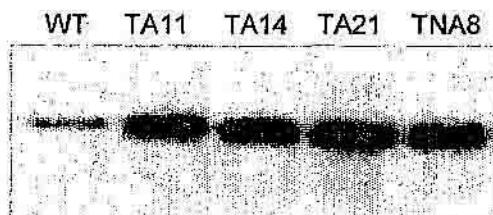


Figura 6

Contenido de alcaloides nicotínicos en raíces capilares de TobRD2-NBB1 (TN), TobRD2-A622 (TA) y TobRD2-NBB1-A622 (TNA)

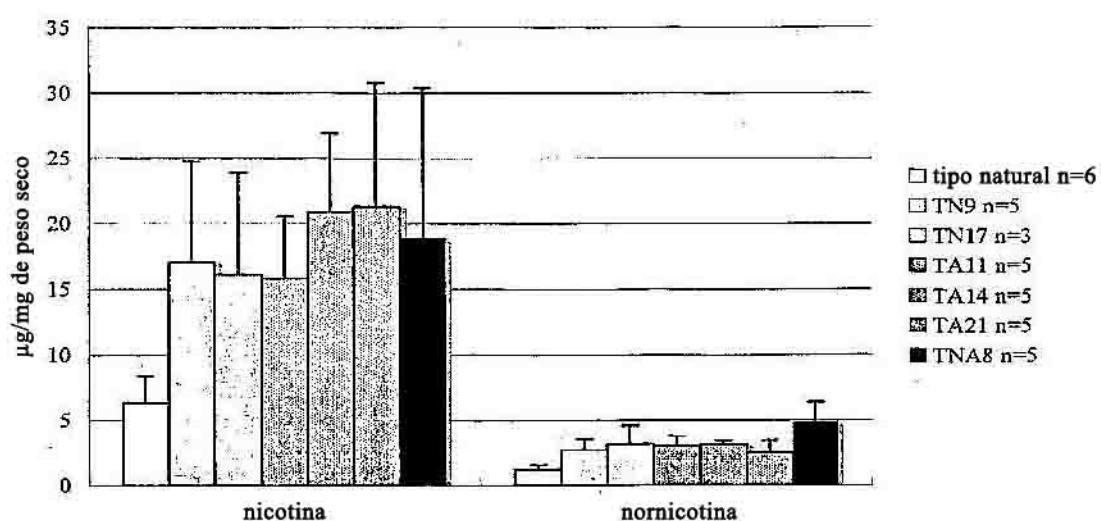


Figura 7

Expresión de la proteína A622 en plantas transgénicas de *A. belladonna*

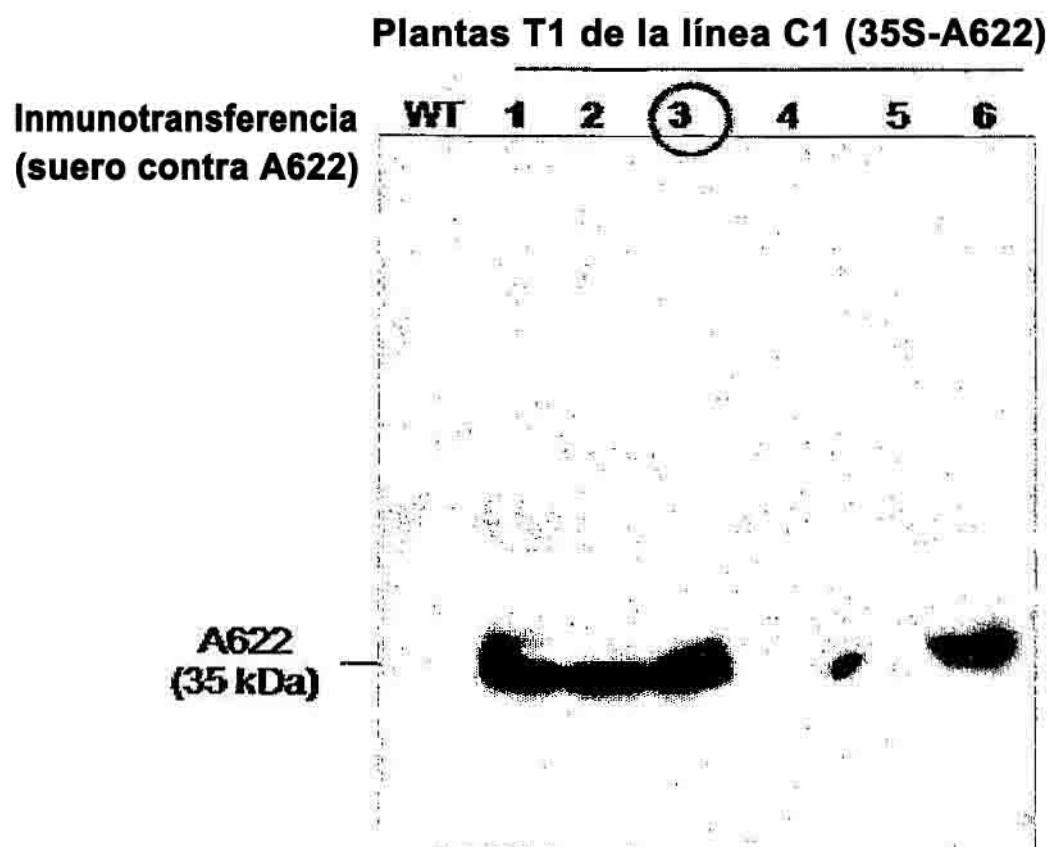


Figura 8

Plantas transgénicas de *A. belladonna* que expresan NBB1 y A622

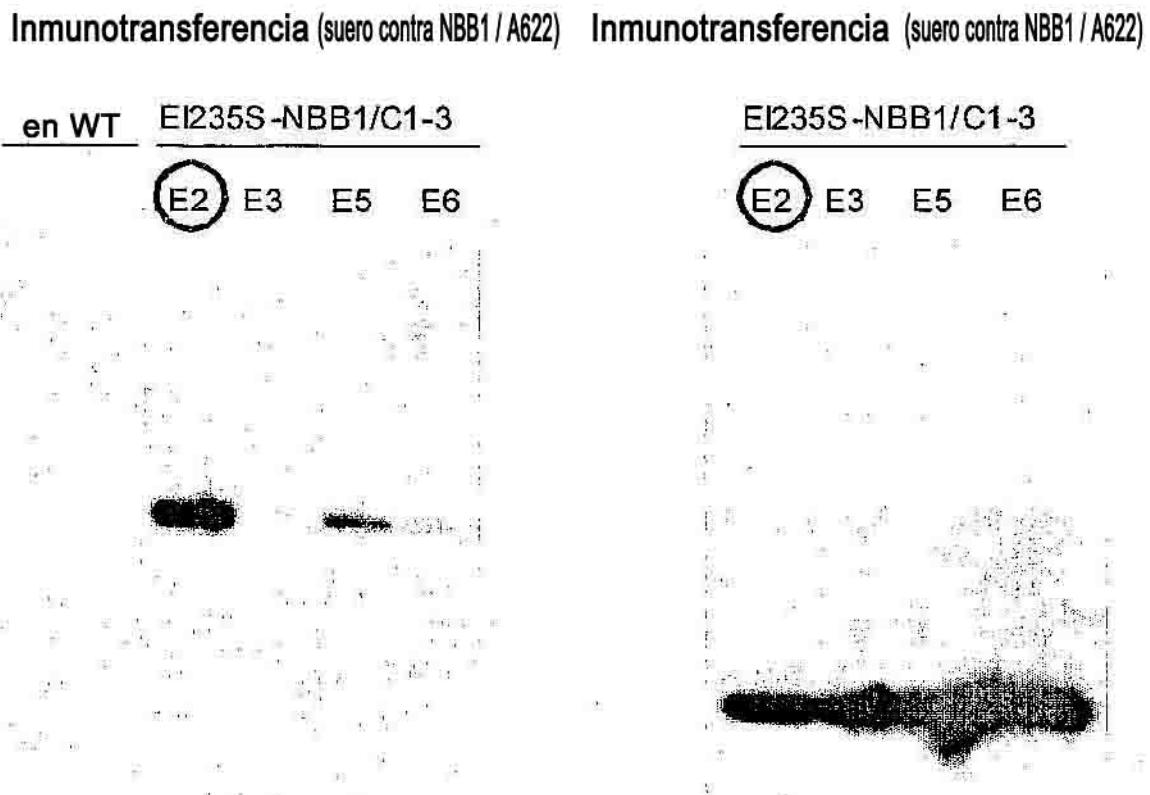


Figura 9

Síntesis de nicotina en raíces capilares transgénicas de *A. belladonna* que expresan NBB1 y A622

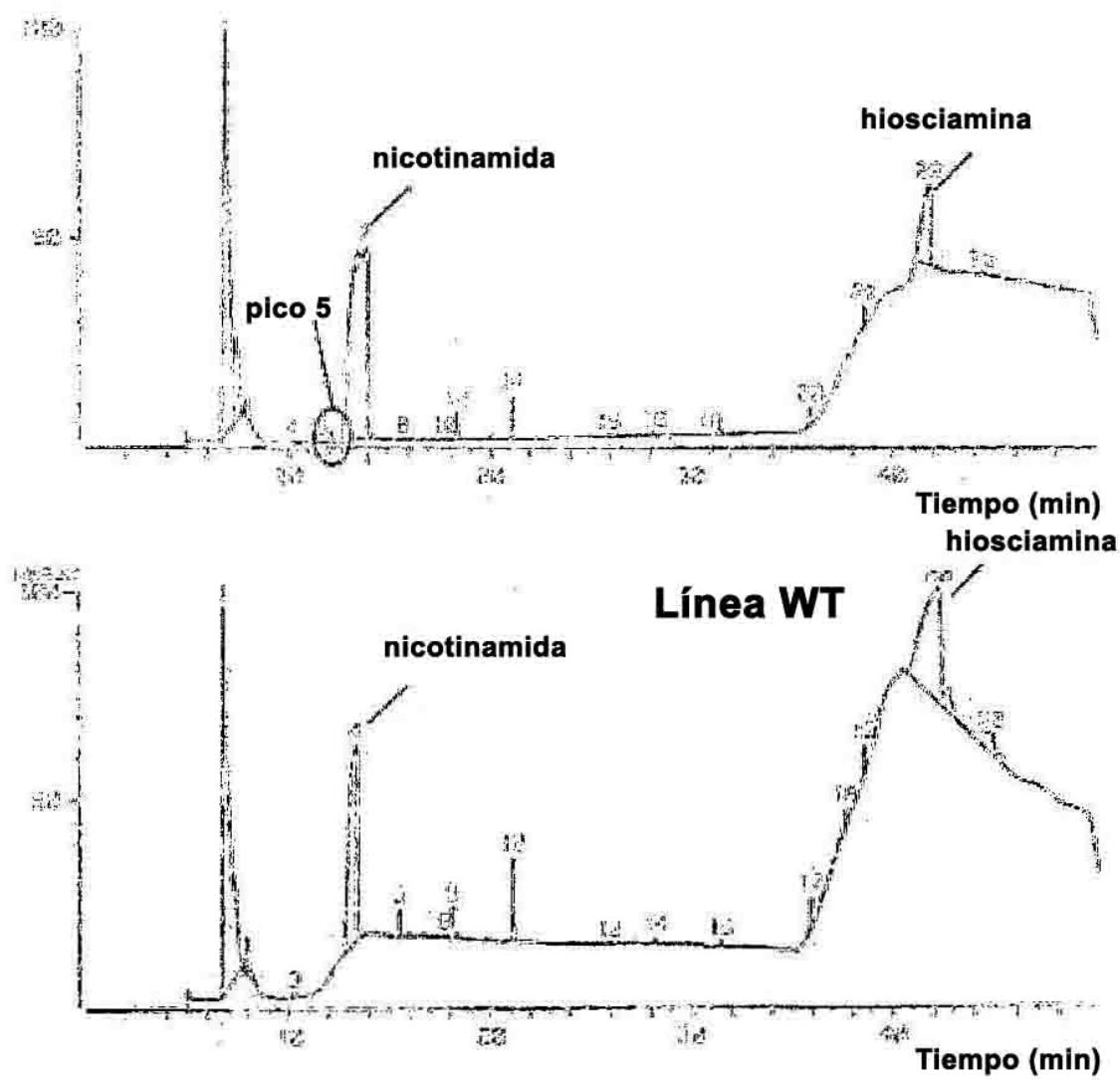
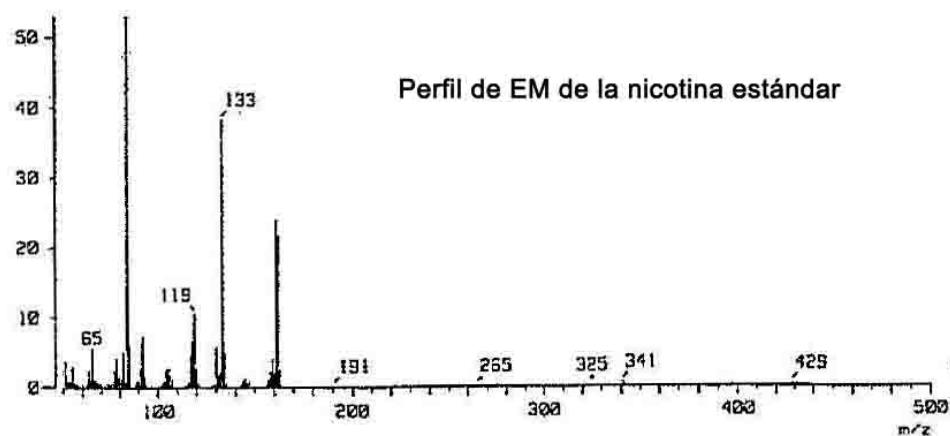
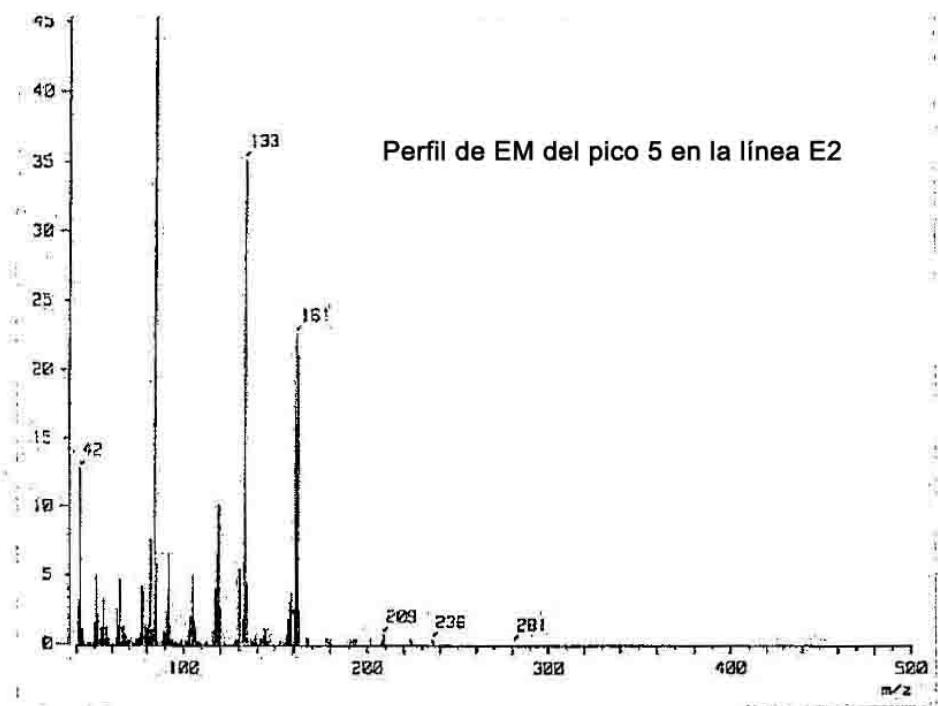


Figura 10

Perfil de EM de la nicotina sintetizada en raíces capilares transgénicas de *A. belladonna* que expresan NBB1 y A622



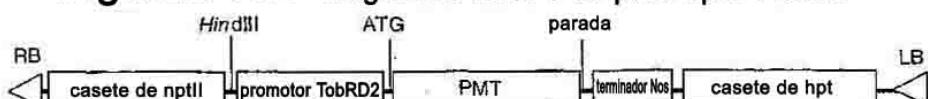
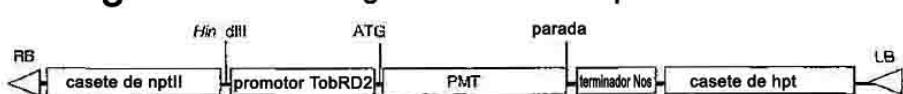
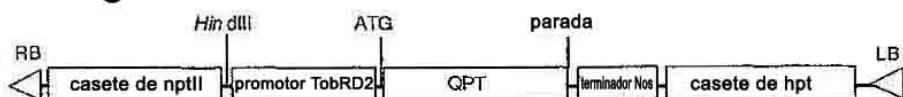
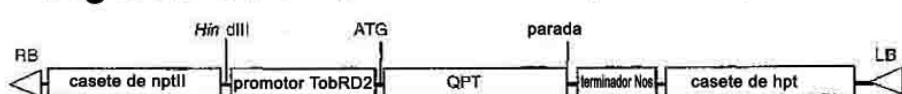
Figuras 11A-11G**Figuras 11A Región de ADN-T de pA622pro-DEST****Figuras 11B Región de ADN-T de pA622pro-PMTox****Figuras 11C Región de ADN-T de pTobRD2-PMTox****Figuras 11D Región de ADN-T de pA622pro-QPTox****Figuras 11E Región de ADN-T de pTobRD2-QPTox****Figuras 11F Región de ADN-T de pA622proPMTox-QPTox****Figuras 11G Región de ADN-T de pTobRD2-PMTox-QPTox**

Figura 12

Contenido de nicotina en hojas de plantas de tabaco transformadas con A622pro-PMTox (AP-1 a AP-24). AG-1 a AG-4 son plantas de control transformadas con A622-GUS.

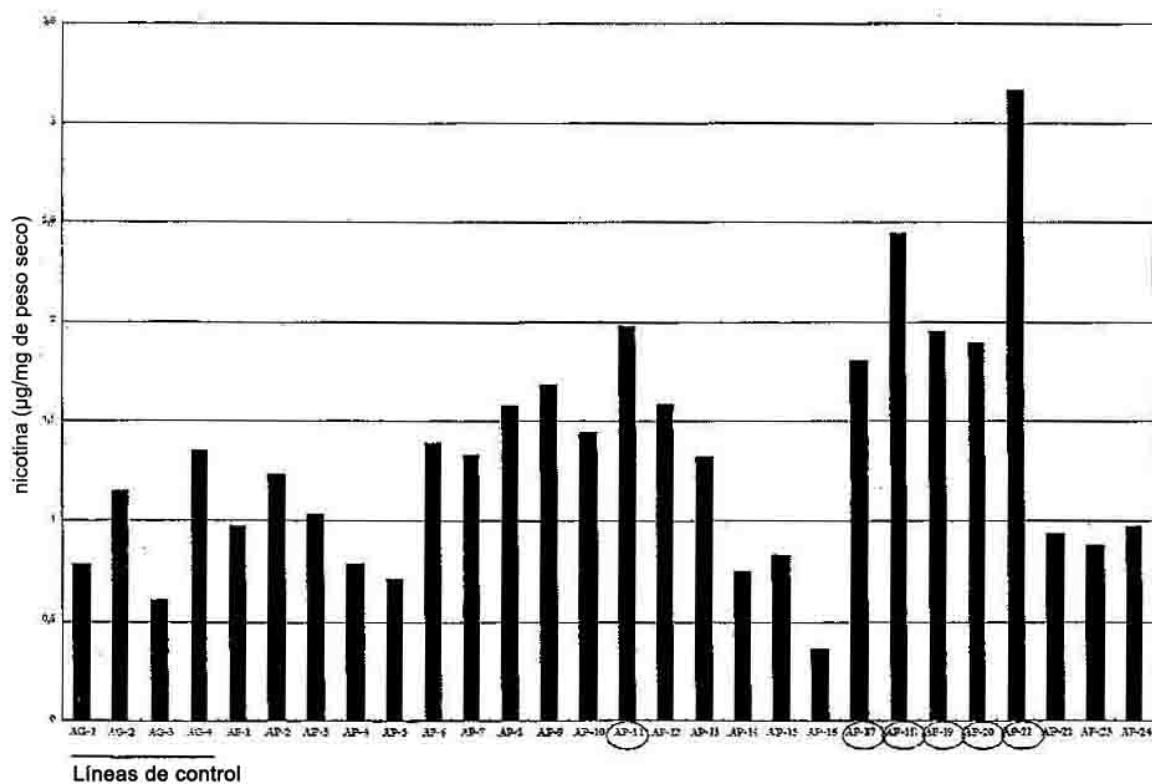


Figura 13

Contenido de nicotina en hojas de plantas de tabaco transformadas con TobRD2-PMTox (TP-1 a TP-14).
TG-1 a TG-3 son plantas de control transformadas con TobRD2-GUS.

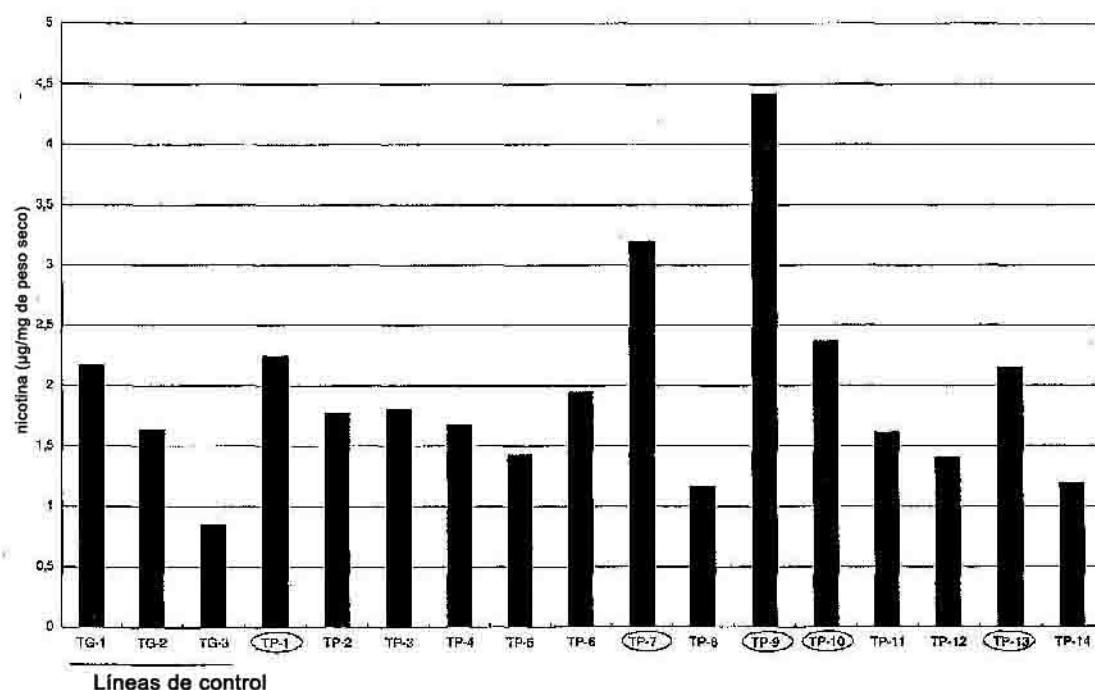


Figura 14

Contenido de nicotina en hojas de plantas de tabaco transformadas con A622pro-QPTox (AQ-1 a AQ-15). AG-1 a AG-4 son plantas de control transformadas con A622-GUS

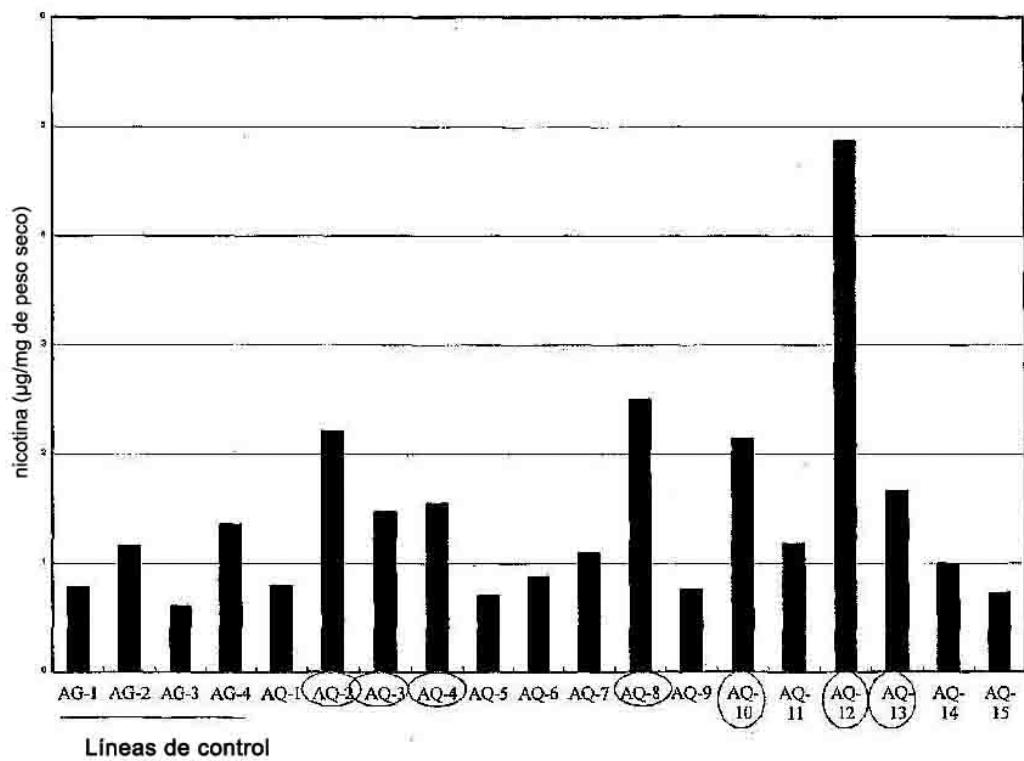


Figura 15

Contenido de nicotina en hojas de plantas de tabaco transformadas con TobRD2-QPTox (TQ-1 a TQ-14). TG-1 a TG-3 son plantas de control transformadas con TobRD2-GUS nicotina

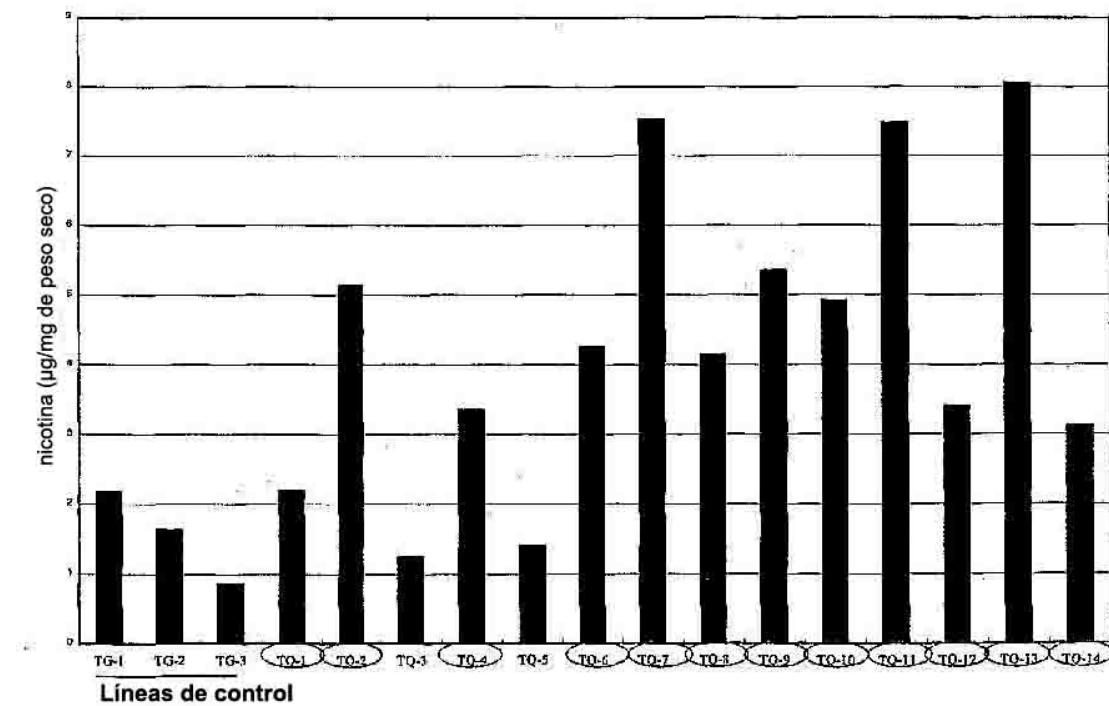


Figura 16

Contenido de nicotina en hojas de plantas de tabaco transformadas con A622pro-PMTox-QPTox (APQ-1 a APQ-27). AG-1 a AG-3 son plantas de control transformadas con A622-GUS.

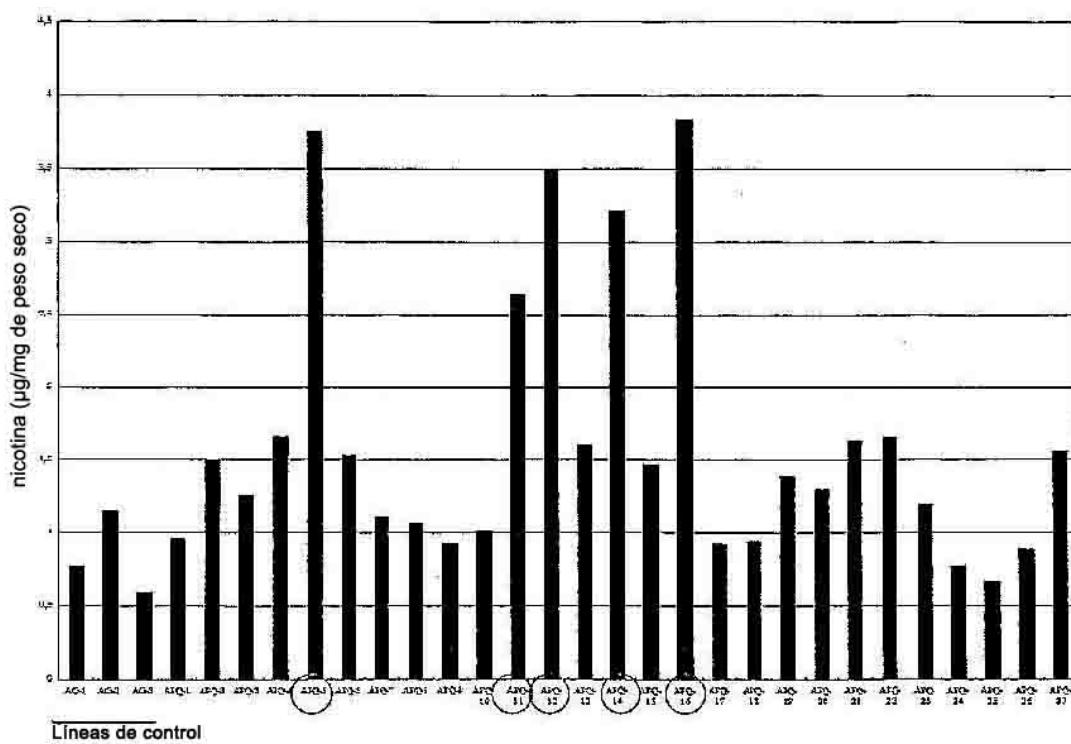
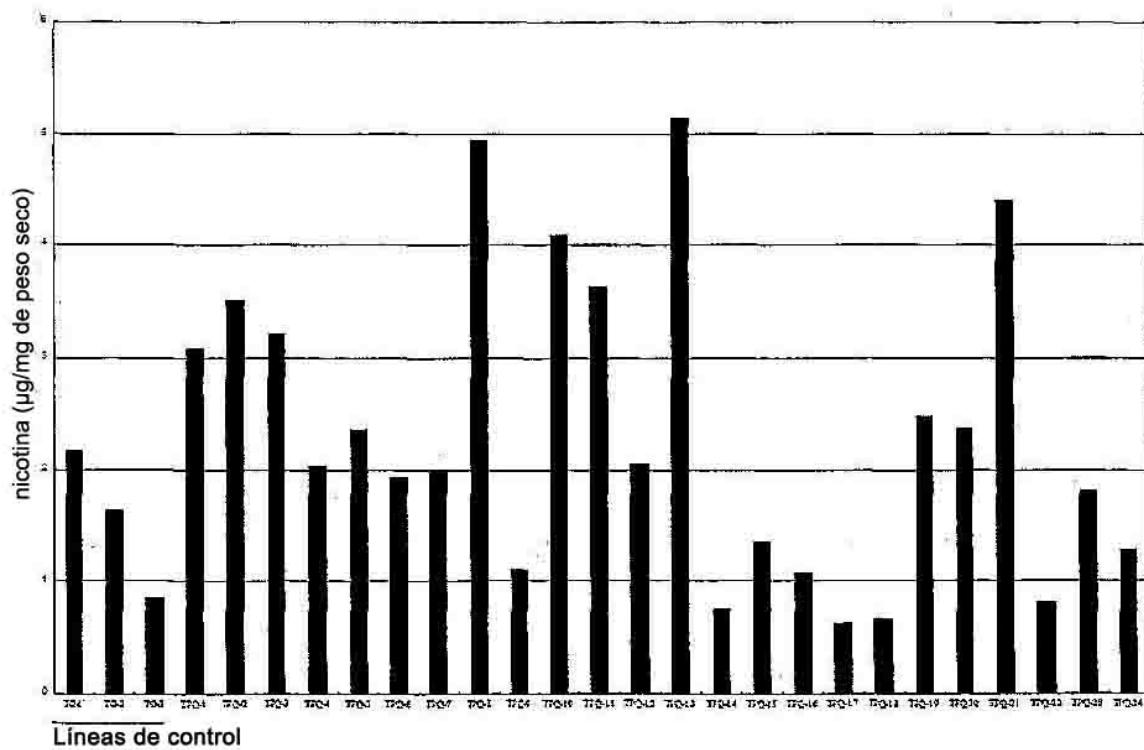


Figura 17

Contenido de nicotina en hojas de plantas de tabaco transformadas con pTobRD2-PMTox-QPTox (TPQ-1 a TPQ-24). TG-1 a TG-3 son plantas de control transformadas con TobRD2-GUS.



Figuras 18A-18C

Figura 18A Región de ADN-T de pGWB2

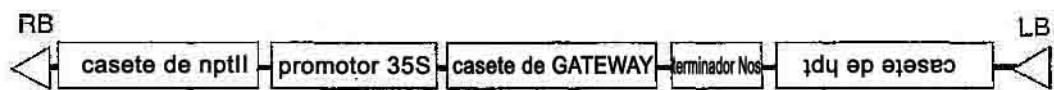


Figura 18B Región de ADN-T de p35S-NBB1

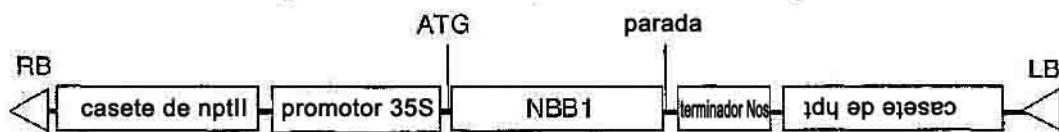


Figura 18C Región de ADN-T de p35S-PMT

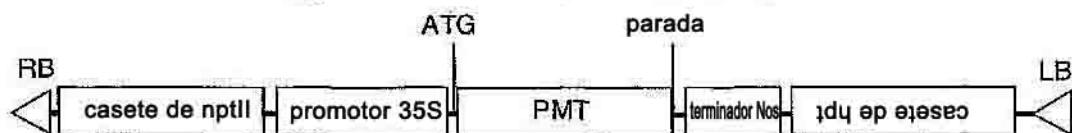


Figura 19

Análisis de inmunotransferencia de líneas de *Arabidopsis thaliana* transformadas con casetes de 35S-A622-35S-NBB1-35S-PMT

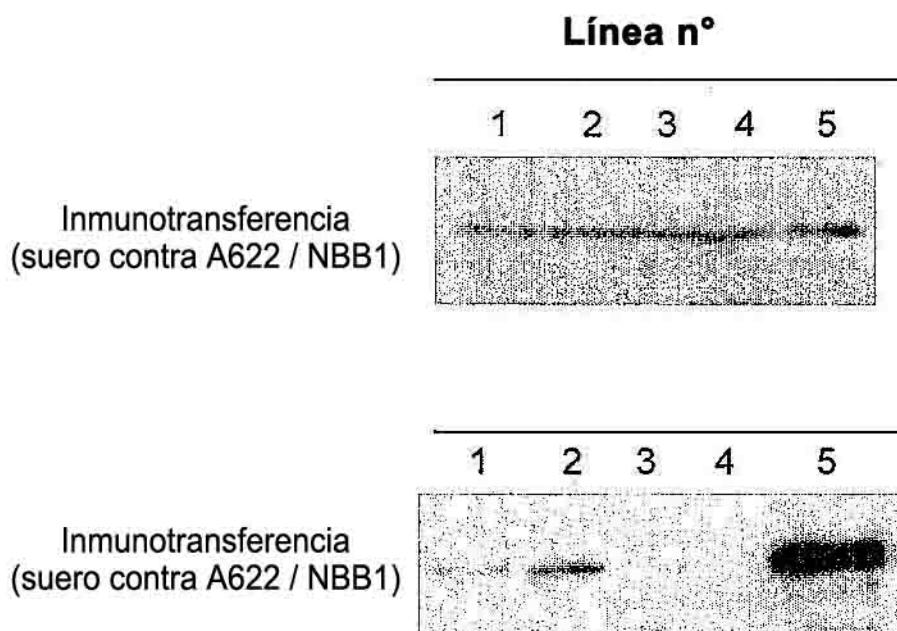
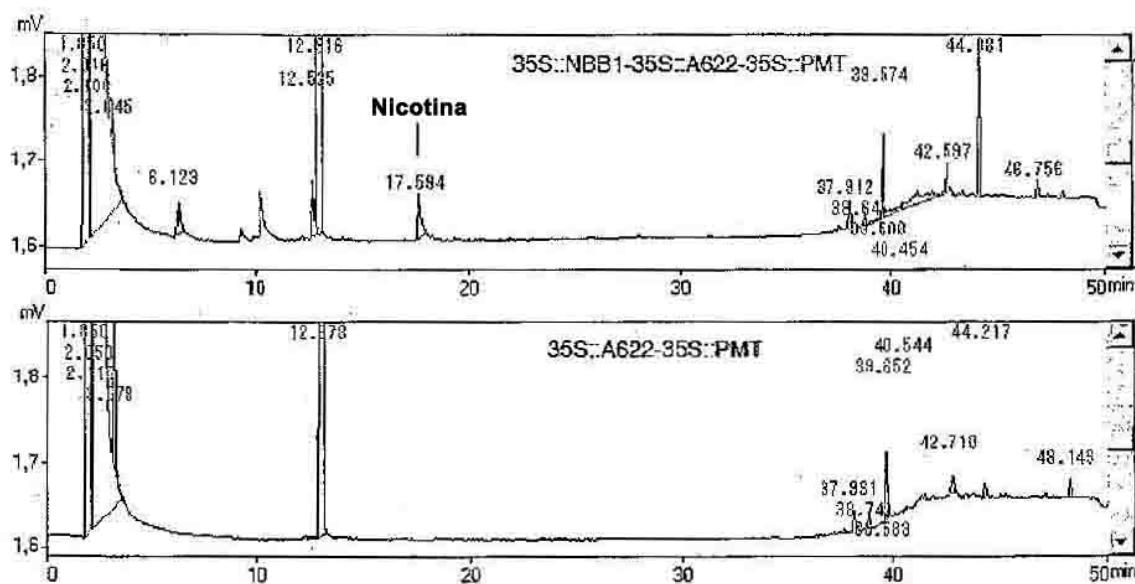


Figura 20

Plantas transgénicas de *Arabidopsis* que coexpresan NBB1, A622 y PMT



Figuras 21A-21B

Figura 21A Confirmación de la presencia de A622 y NBB1 en bácmidos recombinantes

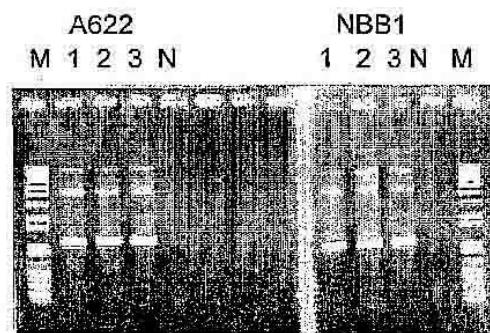


Figura 21B Detección de A622 y NBB1 en células Sf9 de insectos infectadas y eluatos de columnas de Ni-NTA

