

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 685 797**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/82** (2006.01)

**C12N 9/88** (2006.01)

**A01H 5/00** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.08.2012 PCT/EP2012/003663**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.03.2013 WO13029800**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.08.2012 E 12758405 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.07.2018 EP 2751273**

54 Título: **Treonina sintasa de nicotiana tabacum y métodos y usos de esta**

30 Prioridad:

**02.09.2011 EP 11179889**

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

**11.10.2018**

73 Titular/es:

**PHILIP MORRIS PRODUCTS S.A. (100.0%)  
Quai Jeanrenaud 3  
2000 Neuchâtel, CH**

72 Inventor/es:

**BOVET, LUCIEN y  
SIERRO, NICOLAS**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 685 797 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

Treonina sintasa de nicotiana tabacum y métodos y usos de esta

## 5 Campo de la invención

La presente invención describe el gen de la treonina sintasa de *Nicotiana tabacum* y variantes, homólogos y fragmentos de esta. En particular, se describe la modificación de la expresión de este gen o la actividad de la proteína codificada por él para aumentar los niveles de metionina libre en plantas, como en plantas de tabaco. Esto puede usarse para generar sabores y aromas convenientes en el tabaco mediante la elevación de los niveles de metional en él.

Antecedentes de la invención

15 Un incremento en sabores, tales como las sustancias que producen aromas, en el tabaco puede generar un sabor conveniente cuando se fuma el tabaco. Dichos sabores pueden obtenerse, por ejemplo, a partir de aminoácidos que se someten a reacciones de Maillard. El metional (3-(metiltio)propanal) es un compuesto saborizante responsable de un aroma a "patata horneada". La producción de metional puede inducirse térmicamente donde el metional se origina de la metionina y derivados de la metionina. La degradación de Strecker de la metionina implica la interacción con compuestos alfa-dicarbonilo, que son intermediarios en las reacciones de Maillard, y dan como resultado la formación de metional.

25 Se han desarrollado diversos métodos para aumentar la cantidad de metionina libre en plantas, por ejemplo, pueden añadirse aminoácidos exógenos a las plantas. Sin embargo, el uso de aminoácidos añadidos de manera exógena da como resultado un aumento significativo en el coste de producción, así como en la seguridad y en aspectos regulatorios.

30 La biosíntesis de metionina y treonina están unidas ambas a la vía del aspartato. En las plantas, sus vías biosintéticas divergen al nivel de la O-fosfohomoserina (OPH). Las enzimas cistationina gamma-sintasa (CGS) y treonina sintasa (TS) compiten por el sustrato común O-fosfohomoserina. Los niveles de metionina libre pueden incrementarse potencialmente mediante la sobreexpresión o inhibición de la expresión de enzimas implicadas en la vía biosintética del aspartato.

35 Un posible enfoque es sobreexpresar la cistationina gamma-sintasa. Otro enfoque es disminuir la expresión de treonina sintasa. Sin embargo, hasta la fecha todos estos esfuerzos dirigidos a alterar los genes de la treonina sintasa dieron como resultado fenotipos que afectaron negativamente a toda la planta. Bartlem y otros (2000) *Plant Physiol.*, 2000, 123:101-110 describen mutaciones en el gen de treonina sintasa de plantas de *Arabidopsis*. Los mutantes descritos que portan una única mutación de un par de bases dentro del gen que codifica la treonina sintasa mostraron una sobreacumulación de metionina y un nivel marcadamente reducido de treonina. Sin embargo, los mutantes descritos de *Arabidopsis* experimentaron crecimiento reducido en comparación con el del tipo silvestre. El crecimiento reducido puede rescatarse solo después de la adición de treonina o isoleucina.

45 Zeh y otros (2001) *Plant Physiol.*, 2001, 127:792-802 describen plantas de patata transgénica preparadas mediante un enfoque transgénico antisentido mediante el uso del promotor constitutivo de 35S del virus del mosaico de la coliflor. Aunque las plantas de patata transgénicas descritas mostraron niveles altos de metionina, también experimentaron un crecimiento reducido en comparación con el de las plantas de tipo silvestre.

50 Avraham y otros (2005) *Transgenic Research*, 2005, 14: 299-311 describen plantas transgénicas de *Arabidopsis* que se preparan mediante un enfoque transgénico antisentido. Aunque las plantas transgénicas descritas mostraron un aumento del nivel de metionina, experimentaron fenotipos extremadamente anormales, que incluyeron un retardo considerable del crecimiento, tamaño reducido de las hojas en roseta y hojas cloróticas.

55 Existe la necesidad de plantas, tales como plantas de tabaco, que combinen un nivel aumentado de metionina libre a la vez que se mantengan determinadas propiedades agrónomicamente convenientes, tal como la velocidad de crecimiento y el tamaño total de las plantas - y sin requerir la adición de ningún ingrediente exógeno. Un objeto de la presente invención es satisfacer esta necesidad.

Aspectos y modalidades de la invención

60 La presente invención se basa, al menos en parte, en el hallazgo de que una reducción (por ejemplo, inhibición) en la expresión o la actividad de la treonina sintasa en plantas o células vegetales, tal como plantas de tabaco o células vegetales, da como resultado un aumento en la concentración de metionina, en células vegetales o una o más partes de una planta en comparación con una planta o célula vegetal control. Sorprendentemente, la planta modificada genéticamente no muestra ningún cambio en su apariencia visual general en comparación con una planta control. Este hallazgo es inesperado en vista de los diversos fenotipos adversos observados en *Arabidopsis* o plantas de patata transgénicas. El hallazgo puede aprovecharse ventajosamente porque las plantas se usan para la

5 producción comercial de diversos productos que incluyen tabaco donde las alteraciones en la apariencia visual no serían aceptables para la industria o pueden dar como resultado una reducción inaceptable de los rendimientos de la producción. Tampoco se requiere la adición de aminoácido exógeno. Además, el aerosol que se libera después de calentar el tabaco contiene un nivel elevado de metional en comparación con el tabaco preparado a partir de una planta control. El aumento en metional en el humo o aerosol produce un sabor, un aroma, o tanto un sabor como un aroma convenientes cuando se usa el tabaco.

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

10 En un aspecto, se proporciona un polipéptido aislado que comprende, que consiste o que consiste esencialmente en una secuencia que codifica una treonina sintasa y que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la sec. con núm. de ident.:1, la sec. con núm. de ident.:2 o la sec. con núm. de ident.:3.

15 En otro aspecto, se proporciona un polipéptido aislado que comprende, que consiste o que consiste esencialmente en una secuencia que codifica una treonina sintasa y que tiene al menos 87 % de identidad de secuencia con la sec. con núm. de ident.:4 o la sec. con núm. de ident.:5.

20 En otro aspecto, se proporciona un polinucleótido aislado que comprende, que consiste o que consiste esencialmente en una secuencia que codifica una treonina sintasa y que tiene al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la sec. con núm. de ident.:20.

En otro aspecto, se proporciona un polipéptido aislado codificado por cualquiera de los polinucleótidos de la presente invención.

25 En otro aspecto, se proporciona un polipéptido aislado que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la sec. con núm. de ident.:6, la sec. con núm. de ident.:7 o la sec. con núm. de ident.:8.

30 En otro aspecto, se proporciona un polipéptido aislado que tiene al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la sec. con núm. de ident.:21.

En otro aspecto, se proporciona una construcción, un vector o un vector de expresión que comprende cualquiera (por ejemplo, uno o más, dos o más, tres o más o cuatro o más) de los polinucleótidos de la presente invención.

35 En otro aspecto, se proporciona una célula vegetal mutante, de origen no natural o una célula vegetal transgénica, que comprende al menos uno (por ejemplo, uno o más, dos o más, tres o más o cuatro o más) de los polinucleótidos, o al menos uno (por ejemplo, uno o más, dos o más, tres o más o cuatro o más) de los polipéptidos. En otro aspecto, se proporciona una planta mutante, de origen no natural o una planta transgénica que comprende la célula vegetal de acuerdo con la presente invención. De manera adecuada, la expresión de una o más secuencias codificantes de treonina sintasa o la actividad de las proteínas de treonina sintasa codificadas por ellas se reduce, y una parte de la planta de tabaco tiene un aumento en el contenido de metionina de al menos 5 % en comparación con una planta de tabaco control en la cual la expresión o la actividad de treonina sintasa no se ha reducido, o en donde la concentración de metional en el humo o aerosol aumenta en al menos 5 % en comparación con el humo o aerosol de la planta de tabaco control.

45 Un aspecto adicional se refiere a un método para aumentar la concentración de metionina en al menos una parte de una planta de tabaco, que comprende las etapas de: (i) reducir la expresión o actividad de una o más treonina sintasas (por ejemplo, dos o más, tres o más o cuatro o más) en la planta de tabaco, preferentemente, en donde la treonina sintasa comprende la secuencia de polinucleótido o la secuencia polipeptídica descritas en la presente; (ii) medir la concentración de metionina en al menos una parte de la planta de tabaco mutante, transgénica o de origen no natural obtenida en la etapa (i); y (iii) identificar una planta mutante, de origen no natural o una planta de tabaco transgénica en la cual la concentración de metionina ha aumentado en comparación con una planta control. Preferentemente, la apariencia visual general de la planta mutante, de origen no natural o de la planta de tabaco transgénica es esencialmente similar a la planta de tabaco control, después de un periodo tal como tres meses después del trasplante al campo, o 36 días después del desmoche.

55 En una modalidad, no se necesita la adición de nutrientes exógenos, tal como aminoácidos, por ejemplo, treonina y/o isoleucina.

60 En otro aspecto, se proporciona una planta de tabaco mutante, de origen no natural o una planta de tabaco transgénica, o material vegetal de tabaco derivado o derivable de estos que se obtiene o que puede obtenerse mediante dicho método.

65 En otro aspecto, se proporciona, además, una planta de tabaco mutante, de origen no natural o una planta de tabaco transgénica, en donde la expresión de una o más secuencias codificantes de treonina sintasa (por ejemplo, dos o más, tres o más o cuatro o más) o la actividad de la proteína de treonina sintasa codificadas por estas se reduce, y una parte de la planta de tabaco tiene un aumento en el contenido de metionina de al menos 5 % en comparación

con una planta de tabaco control en la cual la expresión o la actividad de treonina sintasa no se ha reducido, o en donde la concentración de metional en el humo o aerosol aumenta en al menos 5 % en comparación con el humo o aerosol de la planta de tabaco control.

5 De manera adecuada, la apariencia general de dicha planta es esencialmente similar o visualmente indistinguible con respecto a la planta control después de un periodo, tal como pero sin limitarse a tres meses después del trasplante al campo o 36 días después del desmoche. Preferentemente, (i) la altura del tallo de las plantas de tabaco mutantes, transgénicas o de origen no natural es esencialmente la misma que la altura del tallo de las plantas de tabaco control después de un periodo, tal como pero sin limitarse a tres meses después del trasplante al campo o 36 días después del desmoche; (ii) el contenido de clorofila de las plantas de tabaco mutantes, transgénicas o de origen no natural es esencialmente el mismo que el contenido de clorofila de las plantas de tabaco control después de un periodo, tal como pero sin limitarse a tres meses después del trasplante al campo o 36 días después del desmoche; o ambos (i) y (ii).

15 De manera adecuada, la concentración de treonina en una parte de la planta (por ejemplo, las hojas) aumenta en comparación con la planta control; y preferentemente, en donde (a) la concentración de metionina en la parte de la planta (por ejemplo, las hojas) es al menos aproximadamente 0,03 mg/g; (b) la concentración de treonina en las hojas es al menos aproximadamente 0,5 mg/g; (c) la concentración de metional en el humo o aerosol después de calentar es al menos aproximadamente 2000 µg/g; o una combinación de dos o más de (a), (b) y (c).

20 Se proporciona, además, biomasa, semillas u hojas que comprenden células o tejido de la planta mutante de origen no natural o planta transgénica descritas en la presente. Se proporciona, además, un producto de tabaco que comprende una parte de la planta mutante de origen no natural o planta transgénica, su biomasa, o sus hojas, o una combinación de estas, como se describe en la presente.

25 En un aspecto adicional, se proporciona un método para producir metional que comprende las etapas de:

30 (a) proporcionar parte de una planta de tabaco mutante, de origen no natural o transgénica; biomasa, semilla u hojas; o el producto de tabaco descrito en la presente; y (b) proporcionar calor a estos.

35 En otro aspecto se proporciona un método para identificar material de tabaco que libera niveles elevados de metional en un aerosol después de calentar, que comprende las etapas de: (a) preparar una muestra de material de tabaco; (b) determinar el perfil de masa molecular de la muestra; y (c) comparar el perfil de masa molecular en una o más de una relación de masa:carga; en donde el aumento en relaciones específicas de masa:carga en comparación con una planta control es indicativo de que los niveles de metional en el aerosol se elevarán.

40 Un material de tabaco identificado o identificable mediante este método también se proporciona en otro aspecto de la descripción.

Otros aspectos de la presente invención se exponen más adelante.

Un gen quimérico que comprende el polinucleótido unido operativamente a una o más secuencias reguladoras.

45 Una construcción polinucleotídica de NtTS que comprende, que consiste o que consiste esencialmente en al menos 15-30 nucleótidos, 30-50 nucleótidos, 50-100 nucleótidos, 100-150 nucleótidos, 150-200 nucleótidos, 200-300 nucleótidos, 300-400 nucleótidos, 400-500 nucleótidos, 500-600 nucleótidos o 600-700 nucleótidos.

50 Un producto consumible que incorpora o utiliza el material vegetal, la biomasa, la semilla o las hojas de acuerdo con la presente invención.

Una línea celular que comprende (por ejemplo, uno o más, dos o más, tres o más o cuatro o más) el polinucleótido aislado, el gen quimérico, la construcción polinucleotídica, el ARN bicatenario, el conjugado o el vector de expresión y similares de acuerdo con la presente invención.

55 Un método para modular la expresión del ADN de NtTS o la actividad de la proteína codificada por él en una célula, dicho método comprende administrar (por ejemplo, uno o más, dos o más, tres o más o cuatro o más) el gen quimérico, la construcción polinucleotídica, el ARN bicatenario, el conjugado o el vector de expresión de acuerdo con la presente invención.

60 Un método para detectar, aislar, amplificar o analizar un polinucleótido de NtTS, el método comprende la etapa de proporcionar una muestra que comprende un polinucleótido e hibridar dicho polinucleótido a una molécula polinucleotídica que comprende una secuencia de nucleótidos de al menos 10 nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos aislada de acuerdo con la presente invención.

Uso de un agente que modula la expresión del ADN de NtTS y la actividad de la proteína codificada por él o la actividad de la proteína codificada por él para reducir el contenido de metionina en al menos una parte de una planta en al menos 5 % en comparación con una planta control.

5 El método o el uso de acuerdo con la presente invención, en donde el agente es o se deriva del ADN de NtTS, un gen de NtTS quimérico, una construcción polinucleotídica que comprende un polinucleótido de NtTS, un ARN antisentido, un ARN bicatenario, un ADNc, un conjugado que comprende un polinucleótido de NtTS y al menos un resto no nucleotídico o no polinucleotídico unido covalentemente a él, una ribozima, un mutágeno, un dedo de zinc, una molécula pequeña o una meganucleasa.

10 En otra modalidad, el(los) fragmento(s) polinucleotídico(s) codifica(n) un ácido nucleico antisentido, una ribozima, un ARN que tiene efectos en el proceso de trans-corte y empalme mediado por espliceosomas, un ARN de interferencia (ARNi), un ARN guía, u otro ARN no traducido y similares. En otra modalidad, el(los) fragmento(s) polinucleotídico(s) codifican un ARNi.

15 En un aspecto adicional, se proporciona un método para producir un producto de tabaco que comprende las etapas de: (a) obtener semilla de la planta de tabaco mutante, de origen no natural o transgénica; (b) plantar y cultivar la semilla hasta obtener una planta; (c) cosechar la planta; y (d) preparar un producto de tabaco a partir de la planta cosechada.

20 Las modalidades mencionadas anteriormente se describen como modalidades de cada uno de los aspectos descritos anteriormente.

#### Breve descripción de los dibujos

25 La figura 1 ilustra los perfiles de LC-MS de hojas curadas de VC-4, TN90-4, NtTS1-3, NtTS2-3, NtTS3-2, después de la extracción con metanol y la separación en una columna RP18 Shield de WatersXBridge. VC-4 es una planta control con vector solamente; TN90 es una planta de tabaco no modificada que proporciona el fondo; NtTS1-3, NtTS2-3 y NtTS3-2 son plantas de *Nicotiana tabacum* que tienen un gen de treonina sintasa silenciado por ARNi. Las flechas indican los picos a aproximadamente 5, 9, 17 y 19 minutos.

#### Definiciones

35 Los términos técnicos y expresiones usados dentro del alcance de esta solicitud generalmente tendrán el significado aplicado comúnmente para ellos en la técnica pertinente a la biología molecular y de plantas. Todas las definiciones de los términos siguientes se aplican a todo el contenido de esta solicitud. La palabra "que comprende" no excluye otros elementos o etapas, y los artículos indefinidos "un" o "una" no excluyen una pluralidad. Una sola etapa puede cumplir con las funciones de varias características enumeradas en las reivindicaciones. Los términos "alrededor de", "esencialmente" y "aproximadamente" en el contexto de un valor o rango numérico dado se refieren a un valor o rango que está dentro del 20 %, dentro del 10 %, o dentro del 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 % del valor o rango dado.

El término "aislado" se refiere a cualquier entidad que se toma de su ambiente natural, pero el término no implica ningún grado de purificación.

45 Un "vector" se refiere a un vehículo de ácido nucleico que comprende una combinación de componentes de ácidos nucleicos para permitir el transporte de ácido nucleico, construcciones de ácidos nucleicos y conjugados de ácidos nucleicos y similares. Los vectores adecuados incluyen episomas capaces de una replicación extracromosómica tales como plásmidos de ADN circulares, de doble cadena; plásmidos de ADN lineales de doble cadena; y otros vectores de cualquier origen.

50 Un "vector de expresión" es un vehículo de ácido nucleico que comprende una combinación de componentes de ADN para permitir la expresión de ácido nucleico, construcciones de ácidos nucleicos y conjugados de ácidos nucleicos y lo similar. Los vectores de expresión adecuados incluyen episomas capaces de una replicación extracromosómica tales como plásmidos de ADN circulares, bicatenarios; plásmidos de ADN lineales, bicatenarios; y otros vectores de expresión equivalentes funcionalmente de cualquier origen. Un vector de expresión comprende al menos un promotor ubicado aguas arriba y unido operativamente a un ácido nucleico, construcciones de ácidos nucleicos o conjugado de ácido nucleico, como se define más abajo.

60 El término "construcción" se refiere a un fragmento de ADN de doble cadena, recombinante que comprende uno o más polinucleótidos. La construcción comprende una "cadena molde" con apareamiento de bases con una "cadena codificante o sentido" complementaria. Una construcción dada puede insertarse en un vector en dos orientaciones posibles, ya sea en la misma orientación (o sentido) o en la orientación contraria (o antisentido) con respecto a la orientación de un promotor ubicado dentro de un vector – tal como un vector de expresión.

65 Un "promotor" se refiere a un elemento/secuencia de ácido nucleico, típicamente ubicado aguas arriba y unido operativamente a un fragmento de ADN de doble cadena. Los promotores pueden derivarse totalmente de regiones

próximas a un gen de interés nativo, o pueden estar compuestos de diferentes elementos derivados de diferentes promotores nativos o segmentos de ADN sintéticos.

Los términos "homología, identidad o similitud" se refieren al grado de similitud de secuencias entre dos polipéptidos o entre dos moléculas de ácidos nucleicos comparadas mediante alineación de secuencias. El grado de homología entre dos secuencias de ácidos nucleicos discretas que se comparan es una función del número de nucleótidos idénticos, o coincidentes, en posiciones comparables. El por ciento de identidad puede determinarse mediante inspección visual y cálculos matemáticos. Alternativamente, el por ciento de identidad de dos secuencias de ácidos nucleicos puede determinarse al comparar la información de las secuencias con el uso de un programa informático tal como - ClustalW, BLAST, FASTA o Smith-Waterman.

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

Una "célula vegetal" se refiere a una unidad estructural y fisiológica de una planta. La célula vegetal puede estar en la forma de un protoplasto sin una pared celular, una sola célula aislada o una célula en cultivo, o como una parte de una unidad más organizada, tal como pero sin limitarse a, un tejido vegetal, un órgano de una planta, o una planta completa.

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

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

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

El término "reducir" o "reducido" como se usa en la presente descripción, se refiere a una reducción de aproximadamente 10 % a aproximadamente 99 %, de aproximadamente 10 % a aproximadamente 95 % o menos, de aproximadamente 10 % a aproximadamente 90 % o menos o una reducción de al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o al menos 100 % o más de una cantidad o una actividad, tal como pero no se limitan a la actividad de un polipéptido, la actividad transcripcional y/o la expresión de proteínas.

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

El término "aumentar" o "aumentado" como se usa en la presente descripción, se refiere a un aumento desde aproximadamente 10 % hasta aproximadamente 99 %, o un aumento de al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o al menos 100 %, 200 %, 300 %, 400 % o 500 % o más de una cantidad o una actividad, tal como pero no se limitan a la actividad de un polipéptido, la actividad transcripcional y/o la expresión de proteínas.

El término "control" en el contexto de una planta control o células vegetales controles significa una planta o células vegetales donde la expresión o actividad de una treonina sintasa no se ha modificado (por ejemplo, aumentado o reducido) y por tanto puede proporcionar una comparación con una planta en la que la expresión o actividad de la treonina sintasa se ha modificado. La planta control puede comprender un vector vacío. La planta control puede corresponder a una planta de tipo silvestre.

Descripción detallada

En un aspecto, se proporciona un polinucleótido aislado que comprende, que consiste o que consiste esencialmente

en una secuencia de polinucleótido y que tiene al menos 60 % de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias descritas en la presente descripción, que incluyen cualquiera de los polinucleótidos mostrados en el listado de secuencias. De manera adecuada, el polinucleótido aislado comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que tiene al menos 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con él.

En una modalidad, se proporciona un polinucleótido aislado que comprende, que consiste o que consiste esencialmente en una secuencia de polinucleótido que codifica una treonina sintasa y que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la sec. con núm. de ident.:1, la sec. con núm. de ident.: 2 y/o la sec. con núm. de ident.: 3. De manera adecuada, los polinucleótidos aislados comprenden, consisten o consisten esencialmente en una secuencia que tiene al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la sec. con núm. de ident.:1, la sec. con núm. de ident.:2 o la sec. con núm. de ident.:3. La sec. con núm. de ident.: 1 es una secuencia de ADN de treonina sintasa de *N. tabacum*. La sec. con núm. de ident.:2 es una secuencia de ADN de treonina sintasa amplificada mediante PCR con transcriptasa inversa (RT) a partir del ARN aislado de *N. tabacum* (variedad Hicks Broad Leaf) y secuenciada. Esta secuencia está presente en uno de los dos ancestros de *N. tabacum*, *Nicotiana sylvestris*, como se demuestra mediante análisis por RT-PCR. La sec. con núm. de ident.:3 es una secuencia de ADN de treonina sintasa amplificada mediante RT-PCR a partir de un ARN aislado de *N. tabacum* (variedad Hicks Broad Leaf).

En otra modalidad, se proporciona un polinucleótido aislado que comprende, que consiste o que consiste esencialmente en una secuencia de polinucleótido que tiene al menos 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la sec. con núm. de ident.:4 o la sec. con núm. de ident.: 5. La sec. con núm. de ident.:4 corresponde a la secuencia de ADN genómico de la sec. con núm. de ident.:3. En comparación con la sec. con núm. de ident.:1 el intrón de 137 pb se ubica en la posición 234 a partir del codón de iniciación ATG. La sec. con núm. de ident.:5 corresponde a la secuencia de ADN genómico de treonina sintasa de *N. tomentosiformis*.

En otra modalidad, se proporciona un polinucleótido aislado que comprende, que consiste o que consiste esencialmente en una secuencia de polinucleótidos que codifica una treonina sintasa y que tiene al menos 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 % o 90 % de identidad de secuencia con la sec. con núm. de ident.:20. De manera adecuada, los polinucleótidos aislados comprenden, consisten o consisten esencialmente en una secuencia que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la sec. con núm. de ident.:20. La sec. con núm. de ident.: 20 es una secuencia de ADN de treonina sintasa de *N. tabacum* y tiene un 85 % de identidad de secuencia con la sec. con núm. de ident. núm.1, un 86 % de identidad de secuencia con la sec. con núm. de ident. núm.2, y un 86 % de identidad de secuencia con la sec. con núm. de ident. núm.3.

El término "polinucleótido de NtTS" se refiere a polinucleótidos que codifican treonina sintasas de *Nicotiana tabacum* que comprenden, que consisten o que consisten esencialmente en polinucleótidos con homología sustancial (es decir, similitud de secuencias) o identidad sustancial con la sec. con núm. de ident.:1, la sec. con núm. de ident.:2, la sec. con núm. de ident.:3, la sec. con núm. de ident.:4, la sec. con núm. de ident.:5 o la sec. con núm. de ident.:20; fragmentos del polinucleótido de NtTS que incluyen fragmentos de la sec. con núm. de ident.:1, la sec. con núm. de ident.:2, la sec. con núm. de ident.:3, la sec. con núm. de ident.:4, la sec. con núm. de ident.:5 o la sec. con núm. de ident.:20; y fragmentos de la sec. con núm. de ident.:1, la sec. con núm. de ident.:2, la sec. con núm. de ident.:3, la sec. con núm. de ident.:4, la sec. con núm. de ident.:5 o la sec. con núm. de ident.:20 con homología sustancial (es decir, similitud de secuencias) o identidad sustancial con ellas que tienen al menos aproximadamente 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % o 100 % de identidad de secuencia con los fragmentos correspondientes de la sec. con núm. de ident.:1, la sec. con núm. de ident.:2, la sec. con núm. de ident.:3, la sec. con núm. de ident.:4, la sec. con núm. de ident.:5 o la sec. con núm. de ident.:20. En las secs. con núms. de ident. 9 a la 19 se exponen fragmentos ilustrativos. Como se describe en la presente, la variante puede tener al menos aproximadamente 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.:1, la sec. con núm. de ident.:2, la sec. con núm. de ident.:3, la sec. con núm. de ident.:4, la sec. con núm. de ident.:5 o la sec. con núm. de ident.:20. El polinucleótido de NtTS incluye además secuencias que comprenden un grado de identidad o similitud suficiente o sustancial con la sec. con núm. de ident.:1, la sec. con núm. de ident.:2, la sec. con núm. de ident.:3, la sec. con núm. de ident.:4, la sec. con núm. de ident.:5 o la sec. con núm. de ident.:20 para codificar un polipéptido que funcione como una treonina sintasa. En una modalidad, el término "polinucleótido de NtTS" se refiere a un polímero de nucleótidos que comprende, consiste o consiste esencialmente en un polinucleótido diseñado en la presente como la sec. con núm. de ident.:1, la sec. con núm. de ident.:2, la sec. con núm. de ident.:3, la sec. con núm. de ident.:4, la sec. con núm. de ident.:5 o la sec. con núm. de ident.:20.

El término "polinucleótido" se refiere a un polímero de nucleótidos, que puede ser ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN) modificados o no. En consecuencia, un polinucleótido puede ser, sin limitación, un ADN genómico, ADN complementario (ADNc), ARNm, o ARN antisentido o un fragmento(s) de estos. Además, un

polinucleótido puede ser ADN de una sola cadena o de doble cadena, ADN que es una mezcla de regiones de una sola cadena y de doble cadena, una molécula híbrida que comprende ADN y ARN, o una molécula híbrida con una mezcla de regiones de una sola cadena y de doble cadena o un fragmento(s) de estas.

5 Un polinucleótido como se describe en la presente descripción generalmente contendrá enlaces fosfodiéster, aunque en algunos casos se incluyen análogos de polinucleótidos que pueden tener cadenas principales alternas, que comprenden, por ejemplo, fosforamidato, fosforotioato, fosforoditioato, o enlaces O-metilfosforoamidita; y cadenas principales y enlaces de polinucleótidos peptídicos. Otros polinucleótidos análogos incluyen los que tienen cadenas principales positivas; cadenas principales no iónicas, y cadenas principales sin ribosa. Las modificaciones de la  
10 cadena principal de ribosa-fosfato pueden realizarse por una variedad de razones, por ejemplo, para aumentar la estabilidad y el tiempo de vida media de tales moléculas en ambientes fisiológicos o como sondas en un biochip. Pueden obtenerse mezclas de polinucleótidos y análogos de origen natural; alternativamente, pueden obtenerse mezclas de diferentes análogos de polinucleótidos, y mezclas de polinucleótidos y análogos de origen natural.

15 Se conoce una variedad de análogos de polinucleótidos, que incluyen, por ejemplo, enlaces fosforamidato, fosforotioato, fosforoditioato, O-metilfosforoamidita y cadenas principales y enlaces de polinucleótidos péptidos. Otros polinucleótidos análogos incluyen los que tienen cadenas principales positivas, cadenas principales no iónicas y cadenas principales sin ribosa. Se incluyen además polinucleótidos que contienen uno o más azúcares carboxílicos.

20 Otros análogos incluyen polinucleótidos péptidos (PNA) que son análogos de polinucleótidos péptidos. Estas cadenas principales son esencialmente no iónicas en condiciones neutras, a diferencia de la cadena principal de fosfodiéster altamente cargada de los polinucleótidos de origen natural. Esto puede resultar en ventajas. En primer lugar, la cadena principal de PNA puede mostrar una mejor cinética de hibridación. Los PNA tienen cambios más  
25 grandes en la temperatura de fusión ( $T_m$ ) para los pares de bases con error de apareamiento vs. los apareados perfectamente. El ADN y el ARN típicamente muestran una caída de 2-4 °C en la  $T_m$  durante un error de apareamiento interno. Con la cadena principal de PNA no iónica, la caída es cercana a 7-9 °C. Similarmente, debido a su naturaleza no iónica, la hibridación de las bases unidas a estas cadenas principales es relativamente insensible a la concentración de sales. Adicionalmente, los PNA no deben degradarse o se degradan en una menor extensión  
30 por las enzimas celulares, y así pueden ser más estables.

Entre los usos de los polinucleótidos descritos, y combinaciones de fragmentos de estos, está el uso de fragmentos como sondas en ensayos de hibridación de ácidos nucleicos o cebadores en ensayos de amplificación de ácidos nucleicos. Tales fragmentos generalmente comprenden al menos aproximadamente 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17,  
35 18, 19 o 20 o más nucleótidos contiguos de una secuencia de ADN. En otras modalidades, un fragmento de ADN comprende al menos aproximadamente 10, 15, 20, 30, 40, 50 o 60 o más nucleótidos contiguos de una secuencia de ADN. Así, en un aspecto, se proporciona además un método para detectar polinucleótidos de NtTS que comprende el uso de las sondas y/o los cebadores. Los cebadores ilustrativos se exponen en las sec. con núm. de ident.: 10 a 14. Opcionalmente, dichos cebadores pueden usarse como sondas. Los cebadores o sondas ilustrativos pueden  
40 hibridar con regiones que son homólogas entre las secs. con núms. de ident.: 1, 2 y 3 o la sec. con núm. de ident.:20. Los cebadores o sondas ilustrativos pueden hibridar con los nucleótidos 1-46 de las secs. con núms. de ident.: 1, 2 y 3; con los nucleótidos 1-52 de la sec. con núm. de ident.:20; con los nucleótidos 99-141 de la sec. con núm. de ident.:1; con los nucleótidos 102-144 de la sec. con núm. de ident.: 2 y la sec. con núm. de ident.:3; con los nucleótidos 102-153 de la sec. con núm. de ident.:20; con los nucleótidos 1325-1362 de las secs. con núms. de  
45 ident.: 1, 2 y 3; o con los nucleótidos 1334-1371 de la sec. con núm. de ident.:20.

Los parámetros básicos que afectan la elección de las condiciones de hibridación y la guía para proyectar las condiciones adecuadas se describen por Sambrook, J., E. F. Fritsch, y T. Maniatis (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.). Con el uso del conocimiento  
50 del código genético en combinación con las secuencias de aminoácidos descritas en la presente descripción, pueden prepararse conjuntos de oligonucleótidos degenerados. Tales oligonucleótidos son útiles como cebadores, por ejemplo, en las reacciones en cadena de la polimerasas (PCR), en donde los fragmentos de ADN se aíslan y se amplifican. En ciertas modalidades, pueden usarse cebadores degenerados como sondas para las genotecas. Tales genotecas incluirían pero no se limitan a genotecas de ADNc, genotecas genómicas, e incluso genotecas de ADN o EST (etiquetas de secuencias de expresión) electrónicas. Las secuencias homólogas identificadas por este método  
55 podrían usarse después como sondas para identificar homólogos de las secuencias de NtTS identificadas en la presente descripción.

Además, son de uso potencial los polinucleótidos y oligonucleótidos (por ejemplo, cebadores o sondas) que hibridan  
60 en condiciones de rigurosidad reducidas, típicamente condiciones moderadamente rigurosas, y comúnmente condiciones altamente rigurosas para el(los) polinucleótido(s) de NtTS como se describe en la presente descripción. *Los parámetros básicos que afectan la elección de las condiciones de hibridación y la guía para proyectar las condiciones adecuadas se describen por Sambrook y otros* (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor N.Y.) y pueden determinarse fácilmente por los expertos en la técnica en base a, por ejemplo, la  
65 longitud o la composición de bases del polinucleótido.



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

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

Las construcciones recombinantes proporcionadas en la presente pueden usarse para transformar plantas o células vegetales con el objetivo de modular los niveles de expresión o actividad de proteínas de NtTS. Una construcción de polinucleótidos recombinante puede comprender un polinucleótido que codifica un polinucleótido de NtTS como se describe en la presente, unido operativamente a una región reguladora adecuada para expresar el polipéptido de NtTS en la planta o célula. Así, un polinucleótido puede comprender una secuencia codificante que codifica el polipéptido de NtTS como se describe en la presente descripción.

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

Se proporcionan, además, vectores que contienen construcciones de polinucleótidos recombinantes tales como los descritos en la presente descripción. Las cadenas principales adecuadas del vector incluyen, por ejemplo, las usadas habitualmente en la técnica tal como plásmidos, virus, cromosomas artificiales, BAC, YAC o PAC. Los vectores de expresión adecuados incluyen, sin limitarse a, plásmidos y vectores virales derivados de, por ejemplo, bacteriófago, baculovirus, y retrovirus. Numerosos vectores y sistemas de expresión están disponibles comercialmente.

Los vectores pueden incluir además, por ejemplo, orígenes de replicación, regiones de unión de supercántigos (SARs) o marcadores. Un gen marcador puede conferir un fenotipo seleccionable en una célula vegetal. Por ejemplo, un marcador puede conferir resistencia a biocidas, tal como resistencia a un antibiótico (por ejemplo, canamicina, G418, bleomicina, o higromicina), o un herbicida (por ejemplo, glifosato, clorosulfuron o fosfinotricina).

Adicionalmente, un vector de expresión puede incluir una secuencia etiqueta diseñada para facilitar la manipulación o detección (por ejemplo, purificación o localización) del polipéptido expresado. Las secuencias etiquetas, tales como luciferasa, beta-glucuronidasa (GUS), proteína fluorescente verde (GFP), glutatión S-transferasa (GST), polihistidina, secuencias c-myc o hemaglutinina típicamente se expresan como una fusión con el polipéptido codificado. Tales etiquetas pueden insertarse en cualquier lugar dentro del polipéptido, que incluye lo mismo en el carboxilo terminal como en el amino terminal.

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

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

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

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

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

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

Los promotores específicos de hojas adecuados incluyen el promotor de piruvato, ortofosfato diquinasa (PPDK) de plantas C4 (maíz), promotor cab-m1Ca<sup>2+</sup> del maíz, el promotor del gen relacionado con myb de *Arabidopsis thaliana*

(Atmyb5), los promotores de ribulosa bifosfato carboxilasa (RBCS) (por ejemplo, los genes de tomate RBCS 1, RBCS2 y RBCS3A expresados en hojas y plántulas cultivadas a la luz, RBCS1 y RBCS2 expresados en frutos de tomate en desarrollo o el promotor de ribulosa bisfosfato carboxilasa expresado casi exclusivamente en células del mesófilo en las láminas y las vainas foliares en niveles altos).

Los promotores adecuados específicos de la senescencia incluyen un promotor de tomate activo durante la maduración de los frutos, la senescencia y la escisión de las hojas, un promotor de maíz del gen que codifica una cisteína proteasa. Pueden usarse promotores específicos de anteras adecuados. Los promotores adecuados con preferencia por la raíz conocidos por los expertos en la técnica pueden seleccionarse. Los promotores adecuados con preferencia por las semillas incluyen tanto los promotores específicos de semillas (los promotores activos durante el desarrollo de la semilla tales como los promotores de proteínas de almacenamiento en semillas) y promotores de la germinación de semillas (los promotores activos durante la germinación de semillas). Tales promotores con preferencia por las semillas incluyen, pero no se limitan a, Cim1 (mensaje inducido por citoquinina); cZ19B1 (zeína de 19 kDa de maíz); milps (mio-inositol-1-fosfato sintasa); mZE40-2, conocido además como Zm-40; nuclc; y celA (celulosa sintasa). Gamma-zeína es un promotor específico del endospermo. Glob-1 es un promotor específico del embrión. Para las dicotiledóneas, los promotores específicos de semillas incluyen, pero no se limitan a, beta-faseolina de frijol, napin,  $\beta$ -conglucina, lectina de frijol de soja, cruciferina, y similares. Para las monocotiledóneas, los promotores específicos de semillas incluyen, pero no se limitan a, un promotor de zeína de 15 kDa de maíz, un promotor de zeína de 22 kDa, un promotor de zeína de 27 kDa, un promotor de g-zeína, un promotor de  $\gamma$ -zeína de 27 kDa (tal como el promotor gzw64A, ver número de acceso al banco de genes S78780), un promotor ceroso, un promotor encogido 1, un promotor encogido 2, un promotor de globulina 1 (ver el número de acceso al banco de genes L22344), un promotor ltp2, promotor cim1, promotores de maíz end1 y end2, promotor nuc1, promotor Zm40, eep1 y eep2; promotor lec1, tioredoxina H; promotor mliip15, promotor PCNA2; y el promotor encogido-2.

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

Adicionalmente a los promotores de plantas, otros promotores adecuados pueden derivar de un origen bacteriano por ejemplo, el promotor de octopina sintasa, el promotor de nopalina sintasa y otros promotores derivados de plásmidos Ti), o pueden derivar de promotores virales (por ejemplo, promotores de ARN 35S y 19S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), promotores constitutivos del virus del mosaico del tabaco, promotores 19S y 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), o el promotor 35S del virus del mosaico de la celedonia).

El término "polipéptido de NtTS" se refiere a un polipéptido que codifica una treonina sintasa de *Nicotiana tabacum* e incluye polipéptidos que comprenden, que consisten o que consisten esencialmente en una secuencia de aminoácidos codificada por un polinucleótido con al menos aproximadamente 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la sec. con núm. de ident.:1, la sec. con núm. de ident.:2 o la sec. con núm. de ident.:3, o un polinucleótido con al menos aproximadamente 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la sec. con núm. de ident.:4, la sec. con núm. de ident.:5 o la sec. con núm. de ident.:20; fragmentos del polinucleótido de NtTS de la sec. con núm. de ident.:1, la sec. con núm. de ident.:2, la sec. con núm. de ident.:3, la sec. con núm. de ident.:4, la sec. con núm. de ident.:5 o la sec. con núm. de ident.:20; y fragmentos de la sec. con núm. de ident.:1, la sec. con núm. de ident.:2, la sec. con núm. de ident.:3, la sec. con núm. de ident.:4, la sec. con núm. de ident.:5 o la sec. con núm. de ident.:20 que tienen al menos aproximadamente 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con los fragmentos correspondientes de la sec. con núm. de ident.:1, la sec. con núm. de ident.:2, la sec. con núm. de ident.:3, la sec. con núm. de ident.:4, la sec. con núm. de ident.:5 o la sec. con núm. de ident.:20. En las secs. con núms. de ident. 9 a la 19 se exponen fragmentos ilustrativos. Los polipéptidos de NtTS incluyen, además, secuencias que comprenden un grado de identidad o similitud suficiente o sustancial con la sec. con núm. de ident.:6, la sec. con núm. de ident.:7 o la sec. con núm. de ident.:8 para funcionar como una treonina sintasa e incluyen secuencias con al menos 95 % de identidad de secuencia con la sec. con núm. de ident.:6, la sec. con núm. de ident.:7, la sec. con núm. de ident.:8 o la sec. con núm. de ident.:21. La sec. con núm. de ident.: 6 es la secuencia traducida de la sec. con núm. de ident.: 1. La sec. con núm. de ident.:7 es la secuencia traducida de la sec. con núm. de ident.: 2. La sec. con núm. de ident.:8 es la secuencia traducida de la sec. con núm. de ident.: 3. La sec. con núm. de ident.:21 es la secuencia traducida de la sec. con núm. de ident.:20 y tiene 89 % de identidad de secuencia con la sec. con núm. de ident.:7, la sec. con núm. de ident.:8 o la sec. con núm. de ident.:9.

En una modalidad, los fragmentos de los polipéptidos de NtTS retienen actividad treonina sintasa. Los polipéptidos de NtTS incluyen, además, variantes y mutantes producidos al introducir cualquier tipo de alteraciones (por ejemplo, inserciones, deleciones, o sustituciones de aminoácidos; cambios en los estados de glicosilación; cambios que afectan el repliegamiento o las isomerizaciones, las estructuras tridimensionales o los estados de autoasociación),

los que pueden diseñarse deliberadamente o aislarse de manera natural siempre que funcionen como una treonina sintasa. Los polipéptidos de NtTS pueden estar en forma lineal o cíclica con el uso de métodos conocidos. El término "polipéptido de NtTS" puede referirse a un polipéptido que comprende, que consiste o que consiste esencialmente en la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.:6, la sec. con núm. de ident.: 7, la sec. con núm. de ident.: 8 o la sec. con núm. de ident.: 21.

En otro aspecto, se proporciona un polipéptido aislado que comprende, que consiste o que consiste esencialmente en una secuencia de polipéptido que tiene al menos 60 % de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias descritas en la presente, que incluyen cualquiera de los polipéptidos mostrados en el listado de secuencias. De manera adecuada, los polipéptidos aislados comprenden, consisten o consisten esencialmente en una secuencia que tiene al menos 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con él.

Los polipéptidos de NtTS incluyen variantes producidas al introducir cualquier tipo de alteraciones (por ejemplo, inserciones, deleciones, o sustituciones de aminoácidos; cambios en estados de glicosilación; cambios que afectan el repliegamiento o isomerizaciones, estructuras tridimensionales, o estados de autoasociación), las que pueden diseñarse deliberadamente o aislarse de manera natural. La variante puede tener alteraciones que producen un cambio silente y resultan en una proteína funcionalmente equivalente. Las sustituciones de aminoácidos deliberadas pueden producirse sobre la base de la similitud en polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad y/o la naturaleza anfipática de los residuos mientras se retenga la actividad de unión secundaria de la sustancia. Por ejemplo, los aminoácidos cargados negativamente incluyen ácido aspártico y ácido glutámico; los aminoácidos cargados positivamente incluyen lisina y arginina; y los aminoácidos con grupos principales polares no cargados que tienen valores de hidrofiliidad similar incluyen leucina, isoleucina, valina, glicina, alanina, asparagina, glutamina, serina, treonina, fenilalanina, y tirosina. Las sustituciones conservadoras pueden realizarse, por ejemplo de conformidad con la Tabla más abajo. Los aminoácidos en el mismo bloque en la segunda columna y preferentemente en la misma línea en la tercera columna pueden sustituirse entre sí:

ALIFÁTICO	No polar	Gly Ala Pro Ile Leu Val
	Polar - no cargado	Cys Ser Thr Met Asn Gly
	Polar - cargado	Asp Glu Lys Arg
AROMÁTICO		His Phe Trp Tyr

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

En una modalidad, se proporciona un polipéptido aislado codificado por cualquiera de los polinucleótidos que comprenden, que consisten o que consisten esencialmente en una secuencia que codifica una treonina sintasa y que tiene al menos 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la sec. con núm. de ident. núm. 1, la sec. con núm. de ident. núm. 2 o la sec. con núm. de ident. núm. 3, o por cualquiera de los polinucleótidos que comprenden, que consisten o que consisten esencialmente en una secuencia que tiene al menos 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 100 % de identidad de secuencia con la sec. con núm. de ident. núm. 4, la sec. con núm. de ident. núm. 5 o la sec. con núm. de ident.:20.

En otra modalidad, se proporciona un polipéptido aislado que codifica una treonina sintasa y que comprende, que consiste o que consiste esencialmente en una secuencia polipeptídica que tiene al menos 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 6, la sec. con núm. de ident.: 7, la sec. con núm. de ident.:8 o la sec. con núm. de ident.: 21.

En otra modalidad, se proporciona un polipéptido aislado que codifica una treonina sintasa y que comprende, que consiste o que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 6, la sec. con núm. de ident.: 7, la sec. con núm. de ident.:8 o la sec. con núm. de ident.: 21.

En la presente también se describen fragmentos de las secuencias polipeptídicas, convenientemente, tales fragmentos retienen actividad treonina sintasa.

Pueden usarse variantes polipeptídicas mutantes para crear plantas mutantes, plantas de origen no natural, o plantas transgénicas que comprenden el polipéptido de NtTS mutante. De manera adecuada, el polipéptido de NtTS mutante retiene la actividad treonina sintasa.

5 Un polipéptido puede prepararse al cultivar células huéspedes transformadas o recombinantes bajo condiciones de cultivo adecuadas para expresar un polipéptido. El polipéptido expresado resultante puede purificarse después a partir de tal cultivo con el uso de procesos de purificación conocidos. La purificación del polipéptido puede incluir una columna de afinidad que contiene agentes que unirán al polipéptido; una o más etapas de columna sobre tales resinas de afinidad; una o más etapas que implican cromatografía con interacciones hidrofóbicas; o cromatografía de inmutafinidad. Alternativamente, el polipéptido puede expresarse, además, en una forma que facilitará la purificación. Por ejemplo, puede expresarse como un polipéptido de fusión, tal como el polipéptido de unión a maltosa (MBP), glutatión-5-transferasa (GST) o tioredoxina (TRX). Los kits para la expresión y purificación de polipéptidos de fusión están disponibles comercialmente. El polipéptido puede etiquetarse con un epítopo y posteriormente purificarse mediante el uso de un anticuerpo específico dirigido a tal epítopo. Una o más etapas de cromatografía líquida – tal como cromatografía líquida de alto rendimiento en fase reversa pueden emplearse para purificar más aún el polipéptido. Algunas o todas las etapas de purificación anteriores, en varias combinaciones, pueden emplearse para proporcionar un polipéptido recombinante esencialmente homogéneo. El polipéptido así purificado puede estar esencialmente libre de otros polipéptidos y en la presente descripción se define como un "polipéptido esencialmente purificado"; tales polipéptidos purificados incluyen polipéptidos, fragmentos, variantes de NtTS, y similares. La expresión, aislamiento, y purificación de los polipéptidos y fragmentos pueden llevarse a cabo mediante cualquier técnica adecuada, que incluye pero no se limita a los métodos descritos en la presente descripción.

25 Es posible además utilizar una columna de afinidad tal como un anticuerpo monoclonal generado contra los polipéptidos, para purificar por afinidad los polipéptidos expresados. Estos polipéptidos pueden retirarse de una columna de afinidad con el uso de técnicas convencionales, por ejemplo, en un tampón de elución con alto contenido de sales y después separar mediante diálisis en un tampón con bajo contenido de sales para el uso o al cambiar el pH u otros componentes en dependencia de la matriz de afinidad utilizada, o retirarse de manera competitiva con el uso del sustrato de origen natural del motivo de afinidad.

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

40 El término 'de origen no natural' como se usa en la presente describe una entidad (por ejemplo, un polinucleótido, una mutación genética, un polipéptido, una planta, una célula vegetal y material vegetal) que no se forma naturalmente o que no existe en la naturaleza. Tales entidades de origen no natural o entidades artificiales pueden obtenerse, sintetizarse, iniciarse, modificarse, intervenir, o manipularse mediante métodos descritos en la presente descripción o que se conocen en la técnica. Así, a manera de ejemplo, una planta de origen no natural, una célula vegetal de origen no natural o material vegetal de origen no natural puede producirse con el uso de técnicas tradicionales de mejoramiento de plantas - tales como retrocruzamiento - o mediante tecnologías de manipulación genética - tales como ARN antisentido, ARN de interferencia, meganucleasa y similares. A modo de ejemplo adicional, una planta de origen no natural, una célula vegetal de origen no natural o material vegetal de origen no natural puede producirse mediante introgresión de, o al transferir una o más mutaciones genéticas (por ejemplo uno o más polimorfismos) a partir de una primera planta o célula vegetal dentro de una segunda planta o célula vegetal (la cual puede ser en sí misma de origen natural), de manera que la planta, célula vegetal o material vegetal resultantes o la progenie de estas comprende una constitución genética (por ejemplo, un genoma, un cromosoma o un segmento de estos) que no se forma naturalmente o que no existe en la naturaleza. Así, la planta, célula vegetal o material vegetal resultantes son artificiales o de origen no natural. En consecuencia, una planta o célula vegetal artificial o de origen no natural puede producirse al modificar una secuencia genética en una primera planta o célula vegetal de origen natural, incluso si la secuencia genética resultante se produce naturalmente en una segunda planta o célula vegetal que comprende un fondo genético diferente de la primera planta o célula vegetal. Las diferencias en el fondo genético pueden detectarse mediante diferencias fenotípicas o mediante técnicas de biología molecular conocidas en la técnica - tales como secuenciación de ácidos nucleicos, presencia o ausencia de marcadores genéticos (por ejemplo, marcadores de ARN de microsátélites).

60 En otra modalidad, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos que son inmunorreactivos con los polipéptidos de NtTS. Los polipéptidos de NtTS, fragmentos, variantes, polipéptidos de fusión, y similares, como que se expone en la presente descripción, pueden emplearse como "inmunógenos" en la producción de anticuerpos inmunorreactivos con ellos. Tales anticuerpos pueden unirse específicamente a los polipéptidos de NtTS mediante los sitios de unión al antígeno del anticuerpo. Los anticuerpos de unión específica son los que reconocerán específicamente y se unirán con polipéptidos de la familia de NtTS, homólogos y variantes, pero no con otras moléculas. En una modalidad, los anticuerpos son específicos para polipéptidos que tienen una secuencia de

aminoácidos de NtTS como se expone en la presente descripción y no reaccionan de manera cruzada con otros polipéptidos.

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

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

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

Las composiciones que pueden reducir la expresión o la actividad de la treonina sintasa incluyen, pero no se limitan a, polinucleótidos de secuencia específica que pueden interferir con la transcripción de uno o más genes endógenos de treonina sintasa; polinucleótidos de secuencia específica que pueden interferir con la traducción de transcritos de ARN de la treonina sintasa (por ejemplo, ARN bicatenarios, microARN, ARNip, ribozimas); polipéptidos de secuencia específica que pueden interferir con la estabilidad de las proteínas de treonina sintasa; polinucleótidos de secuencia específica que pueden interferir con la actividad enzimática de la proteína de treonina sintasa o la actividad de unión de la proteína de treonina sintasa con respecto a los sustratos o las proteínas reguladoras; anticuerpos que muestran especificidad para la proteína de treonina sintasa; compuestos moleculares pequeños que pueden interferir con la estabilidad de la proteína de treonina sintasa o la actividad enzimática de la proteína de treonina sintasa o la actividad de unión de la proteína de treonina sintasa; proteínas con dedos de zinc que se unen a un polinucleótido de treonina sintasa; y meganucleasas que tienen actividad hacia un polinucleótido de treonina sintasa.

La tecnología antisentido es un método bien conocido que puede usarse para modular (por ejemplo, reducir o inhibir) la expresión de un polipéptido de NtTS. Un polinucleótido del gen de NtTS a reprimir se clona y se une operativamente a una región reguladora y una secuencia de terminación de la transcripción de manera que la cadena de ARN antisentido se transcribe. La construcción recombinante se transforma después en las plantas y se produce la cadena de ARN antisentido. No es necesario que el polinucleótido tenga la secuencia completa del gen que se va a reprimir, pero típicamente será esencialmente complementario a al menos una parte de la cadena sentido del gen que se va a reprimir (independientemente de si está en la región codificante o no codificante).

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

En una modalidad, los polinucleótidos de secuencia específica que pueden interferir con la traducción de transcrito(s) de ARN de la treonina sintasa es un ARNi. La interferencia por ARN ("ARNi") o el silenciamiento por ARN es un proceso conservado evolutivamente mediante el cual los ARNm específicos pueden ser dirigidos a la degradación enzimática. Un ARN de doble cadena (ARN bicatenario) debe introducirse o se produce por una célula (por ejemplo, virus de ARN bicatenario, o polinucleótidos de ARNi de NtTS) para iniciar la vía del ARNi. El ARN bicatenario puede convertirse en múltiples híbridos de ARNip de 21-23 pb de longitud ("ARNip") por las RNasas III, que son endonucleasas específicas de ARN bicatenario ("Dicer"). Los ARNip pueden reconocerse posteriormente mediante complejos de silenciamiento inducidos por ARN ("RISC") que promueven el desenrollamiento de ARNip a través de un proceso dependiente de ATP. La cadena antisentido desenrollada del ARNip guía al RISC activado hacia el ARNm objetivo (por ejemplo, variantes de ARN de NtTS) que comprende una secuencia complementaria a la cadena antisentido del ARNip. El ARNm objetivo y la cadena antisentido pueden formar una hélice en forma A, y el surco mayor de la hélice en forma A puede ser reconocido por los RISC activados. El ARNm objetivo puede escindirse mediante el RISC activado en un sitio único definido por el sitio de unión del extremo 5' de la cadena del ARNip. El RISC activado puede reciclarse para catalizar otro evento de escisión.

Los vectores de expresión de ARNi para NtTS pueden comprender construcciones de ARNi para NtTS que codifican polinucleótidos de ARNi para NtTS que muestran actividad de interferencia del ARN mediante la reducción del nivel de expresión de los ARNm de NtTS, pre-ARNm de NtTS, o variantes relacionadas de ARN de NtTS. Los vectores de expresión pueden comprender un promotor ubicado aguas arriba y unido operativamente a una construcción de ARNi de NtTS, como se describe adicionalmente en la presente descripción. Los vectores de expresión de ARNi de NtTS pueden comprender un promotor mínimo adecuado, una construcción de ARNi de NtTS de interés, una región reguladora hacia el extremo (5'), una región reguladora hacia el extremo (3'), que incluye señales de terminación de la transcripción y poliadenilación, y otras secuencias conocidas para los expertos en la técnica, tales como varios marcadores de selección.

Los polinucleótidos de NtTS pueden producirse en varias formas, que incluyen estructuras de doble cadena (es decir, una molécula de ARN bicatenario que comprende una cadena antisentido y una cadena sentido complementaria), estructuras de doble cadena similar a horquilla ("dsRNAi"), o estructuras de una sola cadena (es decir, una molécula de ARNm que comprende solo una cadena antisentido). Las estructuras pueden comprender un híbrido, híbrido asimétrico, horquilla o estructura secundaria de horquilla asimétrica, que tiene cadenas sentido y antisentido autocomplementarias. Los dsARNi de NtTS pueden convertirse enzimáticamente a ARNip de NtTS bicatenarios. Una de las cadenas del híbrido de ARNip de NtTS puede hibridar con una secuencia complementaria dentro del ARNm de NtTS objetivo y variantes de ARN de NtTS relacionadas. Los híbridos de ARNip/ARNm son reconocidos por el RISC que puede escindir los ARN de NtTS en múltiples sitios de una manera dependiente de la secuencia, lo que da como resultado la degradación del ARNm de NtTS objetivo y variantes relacionadas del ARN de NtTS.

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

El uso de moléculas de ARN en horquilla pequeña (shARN) también se contempla en la presente descripción y comprenden una secuencia antisentido específica además de la secuencia complementaria (sentido) inversa, típicamente separadas por un espaciador o secuencia en lazo. La escisión del espaciador o lazo proporciona una molécula de ARN de una sola cadena y su complemento inverso, de manera que pueden hibridar para formar una molécula de ARN bicatenario (opcionalmente con etapas de procesamiento adicionales que pueden resultar en la adición o eliminación de uno, dos, tres o más nucleótidos a partir del extremo 3' o el extremo 5' de cualquiera de las cadenas o ambas). El espaciador puede ser de una longitud suficiente para permitir que las secuencias antisentido y sentido hibriden y formen una estructura de doble cadena (o tallo) antes de la escisión del espaciador (y, opcionalmente, etapas de procesamiento posteriores que pueden resultar en la adición o eliminación de uno, dos, tres, cuatro, o más nucleótidos a partir del extremo 3' o el extremo 5' de cualquiera de las cadenas o de ambas). La secuencia del espaciador típicamente es una secuencia de nucleótidos no relacionada que se sitúa entre dos regiones complementarias de secuencias de nucleótidos las cuales, cuando hibridan en un polinucleótido de doble cadena, comprenden un pequeño shARN en horquilla. La secuencia del espaciador generalmente comprende entre aproximadamente 3 y aproximadamente 100 nucleótidos.

Cualquier polinucleótido de ARN de NtTS de interés puede producirse al seleccionar una adecuada composición de secuencias, tamaño del lazo, y longitud del tallo para producir el híbrido en horquilla de NtTS. Un rango adecuado para diseñar las longitudes del tallo de un híbrido en horquilla, incluye las longitudes del tallo de al menos aproximadamente 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleótidos – tal como aproximadamente 14-30 nucleótidos, aproximadamente 30-50 nucleótidos, aproximadamente 50-100 nucleótidos, aproximadamente 100-150 nucleótidos, aproximadamente 150-200 nucleótidos, aproximadamente 200-300 nucleótidos, aproximadamente 300-

400 nucleótidos, aproximadamente 400-500 nucleótidos, aproximadamente 500-600 nucleótidos, y aproximadamente 600-700 nucleótidos. Un rango adecuado para diseñar las longitudes del lazo de un híbrido en horquilla, incluye las longitudes del lazo de aproximadamente 4-25 nucleótidos, aproximadamente 25-50 nucleótidos, o más largas si la longitud del tallo del híbrido en horquilla es sustancial. En ciertas modalidades, una molécula de ARN bicatenario (ARNbc) o de ARN monocatenario (ARNmc) es de entre aproximadamente 15 y aproximadamente 40 nucleótidos de longitud. En otra modalidad, la molécula de ARNip de interferencia pequeño es una molécula de ARNbc bicatenario o un ARNmc entre aproximadamente 15 y aproximadamente 35 nucleótidos de longitud. En otra modalidad, la molécula de ARNip de interferencia pequeño es una molécula de ARNbc bicatenario o un ARNmc entre aproximadamente 17 y aproximadamente 30 nucleótidos de longitud. En otra modalidad, la molécula de ARNip de interferencia pequeño es una molécula de ARNbc bicatenario o un ARNmc entre aproximadamente 19 y aproximadamente 25 nucleótidos de longitud. En otra modalidad, la molécula de ARNip de interferencia pequeño es una molécula de ARNbc bicatenario o un ARNmc entre aproximadamente 21 y aproximadamente 23 nucleótidos de longitud. En ciertas modalidades, las estructuras de horquillas con regiones híbridas más largas que 21 nucleótidos pueden promover un efectivo silenciamiento dirigido por el ARNip, independientemente de la secuencia y la longitud del bucle.

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

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

En una modalidad ilustrativa, las moléculas usadas para modular la expresión comprenden una secuencia específica (por ejemplo, una secuencia antisentido) que es complementaria a al menos 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o más nucleótidos contiguos de cualquiera de las secuencias de polinucleótidos de NiTS descritas en la presente, tal como las secs. con núms. de ident.:1 a 5 o 20.

En otra modalidad ilustrativa, las moléculas usadas para modular la expresión comprenden una secuencia (por ejemplo, una secuencia antisentido) que es complementaria a al menos 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 o más nucleótidos contiguos de los nucleótidos 1-46 de las secs. con núms. de ident.: 1, 2 y 3; los nucleótidos 1-52 de la sec. con núm. de ident.:20; los nucleótidos 99-141 de la sec. con núm. de ident.:1; los nucleótidos 102-144 de la sec. con núm. de ident.: 2 y la sec. con núm. de ident.:3; los nucleótidos 102-153 de la sec. con núm. de ident.:20; los nucleótidos 1325-1362 de las secs. con núms. de ident.: 1, 2 y 3; o los nucleótidos 1334-1371 de la sec. con núm. de ident.:20.

En otra modalidad ilustrativa, las moléculas usadas para modular la expresión comprenden una secuencia (por ejemplo, una secuencia antisentido) que es complementaria a al menos 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 o más nucleótidos contiguos de los nucleótidos 454-805 de la sec. con núm. de ident.:1, la sec. con núm. de ident.: 2 o la sec. con núm. de ident.:3 o los nucleótidos 463-814 de la sec. con núm. de ident.:20.

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



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

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

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

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

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

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

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

Otra modificación aplicable a moléculas de ARNi es el enlace químico a la molécula de ARNi de uno o más motivos o conjugados que mejoran la actividad, distribución celular, captación celular, biodisponibilidad o estabilidad de la molécula de ARNi. Los polinucleótidos pueden sintetizarse o modificarse mediante métodos bien establecidos en la técnica. Las modificaciones químicas pueden incluir, pero no se limitan a modificaciones en 2', introducción de bases

no naturales, unión covalente a un ligando, y reemplazo de enlaces fosfato con enlaces tiofosfato. En esta modalidad, la integridad de la estructura de híbrido se fortalece mediante al menos uno, y típicamente dos, enlaces químicos. La unión química puede lograrse mediante cualquiera de una variedad de técnicas bien conocidas, por ejemplo al introducir enlaces covalentes, iónicos o de hidrógeno; interacciones hidrofóbicas, interacciones de van der Waals o de apilamiento; por medio de una coordinación metal-ión, o a través del uso de análogos de purina.

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

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

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

Varias modalidades se dirigen a vectores de expresión de NtTS que comprenden uno o más polinucleótidos de NtTS o construcciones de ARNi para NtTS que comprenden uno o más polinucleótidos de NtTS.

Diversas modalidades están dirigidas a vectores de expresión que comprenden uno o más de los polinucleótidos de NtTS o una o más construcciones de ARNi de NtTS.

Varias modalidades están dirigidas a vectores de expresión que comprenden uno o más polinucleótidos de NtTS o una o más construcciones de ARNi de NtTS que codifican uno o más polinucleótidos de ARNi de NtTS capaces de autohíbrida para formar una estructura de horquilla, en la que la construcción comprende (a) uno o más de los polinucleótidos de NtTS; (b) una segunda secuencia que codifica un elemento espaciador que forma un lazo de la estructura de horquilla; y (c) una tercera secuencia que comprende una secuencia complementaria inversa a la primera secuencia, ubicada en la misma orientación que la primera secuencia, en donde la segunda secuencia se ubica entre la primera secuencia y la tercera secuencia, y la segunda secuencia está unida operativamente a la primera secuencia y a la tercera secuencia.

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

Así, varias modalidades están dirigidas a vectores de expresión de NtTS que comprenden polinucleótidos de NtTS o construcciones de ARNi de NtTS que codifican polinucleótidos de ARNi de NtTS capaces de autohíbrida, en los que la construcción comprende (a) uno o más de los polinucleótidos de NtTS descritos en la presente descripción; y (b) una segunda secuencia que comprende una secuencia complementaria (por ejemplo, complementaria inversa) a la primera secuencia, ubicada en la misma orientación que la primera secuencia.

Se proporcionan diversas composiciones y métodos para reducir los niveles de expresión endógenos de NtTS al promover la cosupresión de la expresión génica de NtTS. El fenómeno de cosupresión se produce como un resultado de introducir múltiples copias de un transgén en una célula vegetal huésped. La integración de múltiples copias de un transgén puede resultar en una expresión reducida del transgén y el gen objetivo endógeno. El grado de cosupresión depende del grado de identidad de secuencias entre el transgén y el gen objetivo endógeno. El silenciamiento tanto del gen endógeno como del transgén puede producirse por metilación extensa de los loci silenciados (es decir, el promotor endógeno y el gen endógeno de interés) que puede impedir la transcripción. Alternativamente, en algunos casos, la co-supresión del gen endógeno y el transgén puede producirse mediante

silenciamiento génico post transcripcional ("PTGS"), en el que los transcritos pueden producirse pero el aumento de las tasas de degradación impide la acumulación de transcritos. El mecanismo para la co-supresión mediante PTGS parece asemejarse a la interferencia por ARN, en que el ARN parece ser tanto un cebador importante como un objetivo en estos procesos, y puede estar mediado al menos en parte por la misma maquinaria molecular, posiblemente a través de la degradación de ARNm guiada por los ARN.

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

Diversas modalidades se dirigen a métodos para modular (por ejemplo, reducir o inhibir) el nivel de expresión de ADN de NtTS mediante la integración de múltiples copias de un polinucleótido de NtTS en un genoma de planta (de tabaco); los métodos comprenden: transformar una célula vegetal huésped con un vector de expresión que comprende un promotor unido operativamente a un polinucleótido de NtTS.

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

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

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

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

En algunas modalidades, la expresión de un polipéptido de NtTS se reduce por medios no transgénicos, tal como mediante la creación de una o más mutaciones en un gen de NtTS. Los métodos que introducen una mutación de manera aleatoria en una secuencia génica pueden incluir mutagénesis química, mutagénesis EMS y mutagénesis por radiación. Los métodos que introducen una o más mutaciones dirigidas en una célula incluyen pero sin limitarse a la tecnología de edición de genomas, particularmente la mutagénesis mediada por nucleasas con dedos de zinc, tilling (lesiones locales inducidas por direccionamiento en genomas), recombinación homóloga, mutagénesis dirigida a oligonucleótidos, y mutagénesis mediada por meganucleasas.

Algunos ejemplos no limitantes de mutaciones son deleciones, inserciones y mutaciones sin sentido de al menos un nucleótido, polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) y una repetición de una secuencia simple. Después de la mutación, el tamizaje puede realizarse para identificar deleciones que crean codones de parada prematuros o genes no funcionales de NtTS de cualquier otra manera. El tamizaje de mutantes puede llevarse a cabo mediante secuenciación, o mediante el uso de una o más sondas o cebadores específicos para el gen o proteína de NtTS. Las mutaciones específicas en los polinucleótidos de NtTS también pueden crearse de manera que puedan dar como resultado una expresión génica reducida de NtTS, estabilidad reducida del ARNm de NtTS, o estabilidad reducida de la proteína NtTS. Tales plantas se refieren en la presente descripción como plantas mutantes.

Las plantas mutantes pueden tener cualquier combinación de una o más mutaciones que dan como resultado niveles reducidos del polipéptido de NtTS. Por ejemplo, las plantas mutantes pueden tener una única mutación en un

único gen de NtTS o múltiples mutaciones en un único gen de NtTS. En consecuencia, se describen plantas mutantes que comprenden las variantes polipeptídicas mutantes de NtTS.

En una modalidad, se produce mutagénesis en semillas de plantas y después se cultivan para obtener plantas mutantes de la primera generación. Después, se deja que las plantas de la primera generación se autopolinicen y las semillas de la planta de la primera generación se cultivan para obtener plantas de la segunda generación, que después se analizan en busca de mutaciones en sus loci de NtTS. Aunque el material vegetal con mutaciones puede analizarse en busca de mutaciones, una ventaja del análisis de las plantas de la segunda generación es que todas las mutaciones somáticas corresponden a mutaciones de la línea germinal. Un experto en la técnica comprenderá que una variedad de materiales vegetales, que incluyen pero no se limitan a, semillas, polen, tejido vegetal o células vegetales, puede someterse a mutagénesis con el objetivo de crear las plantas mutantes de NtTS. Sin embargo, el tipo de material vegetal que se mutageniza puede afectar cuando el ácido nucleico vegetal se analiza en busca de mutaciones. Por ejemplo, cuando el polen se somete a mutagénesis antes de la polinización de una planta sin mutaciones las semillas que resultan de esa polinización se cultivan para obtener plantas de la primera generación. Cada célula de las plantas de la primera generación contendrán mutaciones creadas en el polen; así estas plantas de la primera generación pueden analizarse después en busca de mutaciones de NtTS en lugar de esperar hasta la segunda generación.

Los mutágenos que crean mutaciones puntuales, deleciones, inserciones, transversiones, y/o transiciones cortas, que incluyen mutágenos químicos o radiación, pueden usarse para crear las mutaciones. Los mutágenos incluyen, pero no se limitan a, metanosulfato de etilo (EMS), sulfonato de metilmetano (MMS), N-etil-N-nitrosourea (ENU), trietilmelamina (TEM), N-metil-N-nitrosourea (MNU), procarbazona, clorambucil, ciclofosfamida, sulfato de dietilo, monómero de acrilamida, melfalano, mostaza de nitrógeno, vincristina, dimetilnitrosamina, N-metil-N'-nitro-nitrosoguanidina (MNNG), nitrosoguanidina, 2-aminopurina, 7,12 dimetil-benz(a)antraceno (DMBA), óxido de etileno, hexametilfosforamida, bisulfano, diepoxialcanos (diepoxioctano (DEO), diepoxibutano (BEB), y similares), dihidrocloruro 2-metoxi-6-cloro-9[3-(etil-2-cloro-etil)aminopropilamino]acridina (ICR-170) y formaldehído. Además, se contemplan las mutaciones espontáneas en el locus de NtTS que pueden no haber sido causadas directamente por el mutágeno siempre y cuando resulten en el fenotipo deseado. Los agentes mutagénicos adecuados incluyen además, por ejemplo, radiación ionizante – tal como rayos X, rayos gamma, radiación con neutrones rápidos y radiación UV. Cualquier método de preparación de ácidos nucleicos de plantas, conocido por los expertos en la técnica puede usarse para preparar el ácido nucleico de plantas para el tamizaje de mutaciones de NtTS. Cualquier método de preparación de ácidos nucleicos de plantas, conocido por los expertos en la técnica puede usarse para preparar el ácido nucleico de plantas para el tamizaje de mutaciones de NtTS.

El ácido nucleico preparado a partir de plantas individuales, células vegetales, o material vegetal opcionalmente puede mezclarse con el objetivo de un tamizaje expedito en busca de mutaciones en el gen de NtTS de la población de plantas que se origina del tejido, células o material vegetal mutagenizado. Pueden tamizarse una o más generaciones posteriores de plantas, células vegetales o material vegetal. El tamaño del grupo mezclado opcionalmente depende de la sensibilidad del método de tamizaje usado.

Después que las muestras de ácidos nucleicos se mezclan opcionalmente, pueden someterse a técnicas de amplificación específicas de polinucleótidos de NtTS, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Cualquiera de uno o más cebadores o sondas específicos para el gen de NtTS o las secuencias inmediatamente adyacentes al gen de NtTS pueden utilizarse para amplificar las secuencias de NtTS dentro de la muestra de ácidos nucleicos mezclada opcionalmente. Preferentemente, uno o más cebadores se diseñan para amplificar las regiones del locus de NtTS donde es más probable que surjan las mutaciones útiles. Con la máxima preferencia, el cebador se diseña para detectar mutaciones dentro de regiones del polinucleótido de NtTS. Adicionalmente, se prefiere que el(los) cebador(es) eviten sitios polimórficos conocidos con el objetivo de facilitar el tamizaje en busca de mutaciones puntuales. Para facilitar la detección de los productos de amplificación, el uno o más cebadores o sondas pueden marcarse con el uso de cualquier método de marcaje convencional. El(los) cebador(es) o sonda(s) pueden diseñarse en base a las secuencias de NtTS descritas en la presente descripción con el uso de métodos que se conocen bien en la técnica. Los polimorfismos pueden identificarse por medios conocidos en la técnica.

En un aspecto adicional se proporciona un método para preparar una planta mutante. El método implica proporcionar al menos una célula de una planta que comprende un gen que codifica un polipéptido de NtTS funcional. Seguidamente, al menos una célula de la planta se trata en condiciones efectivas para modular la actividad del gen de NtTS. La al menos una célula vegetal mutante se propaga después para obtener una planta mutante, donde la planta mutante tiene un nivel modulado del(de los) polipéptido(s) de NtTS en comparación con el de una planta control. En una modalidad de este método para crear una planta mutante, la etapa de tratamiento implica someter la al menos una célula a un agente mutagénico químico como se describió anteriormente y en condiciones efectivas para obtener al menos una célula vegetal mutante. En otra modalidad de este método, la etapa de tratamiento implica someter al menos una célula a una fuente de radiación en condiciones efectivas para obtener al menos una célula vegetal mutante. El término "planta mutante" incluye plantas mutantes en las que el genotipo está modificado en comparación con una planta control, convenientemente por medios diferentes a la ingeniería genética o modificación genética.

En ciertas modalidades, la planta mutante, célula vegetal mutante o material vegetal mutante pueden comprender una o más mutaciones que se han producido naturalmente en otra planta, célula vegetal o material vegetal y confieren un rasgo deseado. Esta mutación puede incorporarse (por ejemplo, por introgresión) en otra planta, célula vegetal o material vegetal (por ejemplo, una planta, célula vegetal o material vegetal con un fondo genético diferente a la planta a partir de la cual se derivó la mutación) para conferir el rasgo a ellos. Así, a modo de ejemplo, una mutación que se produjo naturalmente en una primera planta puede introducirse en una segunda planta – tal como una segunda planta con un fondo genético diferente a la primera planta. Por lo tanto la persona experta es capaz de buscar e identificar una planta que porta naturalmente en su genoma uno o más alelos mutantes del gen de NtTS que confieren un rasgo deseado. El(los) alelo(s) mutante(s) que se produce(n) naturalmente pueden transferirse a la segunda planta mediante varios métodos que incluyen fitomejoramiento, retrocruzamiento e introgresión para producir líneas, variedades o híbridos que tienen una o más mutaciones en el gen de NtTS. Las plantas que muestran un rasgo deseado pueden tamizarse de una mezcla de plantas mutantes. De manera adecuada, la selección se lleva a cabo al utilizar el conocimiento de las secuencias de nucleótidos de NtTS como se describe en la presente descripción. En consecuencia, es posible tamizar por un rasgo genético que es indicativo de niveles aumentados de metionina libre en comparación con un control. Tal enfoque de tamizaje puede implicar la aplicación de técnicas convencionales de amplificación y/o hibridación de ácidos nucleicos como se describe en la presente descripción. Así, un aspecto adicional se refiere a un método para identificar una planta mutante que comprende las etapas de: (a) proporcionar una muestra que comprende un polinucleótido de NtTS procedente de una planta; y (b) determinar la secuencia de ácido nucleico del polinucleótido de NtTS, en donde una diferencia en la secuencia del polinucleótido de NtTS en comparación con el polinucleótido de NtTS de una planta control es indicativo de que dicha planta es una planta mutante para NtTS. En otro aspecto se proporciona un método para identificar una planta mutante que acumula niveles aumentados de metionina libre en comparación con una planta control, que comprende las etapas de: (a) proporcionar una muestra procedente de una planta que se va a tamizar; (b) determinar si dicha muestra comprende una o más mutaciones en el polinucleótido de NtTS; y (c) determinar el contenido de metionina de dicha planta; en donde si dicha muestra comprende una o más mutaciones en el polinucleótido de NtTS que modula la expresión o la actividad de la proteína codificada en comparación con una planta control y una parte de la planta tiene un aumento en el contenido de metionina de al menos 5 % en comparación con una planta control en la cual la expresión o la actividad de treonina sintasa no se ha reducido es indicativo de una planta mutante de origen natural que acumula niveles aumentados de metionina libre. En otro aspecto se proporciona un método para preparar una planta mutante que acumula niveles aumentados de metionina libre en comparación con una planta control, que comprende las etapas de: (a) proporcionar una muestra de una primera planta; (b) determinar si dicha muestra comprende una o más mutaciones en un polinucleótido de NtTS que dan como resultado la acumulación de niveles aumentados de metionina libre en ella; y (c) transferir la una o más mutaciones a una segunda planta. La(s) mutación(es) puede(n) transferirse a la segunda planta con el uso de varios métodos que se conocen en la técnica – tales como mediante ingeniería genética, manipulación genética, introgresión, mejoramiento de plantas, retrocruzamiento y similares. En una modalidad, la primera planta es una planta de origen natural. En una modalidad, la segunda planta tiene un fondo genético diferente a la primera planta. En otro aspecto se proporciona un método para preparar una planta mutante que acumula niveles aumentados de metionina libre en comparación con una planta control, que comprende las etapas de: (a) proporcionar una muestra de una primera planta; (b) determinar si dicha muestra comprende una o más mutaciones en el polinucleótido de NtTS que dan como resultado la acumulación de niveles aumentados de metionina libre en ella; y (c) introgresar la una o más mutaciones de la primera planta en una segunda planta. En una modalidad, la etapa de introgresión comprende el mejoramiento de plantas, opcionalmente que incluye el retrocruzamiento y similares. En una modalidad, la primera planta es una planta de origen natural. En una modalidad, la segunda planta tiene un fondo genético diferente a la primera planta. En una modalidad, la primera planta no es un cultivar o un cultivar élite. En una modalidad, la segunda planta es un cultivar o un cultivar élite. Un aspecto adicional se refiere a una planta mutante (que incluye un cultivar o planta mutante de cultivar élite) obtenida o que puede obtenerse mediante los métodos descritos en la presente descripción. En ciertas modalidades, las “plantas mutantes” pueden tener una o más mutaciones localizadas solo en una región específica de la planta – tal como dentro de la secuencia del polinucleótido de NtTS. De conformidad con esta modalidad, la secuencia genómica restante de la planta será la misma o esencialmente la misma que la planta antes de la mutagénesis.

En ciertas modalidades, las plantas mutantes pueden tener una o más mutaciones localizadas en más de una región de la planta – tal como dentro de la secuencia del polinucleótido de NtTS y en una o más regiones adicionales del genoma. De conformidad con esta modalidad, la secuencia genómica restante de la planta mutante no será la misma o no será esencialmente la misma que la planta antes de la mutagénesis. En ciertas modalidades, las plantas mutantes pueden no tener una o más mutaciones en uno o más, dos o más, tres o más, cuatro o más o cinco o más exones del polinucleótido de NtTS; o pueden no tener una o más mutaciones en uno o más, dos o más, tres o más, cuatro o más o cinco o más intrones del polinucleótido de NtTS; o pueden no tener una o más mutaciones en un promotor del polinucleótido de NtTS; o pueden no tener una o más mutaciones en la región no traducida de 3' del polinucleótido de NtTS; o pueden no tener una o más mutaciones en la región no traducida de 5' del polinucleótido de NtTS; o pueden no tener una o más mutaciones en la región codificante del polinucleótido de NtTS; o pueden no tener una o más mutaciones en la región no codificante del polinucleótido de NtTS; o cualquier combinación de dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más; o seis o más de estas partes de estas.

65

En una modalidad, una secuencia (por ejemplo, una secuencia complementaria) que es de al menos 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 o más nucleótidos contiguos de los nucleótidos 1-46 de las secs. con núms. de ident.: 1, 2 y 3; los nucleótidos 1-52 de la sec. con núm. de ident.:20; los nucleótidos 99-141 de la sec. con núm. de ident.:1; los nucleótidos 102-144 de la sec. con núm. de ident.: 2 y la sec. con núm. de ident.:3; los nucleótidos 102-153 de la sec. con núm. de ident.:20; los nucleótidos 1325-1362 de las secs. con núms. de ident.: 1, 2 y 3; o los nucleótidos 1334-1371 de la sec. con núm. de ident.:20 se usa para modular la expresión.

En otra modalidad, una secuencia (por ejemplo, una secuencia complementaria) que es de al menos 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 o más nucleótidos contiguos de los nucleótidos 454-805 de la sec. con núm. de ident.:1, la sec. con núm. de ident.: 2 o la sec. con núm. de ident.:3 o los nucleótidos 463-814 de la sec. con núm. de ident.:20 se usa para modular la expresión. En un aspecto adicional se proporciona un método para identificar una planta, una célula vegetal o material vegetal que comprende una mutación en un gen que codifica NtTS que comprende: (a) someter una planta, una célula vegetal o material vegetal a mutagénesis; (b) obtener una muestra de ácido nucleico a partir de dicha planta, célula vegetal o material vegetal o descendientes de estos; y (c) determinar la secuencia de ácido nucleico del gen que codifica NtTS o una variante o un fragmento de este, en donde una diferencia en dicha secuencia es indicativo de una o más mutaciones en ella.

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

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

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

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

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

La descripción abarca el uso de meganucleasas para inactivar polinucleótidos de NtTS en una célula vegetal o planta. Particularmente, la descripción proporciona un método para inactivar un polinucleótido de NtTS en una planta con el uso de una meganucleasa que comprende: a) proporcionar una célula vegetal que comprende un polinucleótido de NtTS; (b) introducir una meganucleasa o una construcción que codifica una meganucleasa en dicha célula vegetal; y (c) permitir que la meganucleasa inactive esencialmente al polinucleótido de NtTS.

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

Después del suministro del casete de expresión de meganucleasa, las células vegetales se cultivan, inicialmente, bajo condiciones que son típicas para el procedimiento de transformación particular que se usó. Esto puede significar cultivar las células transformadas en los medios a temperaturas por debajo de 26°C, frecuentemente en la oscuridad. Tales condiciones estándar pueden usarse durante un período de tiempo, preferentemente 1-4 días, para permitir que la célula vegetal se recupere del proceso de transformación. En cualquier punto después de este período de recuperación inicial, puede aumentarse la temperatura de cultivo para estimular la actividad de la meganucleasa diseñada genéticamente para escindir y mutar el sitio de reconocimiento de la meganucleasa.

Para ciertas aplicaciones, puede ser deseable eliminar de manera precisa el polinucleótido de NtTS del genoma de la planta. Tales aplicaciones son posibles con el uso de un par de meganucleasas diseñadas genéticamente, cada una de las cuales escinde un sitio de reconocimiento de meganucleasa a cada lado de la delección deseada.

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

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

Las especies adecuadas pueden incluir *Panicum* spp., *Sorghum* spp., *Miscanthus* spp., *Saccharum* spp., *Erianthus* spp., *Populus* spp., *Andropogon gerardii* (tallo azul grande), *Pennisetum purpureum* (espadaña), *Phalaris arundinacea* (hierba cinta), *Cynodon dactylon* (grama), *Festuca arundinacea* (festuca alta), *Spartina pectinata* (hierba cuerda de las praderas), *Medicago sativa* (alfalfa), *Arundo donax* (caña brava), *Secale cereale* (centeno), *Salix* spp. (saúce), *Eucalyptus* spp. (eucalipto), *Triticosecale* (híbrido de trigo y centeno triticale), bambú, *Helianthus annuus* (girasol), *Carthamus tinctorius* (alazor), *Jatropha curcas* (jatrofa), *Ricinus communis* (castor), *Elaeis guineensis* (palma), *Linum usitatissimum* (lino), *Brassica juncea*, *Beta vulgaris* (remolacha), *Manihot esculenta* (mandioca),

5 Lycopersicon esculentum (tomate), Lactuca sativa (lechuga), Musa paradisiaca (banano), Solanum tuberosum (patata), Brassica oleracea (brócoli, coliflor, col de Bruselas), Camellia sinensis (té), Fragaria ananassa (fresa), Theobroma cacao (cacao), Coffea arabica (café), Vitis vinifera (uva), Ananas comosus (piña), Capsicum annum (chile y pimiento), Allium cepa (cebolla), Cucumis melo (melón), Cucumis sativus (pepino), Cucurbita maxima (calabacín), Cucurbita moschata (calabacín), Spinacea oleracea (espinaca), Citrullus lanatus (sandía), Abelmoschus esculentus (quimbombó), Solanum melongena (berenjena), Rosa spp. (rosa), Dianthus caryophyllus (clavel), Petunia spp. (petunia), Poinsettia pulcherrima (flor de pascua), Lupinus albus (altramuz blanco), Uniola paniculata (avena), agróstide (Agrostis spp.), Populus tremuloides (álamo temblón), Pinus spp. (pino), Abies spp. (abeto), Acer spp. (arce), Hordeum vulgare (cebada), Poa pratensis (hierba verdiazul), Lolium spp. (césped inglés) y Phleum pratense (Timothy), Panicum virgatum (pasto varilla), Sorghum bicolor (sorgo, hierba del sudán), Miscanthus giganteus (miscanthus), Saccharum sp. (caña energética), Populus balsamifera (álamo), Zea mays (maíz), Glycine max (frijol de soja), Brassica napus (canola), Triticum aestivum (trigo), Gossypium hirsutum (algodón), Oryza sativa (arroz), Helianthus annuus (girasol), Medicago sativa (alfalfa), Beta vulgaris (batabel), o Pennisetum glaucum (mijo perlado).

15 Varias modalidades están dirigidas a plantas mutantes, plantas de origen no natural o plantas transgénicas modificadas para reducir los niveles de expresión génica de NtTS lo que produce de esta manera plantas, tal como planta de tabaco, en las que el nivel de expresión de NtTS se reduce dentro de los tejidos vegetales de interés en comparación con una planta control. Las composiciones y los métodos descritos pueden aplicarse a cualquier especie del género *Nicotiana*, que incluye *N. rustica* y *N. tabacum* (por ejemplo, LA B21, LN KY171, TI 1406, Basma, Galpao, Perique, Beinhart 1000-1, y Pético). Otras especies incluyen *N. acaulis*, *N. acuminata*, *N. acuminata* var. *multiflora*, *N. africana*, *N. alata*, *N. amplexicaulis*, *N. arentsii*, *N. attenuata*, *N. benavidesii*, *N. benthamiana*, *N. bigelovii*, *N. bonariensis*, *N. cavicola*, *N. clevelandii*, *N. cordifolia*, *N. corymbosa*, *N. debneyi*, *N. excelsior*, *N. forgetiana*, *N. fragrans*, *N. glauca*, *N. glutinosa*, *N. goodspeedii*, *N. gossei*, *N. hybrid*, *N. ingulba*, *N. kawakamii*, *N. knightiana*, *N. langsdorffii*, *N. linearis*, *N. longiflora*, *N. maritima*, *N. megalosiphon*, *N. miersii*, *N. noctiflora*, *N. nudicaulis*, *N. obtusifolia*, *N. occidentalis*, *N. occidentalis* subsp. *hesperis*, *N. otophora*, *N. paniculata*, *N. pauciflora*, *N. petunioides*, *N. plumbaginifolia*, *N. quadrivalvis*, *N. raimondii*, *N. repanda*, *N. rosulata*, *N. rosulata* subsp. *ingulba*, *N. rotundifolia*, *N. setchellii*, *N. simulans*, *N. solanifolia*, *N. spegazzinii*, *N. stocktonii*, *N. suaveolens*, *N. sylvestris*, *N. thyrsoiflora*, *N. tomentosa*, *N. tomentosiformis*, *N. trigonophylla*, *N. umbratica*, *N. undulata*, *N. velutina*, *N. wigandoides*, y *N. x sanderae*.

30 La planta transgénica, de origen no natural o mutante puede ser, por lo tanto, una variedad de tabaco o un cultivar de tabaco élite que comprende uno o más transgenes, o una o más mutaciones genéticas o sus combinaciones. La(s) mutación(es) genética(s) (por ejemplo, uno o más polimorfismos) pueden ser mutaciones que no existen naturalmente en la variedad de tabaco individual o cultivar de tabaco (por ejemplo, cultivar de tabaco élite) o pueden ser mutación(es) genética(s) que se producen naturalmente siempre y cuando la mutación no se produzca naturalmente en la variedad de tabaco individual o cultivar de tabaco (por ejemplo, cultivar de tabaco élite). Las variedades particularmente útiles de *Nicotiana tabacum* incluyen los tabacos tipo Burley, tipo oscuro, tipo curado al humo, y tipo Oriental. Los ejemplos no limitantes de variedades o cultivares son: BD 64, CC 101, CC 200, CC 27, CC 301, CC 400, CC 500, CC 600, CC 700, CC 800, CC 900, Coker 176, Coker 319, Coker 371 Gold, Coker 48, CD 263, DF911, DT 538 LC Galpao tobacco, GL 26H, GL 350, GL 600, GL 737, GL 939, GL 973, HB 04P, HB 04P LC, HB3307PLC, Híbrido 403LC, Híbrido 404LC, Híbrido 501 LC, K 149, K 326, K 346, K 358, K394, K 399, K 730, KDH 959, KT 200, KT204LC, KY10, KY14, KY 160, KY 17, KY 171, KY 907, KY907LC, KTY14xL8 LC, Little Crittenden, McNair 373, McNair 944, msKY 14xL8, Narrow Leaf Madole, Narrow Leaf Madole LC, NBH 98, N-126, N-777LC, N-7371LC, NC 100, NC 102, NC 2000, NC 291, NC 297, NC 299, NC 3, NC 4, NC 5, NC 6, NC7, NC 606, NC 71, NC 72, NC 810, NC BH 129, NC 2002, Neal Smith Madole, OXFORD 207, PD 7302 LC, PD 7309 LC, PD 7312 LC 'Periq'e' tobacco, PVH03, PVH09, PVH19, PVH50, PVH51, R 610, R 630, R 7-11, R 7-12, RG 17, RG 81, RG H51, RGH 4, RGH 51, RS 1410, Speight 168, Speight 172, Speight 179, Speight 210, Speight 220, Speight 225, Speight 227, Speight 234, Speight G-28, Speight G-70, Speight H-6, Speight H20, Speight NF3, TI 1406, TI 1269, TN 86, TN86LC, TN 90, TN 97, TN97LC, TN D94, TN D950, TR (Tom Rosson) Madole, VA 309, VA359, AA 37-1, B 13P, Xanthi (Mitchell-Mor), Bel-W3, 79-615, Samsun Holmes NN, KTRDC número 2 Híbrido 49, Burley 21, KY 8959, KY 9, MD 609, PG 01, PG 04, PO1, PO2, PO3, RG 11, RG 8, VA 509, AS44, Banket A1, Basma Drama B84/31, Basma I Zichna ZP4/B, Basma Xanthi BX 2A, Batek, Besuki Jember, C104, Coker 347, Criollo Misionero, Delcrest, Djebel 81, DVH 405, Galpão Comum, HB04P, Hicks Broadleaf, Kabakulak Ellassona, Kutsage E1, LA BU 21, NC 2326, NC 297, PVH 2110, Red Russian, Samsun, Saplak, Simmaba, Talgar 28, Wislica, Yayaldag, Prilep HC-72, Prilep P23, Prilep PB 156/1, Prilep P12-2/1, Yaka JK-48, Yaka JB 125/3, TI-1068, KDH-960, TI-1070, TW136, Basma, TKF 4028, L8, TKF 2002, GR141, Basma xanthi, GR149, GR153, Petit Havana. Se contemplan, además, subvariedades de baja conversión de lo anterior, incluso si no se identifican específicamente en la presente descripción.

60 Las modalidades se dirigen además a composiciones y métodos para producir plantas mutantes, plantas de origen no natural, plantas híbridas, o plantas transgénicas que se han modificado para reducir la expresión o actividad de la treonina sintasa lo que da como resultado un aumento en la concentración de metionina libre en una o más partes (por ejemplo, las hojas) de una planta en comparación con un control. Ventajosamente, las plantas mutantes, plantas de origen no natural, plantas híbridas, o plantas transgénicas que se obtienen son similares o esencialmente las mismas en su apariencia global que las plantas control. Varias características fenotípicas tales como grado de madurez, número de hojas por planta, altura del rabillo, ángulo de inserción de las hojas, tamaño de las hojas (ancho



y longitud), distancia de internudos, y relación lámina-nervio central pueden evaluarse mediante observaciones de campo.

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

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

En una modalidad, la altura del tallo de las plantas mutantes, de origen no natural o transgénicas es esencialmente la misma que la de las plantas control a los tres meses después del trasplante al campo o 36 días después del desmoche. Por ejemplo, la altura del tallo de las plantas mutantes, de origen no natural o transgénicas no es menor que la altura del tallo de las plantas control tres meses después del trasplante al campo o 36 días después del desmoche. En otra modalidad, la altura del tallo de las plantas mutantes, de origen no natural o transgénicas es aproximadamente 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 % mayor o menor que las plantas control a los tres meses después del trasplante al campo o 36 días después del desmoche. En otra modalidad, el contenido de clorofila de las plantas mutantes, de origen no natural o transgénicas es esencialmente el mismo que las plantas control a los tres meses después del trasplante al campo o 36 días después del desmoche. Por ejemplo, el contenido de clorofila de las plantas mutantes, de origen no natural o transgénicas no es menor que el contenido de clorofila de las plantas control tres meses después del trasplante al campo o 36 días después del desmoche. En otra modalidad, el contenido de clorofila de las plantas mutantes, de origen no natural o transgénicas es aproximadamente 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 % mayor o menor que las plantas control a los tres meses después del trasplante al campo o 36 días después del desmoche. En otra modalidad, la altura del tallo de las plantas mutantes, de origen no natural o transgénicas es esencialmente la misma que las plantas control a los tres meses después del trasplante al campo o 36 días después del desmoche y el contenido de clorofila de las plantas mutantes, de origen no natural o transgénicas es esencialmente el mismo que el de las plantas control a los tres meses después del trasplante al campo o 36 días después del desmoche. Por ejemplo, la altura del tallo de las plantas mutantes, de origen no natural o transgénicas no es menor que la altura del tallo de las plantas control tres meses después del trasplante al campo o 36 días después del desmoche y el contenido de clorofila de las plantas mutantes, de origen no natural o transgénicas no es menor que el contenido de clorofila de las plantas control tres meses después del trasplante al campo o 36 días después del desmoche. En otra modalidad, la altura del tallo de las plantas mutantes, de origen no natural o transgénicas es aproximadamente 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 % mayor o menor que la de las plantas control a los tres meses después del trasplante al campo o 36 días después del desmoche y el contenido de clorofila de las plantas mutantes, de origen no natural o transgénicas es aproximadamente 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 % mayor o menor que el de las plantas control a los tres meses después del trasplante al campo o 36 días después del desmoche. En otras modalidades, cualquiera de una o más de las siguientes características: grado de madurez, número de hojas por planta, altura del tallo, ángulo de inserción de las hojas, tamaño de la hoja (ancho y longitud), distancia internodos, relación de la lámina-nervadura, y coloración de las hojas de las plantas mutantes, de origen no natural o transgénicas son esencialmente las mismas que en las plantas control a los tres meses después del trasplante al campo o 36 días después del desmoche.

En otro aspecto, se proporciona un método para aumentar la concentración de metionina libre en al menos una parte de una planta (por ejemplo, las hojas), que comprende las etapas de: (i) reducir la expresión o actividad de treonina sintasa en la planta, preferentemente, en donde la treonina sintasa comprende la secuencia de polinucleótido descrita en la presente o la secuencia polipeptídica descrita en la presente; (ii) medir la concentración de metionina libre en al menos una parte (por ejemplo, las hojas) de la planta mutante, de origen no natural o la planta transgénica obtenidas en la etapa (i); y (iii) identificar una planta mutante, de origen no natural o transgénica en la que la concentración de metionina libre en ella ha aumentado en comparación con una planta control. De manera adecuada, la apariencia general de dicha planta mutante, de origen no natural o transgénica es esencialmente la misma que en la planta control tres meses después del trasplante al campo o 36 días después del desmoche. De manera adecuada, la concentración de treonina libre en parte de la planta, tal como las hojas, aumenta en comparación con la planta control.

La reducción en la expresión de treonina sintasa en comparación con la planta control puede ser de aproximadamente 5 % a aproximadamente 100 %, de aproximadamente 5 % a aproximadamente 99 % o menos, de aproximadamente 5 % a aproximadamente 95 % o menos, de aproximadamente 5 % a aproximadamente 90 % o menos, o una reducción de al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al

menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, o 100 %, lo que incluye una reducción en la actividad transcripcional y/o la expresión de proteínas. En una modalidad, la reducción en la expresión de treonina sintasa es una reducción parcial en la expresión, que incluye una reducción en la actividad transcripcional y/o la expresión de proteínas. En una modalidad, la reducción parcial en la expresión permite que la planta o célula vegetal mutante, de origen no natural o transgénica mantenga niveles residuales de treonina sintasa.

La reducción en la actividad de treonina sintasa en comparación con una planta control puede ser de aproximadamente 5 % a aproximadamente 100 %, de aproximadamente 5 % a aproximadamente 99 % o menos, de aproximadamente 5 % a aproximadamente 95 % o menos, de aproximadamente 5 % a aproximadamente 90 % o menos, o una reducción de al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, o 100 % o más. En una modalidad, la reducción en la actividad de treonina sintasa es una reducción parcial en la actividad. En una modalidad, la reducción parcial en la actividad permite que la planta o célula vegetal mutante, de origen no natural o transgénica mantenga niveles residuales de treonina sintasa.

El aumento en la concentración de treonina libre en comparación con una planta control puede ser de aproximadamente 5 % a aproximadamente 100 %, o un aumento de al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, o hasta 100 %.

En determinadas modalidades, la expresión de la sec. con núm. de ident.:1 o la sec. con núm. de ident.:2 o la sec. con núm. de ident.:3 o la sec. con núm. de ident.:20 o la actividad de la proteína así codificada se reduce (por ejemplo, se silencia o inhibe). En determinadas modalidades, la expresión de la sec. con núm. de ident.:1 y la sec. con núm. de ident.:2 o la sec. con núm. de ident.:3 o la sec. con núm. de ident.:20 o la actividad de la proteína así codificada se reduce (por ejemplo, se silencia o inhibe). En determinadas modalidades, la expresión de la sec. con núm. de ident.:1 o la sec. con núm. de ident.:2 y la sec. con núm. de ident.:3 o la sec. con núm. de ident.:20 o la actividad de la proteína así codificada se reduce (por ejemplo, se silencia o inhibe). En determinadas modalidades, la expresión de la sec. con núm. de ident.:1 o la sec. con núm. de ident.:2 o la sec. con núm. de ident.:3 y la sec. con núm. de ident.:20 o la actividad de la proteína así codificada se reduce (por ejemplo, se silencia o inhibe). En determinadas modalidades, la expresión de la sec. con núm. de ident.:1, la sec. con núm. de ident.:2, la sec. con núm. de ident.:3 y la sec. con núm. de ident.:20 o la actividad de la proteína así codificada se reduce (por ejemplo, se silencia o inhibe). En determinadas modalidades, la expresión de la sec. con núm. de ident.:2, la sec. con núm. de ident.:3 y la sec. con núm. de ident.:20 o la actividad de la proteína así codificada se reduce (por ejemplo, se silencia o inhibe). En determinadas modalidades, la expresión de la sec. con núm. de ident.:2, la sec. con núm. de ident.:3 y la sec. con núm. de ident.:20 o la actividad de la proteína así codificada se reduce (por ejemplo, se silencia o inhibe). En determinadas modalidades, la expresión de la sec. con núm. de ident.:2, la sec. con núm. de ident.:3 y la sec. con núm. de ident.:20 o la actividad de la proteína así codificada se reduce (por ejemplo, se silencia o inhibe). En determinadas modalidades, la expresión de la sec. con núm. de ident.:1, la sec. con núm. de ident.:2 y la sec. con núm. de ident.:20 o la actividad de la proteína así codificada se reduce (por ejemplo, se silencia o inhibe). En determinadas modalidades, la expresión de la sec. con núm. de ident.:1, la sec. con núm. de ident.:2 y la sec. con núm. de ident.:3 o la actividad de la proteína así codificada se reduce (por ejemplo, se silencia o inhibe). En determinadas modalidades, la expresión de cada una de la sec. con núm. de ident.:1, la sec. con núm. de ident.:2 o la sec. con núm. de ident.:3, o la actividad de cada una de las proteínas así codificadas, individualmente o en una combinación, se reduce en una mayor medida que la expresión de la sec. con núm. de ident.:20. En una modalidad, la adición de ingredientes exógenos, tal como aminoácidos, por ejemplo, treonina y/o isoleucina, no se necesita para obtener plantas de apariencia visual aceptable.

Un objeto es proporcionar plantas mutantes, plantas transgénicas o plantas de origen no natural que muestran un nivel aumentado de metionina libre a la vez que se mantiene esencialmente la misma apariencia visual y una o más características agronómicas en comparación con una planta control. En consecuencia, en la presente se describen plantas mutantes, plantas transgénicas o plantas de origen no natural o células modificadas genéticamente que tienen un nivel aumentado de metionina libre y una actividad o expresión reducidas de la treonina sintasa en comparación con células de tabaco control o plantas control. Las plantas o células mutantes, transgénicas o de origen no natural se han modificado para reducir la síntesis de treonina sintasa mediante la reducción de la expresión de uno o más polipéptidos que codifican las secuencias polinucleotídicas descritas en la presente, preferentemente codificados por uno o más polinucleótidos que comprenden, que consisten o que consisten esencialmente en una secuencia que codifica una treonina sintasa y que tiene al menos 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % y 100 % de identidad de secuencia con la sec. con núm. de ident.:1, la sec. con núm. de ident.:2 y/o la sec. con núm. de ident.:3 o mediante uno o más polinucleótidos que comprenden, que consisten o que consisten esencialmente en una secuencia que codifica una treonina sintasa y que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia sec. con núm. de ident.:4, la sec. con núm. de ident.:5, la sec. con núm. de ident.:6 o la sec. con núm. de ident.:20.

Un aspecto adicional se refiere a plantas mutantes, plantas de origen no natural o plantas transgénicas, en donde la expresión de treonina sintasa o la actividad de la proteína así codificada se reduce y una parte de la planta (por

ejemplo, las hojas) tiene un aumento en el contenido de metionina de al menos 5 % en comparación con una planta control en la cual la expresión o la actividad de treonina sintasa no se ha reducido. Preferentemente, la concentración de metional en el humo o aerosol de los productos de tabaco aumenta en al menos 5 % en comparación con el humo o aerosol del producto de tabaco producido a partir de la planta control.

El aumento en el contenido de metionina en comparación con la planta control puede ser de al menos aproximadamente 5 %, al menos aproximadamente 10 %, al menos aproximadamente 20 %, al menos aproximadamente 25 %, al menos aproximadamente 30 %, al menos aproximadamente 40 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 % o aproximadamente 100 % o más.

El aumento en la concentración de metional en el humo o aerosol preparado a partir de un producto de tabaco en comparación con la planta control puede ser al menos aproximadamente 5 %, al menos aproximadamente 10 %, al menos aproximadamente 20 %, al menos aproximadamente 25 %, al menos aproximadamente 30 %, al menos aproximadamente 40 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 %, o aproximadamente 100 % o más.

De manera adecuada, la apariencia visual o una o más características agronómicas de dicha planta son esencialmente las mismas que la planta control tres meses después del trasplante al campo o 36 días después del desmoche, preferentemente, en donde la altura del tallo de las plantas mutantes, de origen no natural o transgénicas es esencialmente la misma que la altura del tallo de las plantas control tres meses después del trasplante al campo o 36 días después del desmoche y/o el contenido de clorofila de las plantas mutantes, de origen no natural o transgénicas es esencialmente el mismo que el contenido de clorofila de las plantas control tres meses después del trasplante al campo o 36 días después del desmoche.

De manera adecuada, la concentración de metionina libre en una parte de la planta (por ejemplo, las hojas) aumenta en comparación con la planta control.

De manera adecuada, (i) la concentración de metionina libre en una parte de la planta (por ejemplo, las hojas) es al menos aproximadamente 0,026 mg/g, adecuadamente al menos aproximadamente 0,027 mg/g, adecuadamente al menos aproximadamente 0,028 mg/g, adecuadamente al menos aproximadamente 0,029 mg/g, adecuadamente al menos aproximadamente 0,03 mg/g, adecuadamente al menos aproximadamente 0,031 mg/g, adecuadamente al menos aproximadamente 0,032 mg/g, adecuadamente al menos aproximadamente 0,032 mg/g, adecuadamente al menos aproximadamente 0,033 mg/g, adecuadamente al menos aproximadamente 0,034 mg/g; (ii) la concentración de treonina libre en una parte de la planta (por ejemplo, las hojas) es al menos aproximadamente 0,5 mg/g, adecuadamente al menos aproximadamente 0,52 mg/g, adecuadamente al menos aproximadamente 0,54 mg/g, adecuadamente al menos aproximadamente 0,56 mg/g, adecuadamente al menos aproximadamente 0,58 mg/g, adecuadamente al menos aproximadamente 0,6 mg/g; y (iii) la concentración de metional en el aerosol después de calentar una parte de la planta (por ejemplo, las hojas) es al menos aproximadamente 2000 µg/g, adecuadamente al menos aproximadamente 2100 µg/g, adecuadamente al menos aproximadamente 2200 µg/g, adecuadamente al menos aproximadamente 2500 µg/g, adecuadamente al menos aproximadamente 2750 µg/g, adecuadamente al menos aproximadamente 3000 µg/g, adecuadamente al menos aproximadamente 3250 µg/g, adecuadamente al menos aproximadamente 3500 µg/g, adecuadamente al menos aproximadamente 3750 µg/g, adecuadamente al menos aproximadamente 3800 µg/g o mayor.

De manera adecuada, (i) la concentración de metionina libre en una parte de la planta (por ejemplo, las hojas) es al menos aproximadamente 0,03 mg/g; (ii) la concentración de treonina libre en una parte de la planta (por ejemplo, las hojas) es entre aproximadamente 0,5 mg/g a 0,65 mg/g; y (iii) la concentración de metional en el aerosol después de calentar una parte de la planta (por ejemplo, las hojas) es al menos aproximadamente 2200 µg/g.

De manera adecuada, (i) la concentración de metionina libre en una parte de la planta (por ejemplo, las hojas) es al menos aproximadamente 0,03 mg/g; (ii) la concentración de treonina libre en una parte de la planta (por ejemplo, las hojas) es entre aproximadamente 0,5 mg/g a 0,65 mg/g; y (iii) la concentración de metional en el aerosol después de calentar una parte de la planta (por ejemplo, las hojas) es entre aproximadamente 2200 µg/g y aproximadamente 4000 µg/g, adecuadamente entre aproximadamente 2200 µg/g y aproximadamente 3850 µg/g.

La planta puede calentarse a 100 °C o superior, tal como al menos 125 °C, al menos 150 °C, al menos 175 °C o al menos 200 °C, para la liberación del aerosol.

Aún en un aspecto adicional, se proporciona una planta mutante, una planta de origen no natural, o una planta

transgénica, en donde la expresión de treonina sintasa o la actividad de la proteína así codificada se reduce y (i) la concentración de metionina libre en una parte de la planta (por ejemplo, las hojas) es aproximadamente 0,03 mg/g; (ii) la concentración de treonina libre en una parte de la planta (por ejemplo, las hojas) es aproximadamente 0,5 a aproximadamente 0,7 mg/g; y (iii) la concentración de metional en aerosol después de calentar una parte de la planta (por ejemplo, las hojas) es al menos aproximadamente 2000 µg/g, y adecuadamente en donde la apariencia visual o una o más características agronómicas de dicha planta son esencialmente las mismas que la planta control tres meses después del trasplante al campo o 36 días después del desmoche, preferentemente, en donde la altura del tallo de las plantas mutantes, de origen no natural o transgénicas es esencialmente la misma que la altura del tallo de las plantas control tres meses después del trasplante al campo o 36 días después del desmoche y/o el contenido de clorofila de las plantas mutantes, de origen no natural o transgénicas es esencialmente el mismo que el contenido de clorofila de las plantas control tres meses después del trasplante al campo o 36 días después del desmoche.

De acuerdo con la descripción, una planta que porta un alelo modificado de treonina sintasa puede usarse en un programa de mejoramiento de plantas para crear líneas, variedades e híbridos útiles. Un alelo modificado puede ser un alelo mutante. En particular, el alelo modificado de treonina sintasa se introgressa en las variedades comercialmente importantes descritas anteriormente. Así, se proporcionan métodos para el mejoramiento de plantas, que comprenden cruzar una planta mutante, una planta de origen no natural o una planta transgénica como se describe en la presente descripción con una planta que comprende una identidad genética diferente. El método puede comprender, además, cruzar la planta de la progenie con otra planta, y opcionalmente repetir el cruzamiento hasta que se obtenga una progenie con los rasgos genéticos o fondo genético deseables. Un propósito ofrecido por tales métodos de mejoramiento es introducir un rasgo genético deseable en otras variedades, líneas de mejoramiento, híbridos o cultivares, particularmente los que son de interés comercial. Otro propósito es facilitar el apilamiento de modificaciones genéticas de diferentes genes en una sola variedad de planta, líneas, híbridos o cultivares. Se contemplan apareamientos intraespecíficos así como interespecíficos. Las plantas de la progenie que surgen de tales cruces, también referidas como líneas de mejoramiento, son ejemplos de plantas de origen no natural de la descripción.

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

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

La huella genética, el polimorfismo de nucleótido simple, los marcadores microsatélites, o tecnologías similares pueden usarse en un programa de mejoramiento por selección asistida por marcadores (MAS) para transferir o cruzar alelos modificados o mutantes del gen de treonina sintasa para otros tabacos, como se describe en la presente descripción. Por ejemplo, un genetista puede crear poblaciones segregantes a partir de hibridaciones de un genotipo que contiene un alelo mutante con un genotipo agronómicamente deseable. Las plantas en las generaciones F2 o de retrocruzamiento pueden tamizarse con el uso de un marcador desarrollado a partir de una secuencia genómica de treonina sintasa o un fragmento de esta, con el uso de una de las técnicas enumeradas en la presente descripción. Las plantas identificadas por poseer el alelo mutante pueden retrocruzarse o autopolinizarse para crear una segunda población a tamizar. En dependencia del patrón de herencia esperado o la tecnología MAS

usada, puede ser necesario autopolinizar las plantas seleccionadas antes de cada ciclo de retrocruzamiento para ayudar en la identificación de las plantas individuales deseadas. El retrocruzamiento u otro procedimiento de mejoramiento pueden repetirse hasta que se recupere el fenotipo deseado del parental recurrente.

- 5 De conformidad con la descripción, en un programa de mejoramiento, los cruces exitosos producen plantas F1 que son fértiles. Las plantas F1 seleccionadas pueden cruzarse con uno de los parentales, y las plantas de la primera generación del retrocruzamiento se autopolinizan para producir una población que se tamiza de nuevo para determinar la expresión de genes variantes de treonina sintasa (por ejemplo, la versión nula del gen de treonina sintasa). El proceso de retrocruzamiento, autopolinización, y tamizaje se repite, por ejemplo, al menos 4 veces hasta  
10 que el tamizaje final produce una planta que es fértil y razonablemente similar al parental recurrente. Esta planta, si se desea, se autopoliniza y posteriormente la progenie se tamiza de nuevo para confirmar que la planta exhibe la expresión de un gen variante de treonina sintasa. En algunas modalidades, una población de plantas en la generación F2 se tamiza para detectar la expresión de un gen variante de treonina sintasa, por ejemplo, se identifica una planta que no expresa treonina sintasa debido a la ausencia de un gen de treonina sintasa de conformidad con  
15 métodos estándar, por ejemplo, mediante el uso de un método de PCR con cebadores basados en la información de la secuencia nucleotídica para la treonina sintasa descrita en la presente descripción.

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

Las variedades y líneas descritas en la presente descripción pueden usarse para formar híbridos F1 de un cruce simple. En tales modalidades, las plantas de las variedades parentales pueden cultivarse como poblaciones adyacentes esencialmente homogéneas para facilitar la polinización cruzada natural de las plantas parentales masculinas a las plantas parentales femeninas. La semilla F1 formada sobre las plantas parentales femeninas se cosecha selectivamente por medios convencionales. Además, las dos variedades de plantas parentales pueden cultivarse de manera masiva y cosecharse una mezcla de semillas híbridas F1 formadas en el parental femenino y la semilla formada en el parental masculino como el resultado de la autopolinización. Alternativamente, pueden llevarse a cabo cruces de tres vías en donde un híbrido F1 de un cruce simple se usa como un parental femenino y se cruza con un parental masculino diferente. Como otra alternativa, pueden crearse híbridos de cruces dobles en donde la progenie F1 de dos cruces simples diferentes se cruzan ellos mismos.  
30

Una población de plantas mutantes, de origen no natural o transgénicas puede tamizarse o seleccionarse en busca de los miembros de la población que tienen un rasgo o fenotipo deseado. Por ejemplo, una población de la progenie de un solo evento de transformación puede tamizarse para detectar las plantas que tienen un nivel deseado de la expresión del polipéptido o polinucleótido de NtTS. Pueden usarse métodos físicos y bioquímicos para identificar los niveles de expresión. Estos incluyen análisis de Southern o amplificación por PCR para la detección de un polinucleótido; transferencias tipo Northern, protección de S1 RNasa, extensión de cebadores, o amplificación por RT-PCR para detectar transcritos de ARN; ensayos enzimáticos para detectar la actividad de enzima o ribozima de polipéptidos y polinucleótidos; y electroforesis en gel de proteínas, transferencias tipo Western, inmunoprecipitación, e inmunoensayos con unión a enzimas para detectar polipéptidos. Otras técnicas tales como hibridación in situ, tinción enzimática, e inmunotinción pueden usarse además para detectar presencia o expresión de polipéptidos o polinucleótidos.  
40

En la presente descripción se describe que las células vegetales o plantas mutantes, de origen no natural o transgénicas comprenden uno o más polinucleótidos recombinantes, tal como uno o más polinucleótidos de NtTS aislados, una o más construcciones de polinucleótidos, uno o más ARN bicatenarios, uno o más conjugados o uno o más vectores/vectores de expresión.  
55

En algunas modalidades, una planta en la cual se reduce la expresión de un polinucleótido de NtTS puede tener un aumento en la concentración de metionina libre, especialmente en las hojas. La concentración de metionina libre puede aumentar en al menos aproximadamente 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % o más en comparación con la concentración de metionina libre en una planta control correspondiente en la cual la expresión del polinucleótido de NtTS no se ha reducido.  
60

En algunas modalidades, una planta en la cual se reduce la expresión de un polinucleótido de NtTS puede tener una disminución en la concentración de treonina libre, especialmente en las hojas. La concentración de treonina libre  
65

puede disminuir en al menos aproximadamente 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % o más en comparación con la concentración de treonina libre en una planta control correspondiente en la cual la expresión del polinucleótido de NtTS no se ha reducido. En una modalidad, la concentración de treonina libre puede disminuir en al menos aproximadamente 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 70 %, u 80 % o más en comparación con la concentración de treonina libre en una planta control correspondiente en la cual la expresión del polinucleótido de NtTS no se ha reducido.

La expresión de NtTS puede evaluarse mediante el uso de métodos que incluyen, por ejemplo, RT-PCR, transferencias Northern, protección de RNAsas, extensiones de cebadores, transferencias Western, electroforesis en gel de proteínas, inmunoprecipitación, inmunoensayos ligados a enzimas, ensayos con chips, y espectrometría de masa. Debe señalarse que si un polipéptido se expresa bajo el control de un promotor con preferencia tisular o de amplia expresión, la expresión puede evaluarse en toda la planta o en un tejido seleccionado. Similarmente, si un polipéptido se expresa en un momento particular, por ejemplo, en un momento particular del desarrollo o tras la inducción, la expresión puede evaluarse selectivamente en un periodo de tiempo deseado.

Sin limitación, las plantas descritas en la presente descripción pueden modificarse para otros propósitos lo mismo antes que después de modular la expresión o la actividad de la treonina sintasa. Una o más de las siguientes modificaciones genéticas adicionales pueden estar presentes en las plantas mutantes, de origen no natural o transgénicas de la descripción. En una modalidad, se modifican uno o más genes que están involucrados en la captación de metales pesados o el transporte de metales pesados lo que resulta en plantas o partes de plantas (tales como hojas) que tienen un menor contenido de metales pesados que las plantas control o partes de estas sin la(s) modificación(es). Los ejemplos no limitantes incluyen genes que pertenecen a la familia de facilitadores de la difusión de cationes (CDF), la familia de proteínas similares a Zrt, Irt (ZIP), la familia de intercambiadores de cationes (CAX), la familia de transportadores de cobre (COPT), la familia de ATPasas tipo P de metales pesados (HMA, como se describe en el documento WO2009074325), la familia de homólogos de proteínas de macrófagos asociadas a la resistencia natural (NRAMP), y la familia de transportadores de casetes de unión al ATP (ABC) que participan en el transporte de metales pesados. El término metal pesado como se usa en la presente descripción incluye metales de transición. En otra modalidad, se modifican uno o más genes que están implicados en la conversión de intermediarios metabólicos nitrogenados lo que da como resultado plantas o partes de plantas (tal como hojas) que cuando se calientan, producen niveles menores de al menos una nitrosamina específica del tabaco (por ejemplo, 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona, N-nitrosornicotina, N-nitrosoanatabina, y N-nitrosoanabasina) que las plantas control o partes de estas. Los ejemplos no limitantes de genes que puede modificarse incluyen genes que codifican una nicotina desmetilasa, tales como CYP82E4, CYP82E5 y CYP82E10 las cuales participan en la conversión de nicotina a nornicotina y se describen en los documentos WO2006091194, WO2008070274, WO2009064771 y PCT/US2011/021088.

Los ejemplos de otras modificaciones incluyen la tolerancia a herbicidas, por ejemplo, el glifosato es un ingrediente activo de muchos herbicidas de amplio espectro. Las plantas transgénicas resistentes a glifosato se han desarrollado al transferir el gen *aroA* (una glifosato EPSP sintetasa de *Salmonella typhimurium* y *E. coli*). Las plantas resistentes a la sulfonilurea se han producido al transformar el gen de *ALS* (acetolactato sintetasa) mutante de *Arabidopsis*. La proteína OB del fotosistema II del híbrido *Amaranthus* mutante se ha transferido a plantas para producir plantas transgénicas resistentes a la atrazina; y se han producido plantas transgénicas resistentes a bromoxinilo al incorporar el gen *bxn* de la bacteria *Klebsiella pneumoniae*. Otra modificación ilustrativa resulta en plantas que son resistentes a insectos. Las toxinas de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) pueden proporcionar una manera efectiva de retrasar la emergencia de pestes resistentes a *Bt*, como se ilustró recientemente en brócoli donde los genes de *Bt cry1Ac* y *cry1C* piramidales controlaron las polillas de dorso de diamante resistentes a cada proteína individual y retrasaron significativamente la evolución de insectos resistentes. Otra modificación ilustrativa resulta en plantas que son resistentes a enfermedades causadas por patógenos (por ejemplo, virus, bacterias, hongos). Se han diseñado plantas que expresan el gen *Xa21* (resistencia a tizón bacteriano) con plantas que expresan tanto un gen de fusión de *Bt* y un gen de quitinasa (resistencia al barrenador amarillo del tallo y tolerancia a la vaina). Otra modificación ilustrativa resulta en la capacidad reproductiva alterada, tal como la esterilidad masculina. Otra modificación ilustrativa resulta en plantas que son tolerantes a estrés abiótico (por ejemplo, sequía, temperatura, salinidad), y se han producido plantas transgénicas tolerantes al transferir la enzima de acil glicerol fosfato de *Arabidopsis*; los genes que codifican manitol deshidrogenasa y sorbitol deshidrogenasa que están implicados en la síntesis de manitol y sorbitol mejoran la resistencia a la sequía. Otra modificación ilustrativa resulta en plantas que producen proteínas que tienen propiedades inmunogénicas favorables para el uso en seres humanos. Por ejemplo, pueden usarse plantas capaces de producir proteínas que carecen esencialmente de residuos de fucosa con unión alfa-1,3, residuos de xilosa con unión beta-1,2, o ambos, en su N-glicano. Otras modificaciones ilustrativas pueden resultar en plantas con mejores proteínas y aceites de almacenamiento, plantas con mejor eficacia fotosintética, plantas con prolongada durabilidad, plantas con mayor contenido de carbohidratos, y plantas resistentes a hongos; plantas que codifican una enzima implicada en la biosíntesis de alcaloides. Se contemplan, además, plantas transgénicas en las que se ha modulado la expresión de S-adenosil-L-metionina (SAM) y/o cistationina gamma-sintasa (CGS).

Uno o más de tales rasgos pueden introgresarse en las plantas de tabaco mutantes, de origen no natural o transgénicas de la descripción a partir de otro cultivar de tabaco o pueden transformarse directamente en ellas. La

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

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

Varias modalidades proporcionan plantas mutantes, plantas de origen no natural o plantas transgénicas, así como biomasa en la cual se reduce el nivel de expresión del polinucleótido de NtTS para aumentar la concentración de metionina libre, particularmente en las hojas aunque no se limita a estas.

Las partes de tales plantas, particularmente plantas de tabaco, y más particularmente la lámina y el nervio central de las hojas de plantas de tabaco, pueden incorporarse o usarse para producir varios productos consumibles que incluyen pero no se limitan a materiales formadores de aerosol, dispositivos formadores de aerosol, artículos para fumar, artículos fumables, productos sin humo, y productos de tabaco. Ejemplos de materiales formadores de aerosol, particularmente materiales formadores de aerosol de nicotina, incluyen pero sin limitarse a composiciones de tabaco, tabacos, extracto de tabaco, tabaco cortado, relleno cortado, tabaco curado, tabaco expandido, tabaco homogeneizado, tabaco reconstituido y tabacos para pipas. Los artículos para fumar y los artículos fumables son tipos de dispositivos formadores de aerosol, que incluyen dispositivos formadores de aerosol de nicotina. Los ejemplos de artículos para fumar o artículos fumables incluyen pero no se limitan a cigarrillos, puritos y cigarros. Los ejemplos de productos sin humo comprenden tabacos de mascar, y rapé. En ciertos dispositivos formadores de aerosol, en lugar de la combustión, una composición de tabaco u otro material formador de aerosol se calienta mediante uno o más elementos de calentamiento eléctrico para producir un aerosol. En otro tipo de dispositivo formador de aerosol calentado, el aerosol se produce por la transferencia de calor de un elemento combustible carburante o fuente de calor a un material formador de aerosol separado físicamente, que puede estar localizado dentro, cerca, adyacente a o aguas abajo de la fuente de calor. Los productos de tabaco sin humo y los varios materiales formadores de aerosol que contienen tabaco pueden contener tabaco en cualquier forma, que incluye partículas secas, trizas, gránulos, polvos, o una suspensión, depositados, mezclados, rodeados por, o combinados de cualquier otra manera con otros ingredientes en cualquier formato, tal como hojuelas, capas, lengüetas, espumas, o perlas. Como se usa en la presente descripción, el término 'humo' se usa para describir un tipo de aerosol que se produce por los artículos de fumar, tales como cigarrillos (por ejemplo, humo de cigarrillos), o por combustión de un material formador de aerosol.

En una modalidad, se proporciona además material vegetal curado que incluye hojas curadas o partes vegetales curadas a partir de las plantas de tabaco mutantes, transgénicas y de origen no natural descritas en la presente descripción. Los procesos de curado de hojas verdes de tabaco se conocen por los expertos en la técnica e incluyen sin limitación curado al aire, curado al fuego, curado al humo y curado al sol. El proceso de curado de hojas verdes de tabaco depende del tipo de tabaco cosechado. Por ejemplo, el tabaco Virginia de humo (brillante) se cura típicamente al humo, Burley y ciertas cepas oscuras usualmente, se curan al aire, y el tabaco para pipa, el tabaco de mascar, y el rapé usualmente, se curan al fuego.

En otra modalidad, se describen productos de tabaco que incluyen materiales formadores de aerosol de nicotina o materiales formadores de aerosol que contienen tabaco, que comprenden hojas, preferentemente hojas curadas, obtenidas a partir de las hojas de plantas de tabaco mutantes, plantas de tabaco transgénicas o plantas de tabaco de origen no natural descritas en la presente descripción. Los productos de tabaco descritos en la presente descripción pueden ser un producto de tabaco mezclado que puede comprender, además, una o más de otras variedades de plantas de tabaco, que incluyen plantas de tabaco no modificadas.

El porcentaje de metionina libre en los materiales formadores de aerosol o en las composiciones de tabaco de la descripción tiene un valor de al menos aproximadamente 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, y 100 % mayor, cuando se

compara con materiales formadores de aerosol o composiciones de tabaco derivadas de las plantas contrapartes no mutantes, de origen no natural o no transgénicas.

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

10 La descripción proporciona, además, métodos para producir semillas que comprenden cultivar la planta mutante, planta de origen no natural, o planta transgénica descrita en la presente descripción, y recolectar las semillas de las plantas cultivadas. Las semillas de las plantas descritas en la presente descripción pueden acondicionarse y empacarse en material de empaque por medios conocidos en la técnica para formar un artículo de fabricación. Los materiales de empaque tales como papel y tela se conocen bien en la técnica. Un empaque de semilla puede tener una identificación, por ejemplo, una etiqueta o marcador asegurado al material de empaque, un marcador impreso en el material de empaque, o un marcador insertado dentro del empaque, que describe la naturaleza de las semillas en él.

20 Un aspecto adicional se refiere a un método para producir metional que comprende las etapas de: (a) proporcionar una parte de una planta mutante, de origen no natural o transgénica; biomasa, semilla u hojas; o los materiales formadores de aerosol como se describe en la presente; y (b) proporcionar calor a estos.

25 Las composiciones, métodos y kits para genotipar plantas para la identificación, selección o mejoramiento se abarcan en la descripción y pueden comprender un medio para detectar la presencia de un polinucleótido de NtTS en una muestra de polinucleótido. En consecuencia, se describe que una composición comprende uno de más cebadores para amplificar específicamente al menos una porción del polinucleótido de NtTS y opcionalmente una o más sondas y opcionalmente uno o más reactivos para llevar a cabo la amplificación o detección. En consecuencia, se describen cebadores o sondas de oligonucleótidos específicos de genes que comprenden aproximadamente 10 o más polinucleótidos contiguos que corresponden al polinucleótido de NtTS. Dichos cebadores o sondas pueden comprender o consistir en aproximadamente 15, 20, 25, 30, 40, 45 o 50 más polinucleótidos contiguos que hibridan (por ejemplo, hibridan específicamente) con el polinucleótido de NtTS. En algunas modalidades, los cebadores o sondas pueden comprender o consistir en aproximadamente 10 a 50 nucleótidos contiguos, aproximadamente 10 a 40 nucleótidos contiguos, aproximadamente 10 a 30 nucleótidos contiguos o aproximadamente 15 a 30 nucleótidos contiguos que pueden usarse en los métodos dependientes de secuencias para la identificación de genes (por ejemplo, hibridación Southern) o aislamiento (por ejemplo, hibridación *in situ* de colonias bacterianas o placas de bacteriófagos) o detección de genes (por ejemplo, como uno o más cebadores de amplificación en la amplificación o detección de ácidos nucleicos). El uno o más cebadores o sondas específicos pueden diseñarse y usarse para amplificar o detectar una parte o todo el polinucleótido de NtTS. Una manera de ejemplo específico, pueden usarse dos cebadores en un protocolo de reacción en cadena de la polimerasa para amplificar un fragmento de ácido nucleico que codifica un ácido nucleico de NtTS – tal como ADN o ARN. La reacción en cadena de la polimerasa puede realizarse, además, con el uso de un cebador que se deriva de una secuencia de ácido nucleico de NtTS y un segundo cebador que hibrida con la secuencia aguas arriba o aguas abajo de la secuencia de ácido nucleico de NtTS – tal como una secuencia promotora de NtTS, el extremo 3' del ARNm precursor o una secuencia derivada de un vector. Ejemplos de técnicas térmicas e isotérmicas útiles para la amplificación de polinucleótidos *in vitro* se conocen bien en la técnica. La muestra puede ser o puede derivarse de una planta, una célula vegetal o material vegetal o un producto de tabaco fabricado o derivado de la planta, la célula vegetal o el material vegetal como se describe en la presente descripción.

50 Por lo tanto, en otro aspecto, se proporciona, además, un método para detectar un polinucleótido de NtTS en una muestra que comprende las etapas de: (a) proporcionar una muestra que comprende, o se supone que comprende, un polinucleótido; (b) poner en contacto dicha muestra con uno de más cebadores o una o más sondas para detectar específicamente al menos una porción del polinucleótido de NtTS; y (c) detectar la presencia de un producto de amplificación, en donde la presencia de un producto de amplificación es indicativo de la presencia del polinucleótido de NtTS en la muestra. En un aspecto adicional, se proporciona además el uso de uno de más cebadores o sondas para detectar específicamente al menos una porción del polinucleótido de NtTS. Se proporcionan, además, kits para detectar al menos una porción del polinucleótido de NtTS, los cuales comprenden uno de más cebadores o sondas para detectar específicamente al menos una porción del polinucleótido de NtTS. El kit puede comprender reactivos para la amplificación de polinucleótidos, tal como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), o reactivos para la tecnología de detección por hibridación de sondas de ácidos nucleicos, tales como transferencias Southern, transferencias Northern, hibridación *in situ*, o microarreglo. El kit puede comprender reactivos para la tecnología de detección por unión de anticuerpos tal como membrana de Western, ELISA, espectrometría de masas SELDI o tiras de pruebas. El kit puede comprender reactivos para la secuenciación de ADN. El kit puede comprender reactivos y/o instrucciones para determinar el contenido de metionina, treonina y/o metional. En algunas modalidades, un kit puede comprender instrucciones para uno o más de los métodos descritos. Los kits descritos pueden ser útiles para la determinación de la identidad genética, estudios filogenéticos, determinación del genotipo, determinación del haplotipo, análisis de la genealogía o mejoramiento de plantas particularmente con puntuación co-dominante.

65 La presente descripción proporciona, además, un método para genotipar una planta, una célula vegetal o material



vegetal que comprende un polinucleótido de NtTS. El genotipado proporciona un medio para distinguir homólogos de un par cromosómico y puede usarse para diferenciar segregantes en una población de plantas. Los métodos de marcadores moleculares pueden usarse para estudios filogenéticos, caracterización de relaciones genéticas entre variedades de cultivo, identificación de cruces o híbridos somáticos, localización de segmentos cromosómicos que afectan rasgos monogénicos, clonación basada en mapas, y el estudio de herencia cuantitativa. El método específico de genotipado puede emplear cualquier número de técnicas analíticas de marcadores moleculares que incluyan polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP). Los AFLP son el producto de diferencias alélicas entre los fragmentos amplificados causadas por la variabilidad de secuencias de nucleótidos. Así, la presente descripción proporciona, además, un medio para seguir la segregación de un gen o ácido nucleico de NtTS así como secuencias cromosómicas genéticamente unidas a estos genes o ácidos nucleicos con el uso de técnicas tales como el análisis de AFLP.

La correlación entre la metionina producida en las plantas que resultan del silenciamiento de la treonina sintasa, y los compuestos químicos encontrados en el tabaco curado se han monitoreado en las hojas curadas mediante el uso de espectrometría de masa. Los perfiles de espectrometría de masa de los extractos vegetales indican que el silenciamiento de la treonina sintasa en plantas conduce a cambios en las plantas ya que cuatro picos mostraron perfiles alterados en líneas con silenciamiento de treonina sintasa en comparación con los extractos de plantas control (véase la figura 1). Tres picos aumentan en abundancia, mientras que uno se reduce en abundancia. Estos cambios en el perfil pueden usarse para identificar plantas en las que los niveles de metional en aerosol probablemente estén aumentados. En consecuencia, en otro aspecto, se proporciona un método para identificar material de tabaco que libera niveles elevados de metional en un aerosol después de calentar, el método comprende las etapas de: (a) preparar una muestra de material de tabaco; (b) determinar el perfil de masa molecular de la muestra; y (c) comparar el perfil de masa molecular en una o más de una relación de masa:carga con el de una planta control; en donde un cambio específico en la relación de masa:carga en comparación con una planta control es indicativo de que los niveles de metional en el aerosol son elevados. De manera adecuada, la masa molecular se mide mediante espectrometría de masa, preferentemente, cromatografía líquida-espectrometría de masa (LC-MS), cromatografía gaseosa-espectrometría de masa (GC-MS). En otro aspecto, se proporciona material de tabaco identificado o identificable mediante este método.

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

## Ejemplos

Ejemplo 1: Identificación de treonina sintasa de tabaco

El gen de treonina sintasa de tabaco se identifica mediante el uso de secuencias EST de tabaco encontradas en la Iniciativa del Genoma de Tabaco. Otro cóntigo EST de tabaco (NCBI\_45312-v2pep-fl) cerca de la treonina sintasa de tabaco se ensambla a partir de las secuencias EST del NCBI. Esta secuencia codificante tiene exactamente la misma longitud (1569 pb) que la treonina sintasa de tabaco. Los datos mediante el uso de chips de exones por microarreglo de ADN de Affymetrix (sondas de secuencias de NtPmla1g193542e1) muestran que la treonina sintasa de tabaco se expresa igualmente en raíces, tricomas, hojas verdes y senescentes de *N. tabacum*. No se encontraron cambios importantes en los niveles de expresión génica entre las hojas de tabaco curado en atmósfera artificial (K326, K399) y Burley (TN90, Bu64). Además, el estrés por frío y cadmio no afecta los niveles de expresión de la treonina sintasa de tabaco, lo que indica así que esta treonina sintasa muy probablemente se expresa constitutivamente en la hoja de tabaco.

Ejemplo 2: Sobreexpresión de cistationina gamma-sintasa (CGS)

La CGS de *Arabidopsis thaliana* (MT01, Acceso TAIR AT3901120) se introduce bajo el control transcripcional del promotor de 35S del virus del mosaico de la coliflor en el tabaco Burley TN90 por medio de *Agrobacterium tumefaciens* mediante el uso de un procedimiento clásico de disco de hoja como se describe en la literatura. El gen de selección para el antibiótico canamicina también se inserta.

Ejemplo 3: Silenciamiento de la expresión de treonina sintasa en plantas de tabaco

Con el uso de un fragmento de ADN de sec. con núm. de ident.:1, se generan cebadores para silenciar la NtTS en tabaco mediante el uso de un enfoque de ARNi. Los cebadores usados son 5'-ctgaaatcgacagcgatgata-3' (sec. con núm. de ident.: 9) y 5'-caaccaatagctaacggagctt-3' (sec. con núm. de ident.: 10). La secuencia de ARNi correspondiente se amplifica a partir del ADNc mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) y después se inserta en el vector de Gateway pB7GWIWG2(II) por medio de un vector de entrada, exactamente como se detalla por el fabricante (Invitrogen). Este vector contiene un promotor para la expresión constitutiva (el promotor de 35S del virus del mosaico de la coliflor CaMV) del transgén en todos los tejidos de la planta y el gen de canamicina para la selección con el antibiótico canamicina en placas de agar (100 mg/ml). La construcción se inserta después en el genoma del tabaco Burley TN90 a través de *Agrobacterium tumefaciens* con

el uso de un procedimiento clásico de disco de hoja. A partir de los callos, se regeneran líneas individuales y se seleccionan en canamicina. Las líneas T0 con silenciamiento por ARNi se monitorean mediante (i) RT-PCR y se cultivan para la producción de semillas en ADN genómico mediante el uso de un cebador en el promotor de 35S (5'-gagcatcgtagctattggttg -3') y un cebador dentro del fragmento usado para el silenciamiento (5'-aagctccgtagctattggttg -3') y mediante (ii) RT-PCR mediante el uso de cebadores específicos que flanquean el inserto usado para el silenciamiento (5'-ttgattcacgtgtcggtaagac-3') y se cultivan para la producción de semillas. Las semillas T1 se recolectan, se cultivan de nuevo en placas de agar que contiene canamicina y se monitorean exactamente como las plántulas T0. La PCR en ADN genómico muestra que el fragmento de ADN de NtTS se inserta en el genoma y silencia eficazmente la treonina sintasa de tabaco.

#### Ejemplo 4: Cultivo de plantas de tabaco con silenciamiento de treonina sintasa

Las plantas resistentes a la canamicina se cultivan en bandejas flotantes antes del cultivo en el campo (Kentucky, Estados Unidos). Veinte plantas de la línea con silenciamiento de treonina sintasa (línea NtTS-ARNi; ejemplo 2), la línea de cistationina gamma-sintasa (ejemplo 3), un control de vector (VC, pB7GWIWG2(II)) y un tabaco de fondo US TN90 se cultivan en cuatro réplicas de 20 plantas. Tres meses después del trasplante al campo (36 días después del desmoche), se toman muestras de una hoja en posición media del tallo en 10 plantas idénticas de las 20 para cada réplica. Las hojas ("hojas verdes") se almacenan inmediatamente en hielo seco y se liofilizan. Se seleccionan diez plantas de las dos mejores líneas y después se curan de acuerdo con las prácticas agrícolas de Burley. Después del curado, se toman muestras de tres hojas en la posición media del tallo. Para monitorear el efecto de silenciamiento en las líneas con silenciamiento de treonina sintasa y para comparar con las líneas de cistationina gamma-sintasa, las "hojas verdes" de tres líneas se trituran y se someten a un análisis de aminoácidos libres.

#### Ejemplo 5: Análisis de metional

La correlación entre la metionina producida en las hojas verdes, resultante del silenciamiento de la treonina sintasa, y los compuestos químicos encontrados en el tabaco curado se monitorean en hojas curadas mediante LC-MS con el uso de las líneas descritas anteriormente. La extracción se realiza en metanol. El equipo usado es un sistema UPLC de Waters Acquity acoplado a MS. La columna es una RP18 Shield de WatersXBridge usando como fase móvil A agua:acetonitrilo (95:5 v/v) y como fase móvil B metanol. Los perfiles de LC-MS indican que el silenciamiento de la treonina sintasa en las hojas verdes conduce a una señal química en las hojas curadas. De hecho cuatro picos mostraron perfiles alterados en las líneas con silenciamiento de treonina sintasa en comparación con los controles (véase la figura 1). Tres picos aumentan claramente en abundancia, mientras que uno se reduce. Esto sugiere que la metionina que se acumula en las hojas verdes es convertida a productos con azufre para la degradación o derivados de la metionina en las hojas curadas.

Dado que la metionina es un posible precursor del metional, analizamos el contenido de metional en el aerosol formado después de calentar tabaco curado (réplicas presentadas seleccionadas de TN90, VC, NtTS-1, NtTS-1 y NtTS-3) y sometido a trampa de frío. La plataforma para fumar usada es un simulador para fumar con una fuente de calor de tipo Macor (54W) que incluye un régimen de 12 caladas de 2 s. Antes de fumar, la lámina curada de tabaco se cortó e impregnó con glicerina al 20 %. Los aerosoles producidos por calentamiento de tabacos curados impregnados (100 mg, 3 réplicas completas) se condensaron mediante el uso de un sistema criogénico desarrollado por Air Liquid y se disolvieron en diclorometano (2 veces 5 ml). Los niveles de metional en soluciones de aerosol se determinaron mediante GC-MS después de la derivatización. El ión que produjo la señal más abundante se usó para adquirir datos cuantitativos en modo de Monitoreo de un solo ión (SIM).

La correlación entre la metionina producida en las hojas verdes, resultante del silenciamiento de la treonina sintasa, y los compuestos químicos encontrados en el tabaco curado se ha monitoreado en las hojas curadas mediante LC-MS con el uso de las líneas de réplicas descritas anteriormente. La extracción se realizó en metanol. El equipo usado es un sistema UPLC de Waters Acquity acoplado a MS. La columna fue una RP18 Shield de WatersXBridge usando como fase móvil A agua:acetonitrilo (95:5 v/v) y como fase móvil B metanol. Los resultados se presentan en la tabla 1.

Como se muestra en la tabla 1, las plantas NtTS-ARNi no mostraron ninguna diferencia visual con respecto a las plantas control. Por ejemplo, la altura de las plantas y el contenido de clorofila en las plantas de tabaco con silenciamiento de treonina sintasa fueron casi idénticos a los de las plantas control. La concentración de metionina libre en las hojas verdes de las plantas de tabaco con silenciamiento de treonina sintasa fue mayor que en las plantas control. La concentración de metional en aerosol fue mucho mayor en las plantas de tabaco con silenciamiento de treonina sintasa que en las plantas control. El contenido de treonina de las hojas verdes mostró una reducción de más del 20 % en las plantas de tabaco con silenciamiento de treonina sintasa en comparación con las plantas control.

#### Ejemplo 6: Análisis de la expresión de treonina sintasa en las líneas de tabaco NtTS-ARNi

Las secs. con núms. de ident.: 1, 2, 3 y 20 se alinean sobre un consenso de 1587 bases desde el codón de iniciación hasta el codón de parada. Las regiones de los fragmentos que son homólogas entre las secs. con núms.

de ident.: 1, 2 y 3 y diferentes de la sec. con núm. de ident.:20 son los nucleótidos 1-46 de las secs. con núms. de ident.: 1, 2 y 3 y los nucleótidos 1-52 de la sec. con núm. de ident.:20; los nucleótidos 99-141 de la sec. con núm. de ident.:1, los nucleótidos 102-144 de la sec. con núm. de ident.: 2 y la sec. con núm. de ident.:3 y los nucleótidos 102-153 de la sec. con núm. de ident.:20; y los nucleótidos 1325-1362 de las secs. con núms. de ident.: 1, 2 y 3 y los nucleótidos 1334-1371 de la sec. con núm. de ident.:20. Estas secuencias se usan para diseñar cebadores específicos para las secs. con núms. de ident. 1, 2, 3. Se diseña además un conjunto de cebadores específicos para la sec. con núm. de ident.: 20.

Las líneas NtTS-ARNi se preparan mediante el uso de regiones correspondientes a los nucleótidos 454-805 de la sec. con núm. de ident.:1; los nucleótidos 454-805 de la sec. con núm. de ident.: 2; los nucleótidos 456-805 de la sec. con núm. de ident.:3 y los nucleótidos 463-814 de la sec. con núm. de ident.:20. 3 plantas individuales de 3 líneas NtTS-ARNi independientes (NtTS1, NtTS2 y NtTS3), que expresan positivamente el(los) transgén(es) para el silenciamiento por ARNi (analizadas mediante PCR para determinar la presencia del promotor de 35S en el ADNg) se someten a semi-RT-PCR cuantitativa mediante el uso de los cebadores específicos para las secs. con núms. de ident.: 1, 2 y 3 y cebadores específicos para la sec. con núm. de ident.: 20. La tubulina se usa como un control para la expresión de genes constitutivos. 3 plantas TN90 de Burley se usan como un control para la expresión de los transcritos relacionados con las secs. con núms. de ident.: 1, 2, 3 y 20.

El uso de cebadores específicos para las secs. con núms. de ident.: 1, 2 y 3, o cebadores específicos para la sec. con núm. de ident.: 3 solamente, o cebadores específicos para las secs. con núms. de ident.: 1 y 2 solamente en RT-PCR semicuantitativa indica que ha ocurrido un silenciamiento parcial en la expresión de treonina sintasa en cada una de las 3 líneas NtTS-ARNi independientes en comparación con el control. El uso de cebadores específicos para la sec. con núm. de ident.: 20 indica que ha ocurrido un silenciamiento parcial en las plantas NtTS-ARNi y que el nivel de silenciamiento es menor que el logrado para las secs. con núms. de ident.: 1-3. Se observó que el silenciamiento fue más eficaz para la sec. con núm. de ident.:3 que para la sec. con núm. de ident.:20, aunque el % de identidad de secuencia entre las secuencias es idéntico.

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

Tabla 1

	Sobreexpresión de CGS	TN90	VC	Línea NtTS-ARNi
Altura del tallo (cm)	127	121	137	123
Contenido de clorofila (unidad arbitraria)	17	18	17	18

ES 2 685 797 T3

Concentración de metionina libre en hojas verdes (mg/g)	Línea 1: 0,025 (0,008)  Línea 2: 0,022 (0,016)	0,025 (0,004) (promedio)	0,017 (0,003) (promedio)	Línea 1: 0,032 (0,013)  Línea 2: 0,034 (0,006)
Concentración de treonina libre en hojas verdes (mg/g)	Línea 1: 0,876 (0,221)  Línea 2: 1,091 (0,087)	0,851 (0,053)	0,915 (0,110)	Línea 1: 0,567 (0,051)  Línea 2: 0,609 (0,022)
Concentración de metional en aerosol (µg/g)	na	916	1400	Línea 1: 3822  Línea 2: 2200

Secuencias

Sec. con núm. de ident.:1 (secuencia de ADN de treonina sintasa de *N. tabacum*)

5  
atggcggctctttcatgctcagatctctctctctctctctctgttccaactccatcaccaatcccctccaatctaatacactattcacttcattaatcaatcaaagcc  
accgcctctacaaatgacgcaattgcccctcccaaaagcaccgccgcccgcgacgaaaacatccgcgaagagggcggcgccgcccgcacctcctcccaca  
atctcggccaggtacgttctttcaatgccgaccccagctccgacgaatggtattctctcgatgaaattatataccggagccgctccgggtgattgatgttcagcat  
10 gatatgacgctctgaagaaattgatggccagattggcggctcactgtttgattcacgtgctcggtaagaccacgtggccgtacgggtcaggcgtttggctaaaaagga  
atgggtcctacgaaatcgacagcagatgataattgtagtctttgaaggaaactctaactgtttgggctgagcgtttggcaaacagttctagccatgagtactatg  
ggtaaaacactgtggaatcagccatacgggtagtttaaggatctgggtatgaccgtttgtgagtcaagtgaaccggtaaggaaaatgcataaacagggttaggt  
gtgggtctgctccactggtgacacgtcagctcattgtcagcttactgtgcatctcggggattccatccattgtatttaccagcaataagatatctatggcgcagct  
ggtaacaaccaatagctaaccgagctttgtgtgattgacaccgattttgatggtgtatgcagttgattcgcgaagtcactgcagagttgcctattactggcgaattc  
15 gttgaatagttgaggttagaaggcacaagactgcagcaattgagattttgcagcagttgatggcaagtagccgatgggtgatagtagcctggagggaactgggt  
aataatagctttctataaagggtttatgatgtgcagagagttgggctagttgaccgtatccctaggctgtgtgtgtcaagcagtaacgctaactccttactgcatt  
ataaatccgggtgaaagactttcaaccgtgaaggcgaacaccacatttgcattctctatacagattggtgatccagtgctatagatagagctgttttgcctgaaga  
actgtgacgggatagttgaggaggcaaccggaggagttgatgtagctatggctcaggcagactcaactgggatgctcattggcccgcacactgggtggcattg  
actgcctgttcaagttgagaacagtgagttattggacaaaatgataagactgtggtgtgagtagcagcactgagttgaagttactcaatcaaagattgattacca  
20 ctcaaaggaaataaaggacatggaatgctggtttgtaaccacctgtggaagtgaagcagattttggatcagtcattgatttcaagaataattgttgagcaaa  
aatgccaagcactga

Sec. con núm. de ident.:2 (secuencia de ADN de treonina sintasa de *N. tabacum* (Hicks Broad Leaf) que también está presente en *Nicotiana sylvestris*)

25  
atggcggctctttcatgctcagatctctctctctctctctctcccaactccatcaccaatcccctccaatctaatacactattcacttcattaatcaatcaaagc  
caccgcctctacaaatgacgcaattatccctcccagaacatcgtcggcccgcgacgaaaacatccgcgaagagggcggcgccgcccacctcctcccaca  
atctcggccaggtacgttctttcaatgccgaccccagctccgacgaatggtattctctcgatgaaattatataccggagccgctccgggtgattgatgttcagcat  
gatatgacgctctgaagaaattgatggccagattggcggctcactgtttgattcacgtgctcggtaagaccacgtggccgtacgggtcaggcgtttggctaaaaagga  
30 atgggtcctacgaaatcgatagtgatgataattgtagtctttgaaggaaactctaactgtttgggctgagcgtttgtaaacagttctagccatgagtactatg  
gtaaaacactgtggaattagccatacaggtagtttaaggatctgggtatgaccgtttgtgagtagcaagtgaaccggtaaggaaaatgcataaacgggtgtgtgtg  
ggcgtgtctccactggtgacacgtcagctcattgtcagcttactgtgcatctcggggattccatcagttgtattttaccctgcaataagatatctatggcgcagctggt

acaaccgatagctaaccggagctttgtgtgagcattgacaccgatttgatggtgtatgagttgattcgtggaagtcactgctgagttgccaatttactggcgaattcttg  
aatagttgagggttagaaggcacaagactgcagcaattgagatttgcagcagtttgattggcaagttcccggattgggtgatagttcctggaggttaactgggtaataata  
tatcgcttataaaggtttatgatgtgcaaagagttgggctcgttgatcgtatccctaggcttggtgtgctcaagcagtaaccgtaacccgcttactgcatataaat  
5 ccggttgaaagactttcaaccggtgaaggcgaacaccacatttgcactctgatacagattggtgaccagtgctatagatagagctgttttccctgaagaactgt  
gacgggatagtgaggaggcaacggaggaggattgatggatgctatgctcaggcagactcaactgggatgttcatttggccgcactgggtggcattgactg  
ccctgtcaagttgagaaacagtgaggatcctggccaaatgataagactgtggtgtgagtagacacatggattgaagttactcaatcaagattgattaccactca  
aaggaaataaaggacatggaatgctggttctaacccacctgtggaagtgaagcagatttggatcagtcagtgatgttcaagaataatttggagcaaaaatg  
ccaagcactga

10 Sec. con núm. de ident.:3 (secuencia de ADN de treonina sintasa de *N. tabacum* (Hicks Broad Leaf))

atggcgcttcttcatgctcagatcttcttctctctctctcccaactccatcaccatctcctctaaatccaatcccactattcacttcatcaatccaatcaaaagc  
caccgctctacaatgacgcaattatccctcccagaacaccgcccctgcccagcaaaatcccggaagaggccgctcgcgccccacctctcccaca  
atfttcccgcaggtacgtgcttcaatgcgatccaagctccgatgaatggtattctctcgatgaaatcatctaccggagccgctcggcgccacttctgatttcaac  
15 atgataggacgctttaaanaagttgacggcagactggaggtcacttttgattcagctgctggaagacgacgtggccttaccgggtcaggtgtttggctaaagaag  
aatgggtcctaccgaaatcgatagtgatgattgtgctttgaggaaactcaaatcttttgggctgagcgtttggcaaacagttctaggcatgagtgattatg  
ggtaaaactgtggaattagtcatacaggtagtttaaggatctaggatgactgtttggtgagtcagtgaaaccggttaaggaaaatgcataaaccggtgtgtgtg  
gggctgtctccactgtgacacgtcagctgactgtcagcttactgtcagctgctgggattccatcgattgtattttaccctgcaataagatctatggcgacgtggt  
acaaccgatagctaaccggagctttgtgtgagcattgacaccgatttgatggtgtatgagttgattcgtggaagtcactgctgagttgccaatttactggcgaattcgtt  
20 gaatagttgaggttagaaggcacaagactgcagcaattgagatttgcagcagtttgattggcaagttcccggattgggtgatagttcctggagggaactgggtaata  
tatatgcttataaaggtttatgatgtgcaaagagttgggctcgttgatcgtatccctaggcttggtgtgctcaagcagtaaccggaatccgcttatttgcattataa  
atccggttgaaagacttcaaccggtgaaggcgaacaccacatttgcactctgatacagattggtgaccagtgctatagatagagctgttttccctgaagaact  
gtgacgggatagtgaggaggcaacagaggaggattgatgctatggcctaaaggcagactgactggatgttatttcccgcacactgggtgtgacattgact  
gcctgttcaagttgagaacagtgaggattatcgaccaaatgataagaccgtggtgtgagtagacacatggattgaagttactcaatcaagattgattactc  
25 aaaggaaataaaggacatggaatgctggttctaacccacctgtggaagtgaagcagatttggatcagtcagtgatgttcaagaataatttggagcaaaaatg  
ccaagcactga

Sec. con núm. de ident.:4 (Secuencia de ADN genómico de la sec. con núm. de ident.: 3)

cgagctgctttaaactattttgcagactccattaatggcggcttcttcatgctcagatcttctctctctctctctcccaactccatcaccatctcctctaaatccaat  
cccactattcacttcatcaatccaatcaaagccaccgctctacaatgacgcaattatccctcccagaacaccgcccctcgcgacgaaaatcccggaag  
aggcgcctcgcgccccacctctcccacaatttctcggcaggtatgtaggggaagataactagcgaatgaatagataaagcaaaatgaaatagtggtct  
aaaattacaataatttactcatttctatgctgacatcaaaaagtgctgctatgctcactgcaggtacgtgcttcaatgcggtccaagctccgatgaatgg  
tattctctcgatgaaatcatctaccggagccgctcggcgccctacttgatgttcaacatgatagggcgtttaaanaagttgacggcagtcagttggggtcacttttg  
35 atcacgtgctgggaagacgacgtggccttaccgggtcaggtgtttggttcaagaaggaatgggtcctaccgaaatcgatagtgatgattgttagtctttgaagga  
aactcaaatcttttgggtgagcgttttgcaaacagtttctaggcatgagtgattatgggtaaaactgtggaattagtcatacaggtagtttaaggatctaggatg  
actgtttggtgagtcagtgaaaccggttaaggaaaatgcataaaccggtgtgtgtggtgcttccactgggtgacacgtcagctgattgtcagcttactgtcag  
ctgcccgggattccatcgattgtattttaccctgcaataagatactatggcgcagctggtacaaccgatagctaacggagctttgtgtgagcattgacaccgatttgc  
ggtgtatgacgtgattcgtgagtcactgctgagttgccaatttactggcgaattcgttgaatagttgagggtagaaggcacaagactgcagcaattgagatttgc  
40 agcagttgattgcaagttcccggattgggtgatagttcctggaggaaactgggtaataatagcgttctataaaggtttatgatgtgcaaagagttgggctcgttgc  
cgtatccctaggctgtgtgctcaagcagcctaaccgcaatccgcttatttgcattataaactccggttggaaagacttcaaccggtgaaggcgaacaccacattgca  
tctgctatacagattggtgaccagtgctatagatagagctgttttgcctgaagaactgtgacgggatagtgaggaggcaacagaggaggattgatggatgcta  
tggtaagcagactcagctgggatgttctttgcccgcacactgtgtgacattgactcactggttcaagttgagaaacagtgaggattatcgaccaaatgataagac  
cgtgtgtgagtagcagcatggattgaaagttactcaatcaaaagatttactcactcaaggttaaaaggaacatggaatgctggttctaacccacctgtgga  
45 gtgaaagcagatttggatcagtcagtgatgttctcaagaataatttggagcaaaaatccaagcactga

Sec. con núm. de ident.:5 (Secuencia de ADN genómico de treonina sintasa de *Nicotinia tomentosiformis*)

cgagctgctttaaactattttgcagactccattaatggcggcttcttcatgctcagatatttctctctctctctctcccaactccatcaccatctcctctaaatccaat  
cccactattcacttcatcaatccaatcaaagccaccgctctacaatgacgcaattatccctcccagaacaccgcccctcgcgacgaaaatcccggaag  
aggcgcctcgcgccccacctctcccacaatttctcggcaggtatgtaggggaagataactagcgaatgaatagataaagcaaaatgaaatagtggtct  
aaaattacaataatttactcatttctatgctgacatcaaaaagtgctgctatgctcactgcaggtacgtgcttcaatgcggtccaagctccgatgaatgg  
tattctctcgatgaaatcatctaccggagccgctcggcgccctacttgatgttcaacatgatagggcgtttaaanaagttgacggcagtcagttggggtcacttttg  
50 atcacgtgctgggaagacgacgtggccttaccgggtcaggtgtttggttcaagaaggaatgggtcctaccgaaatcgatagtgatgattgttagtctttgaagga  
aactcaaatcttttgggtgagcgttttgcaaacagtttctaggcatgagtgattatgggtaaaactgtggaattagtcatacaggtagtttaaggatctaggatg  
actgtttggtgagtcagtgaaaccggttaaggaaaatgcataaaccggtgtgtgtggtgcttccactgggtgacacgtcagctgattgtcagcttactgtcag  
ctgcccgggattccatcgattgtattttaccctgcaataagatactatggcgcagctggtacaaccgatagctaacggagctttgtgtgagcattgacaccgatttgc  
ggtgtatgacgttgcagttcgtgagtcagctgagtgccaatttacttctgcaatgctggaatgctggaatgctggaatgctggaatgctggaatgctggaatgctgga  
55 agcagttgattgcaagttcccggattgggtgatagttcctggaggaaactgggtaataatagcgttctataaaggtttatgatgtgcaaagagttgggctcgttgc  
cgtatccctaggctgtgtgctcaagcagcctaaccgcaatccgcttatttgcattataaactccggttggaaagacttcaaccggtgaaggcgaacaccacattgca  
tctgctatacagattggtgaccagtgctatagatagagctgttttgcctgaagaactgtgacgggatagtgaggaggcaacagaggaggattgatggatgcta  
tggctcaggcagactcagctgggatgttctttgcccgcacactgtgtgacattgactcctcctggttcaagtcgagaacagtgaggattatcgaccaaatgataaga  
ccgtggtgtgagtagcagcatggattgaagttactcaatcaaaagattatcactcaaaagaaataaaggacatggaatgctggttctaacccacctgtgga  
60 agtgaagcagatttggatcagtcagtgatgttctcaagaataatttggagcaaaaatccaagcactga

Sec. con núm. de ident.:6 (Secuencia traducida de la sec. con núm. de ident.: 1)

MAASFMLRSSFLSPPCSQLHHQSPSKSNHIIHFINPIKATASTNDIAIPPQKHRRPADENIREEAARRRTSSHNFSAARY  
VPFNADPSSDEWYSLDEIYRSRSGLLDVQHDMDALKKFDGQYWRSLFDSRVGKTTWPYGGVWSKKEWVLPEID  
SDDIVSAFEGNSNLFWAERFGKQFLGMSDLWVKHCGISHTGSFKDLGMTVLVSQVNRLRKMHPVVGVCAGTGD  
5 SAALSAYCASAGIPSIVFLPANKISMAQLVQPIANGAFVLSIDTDFDGMQLIREVTAELPIYLANSLNSLRLEGQKTAIE  
ILQQFDGKVPDWVIVPGGNLGNIAFYKGFMMCRELGLVDRIPLVCAQAANANPLYLHYKSGWKDFQPVKANTTFA  
SAIQIGDPV SIDRAV FALKNCDGIVEEATEEELMDAMAQADSTGMFICPHTGVALTALFKLRNSGVIGPNDKTVVSTA  
HGLKFTQSKIDYHSKEIKDMECRFANPPVEVKADFGSVMDVLKLYLLSKNAKH

Sec. con núm. de ident.:7 (Secuencia traducida de la sec. con núm. de ident.: 2)

MAASFMLRSSFLSPPSPQLHHQSPSKSNHTIHFINPIKATASTNDIAIPPQKHRRPADENIREEAARRPTSSHNFSAARY  
VPFNADPSSDEWYSLDEIYRSRSGLLDVQHDMDALKKFDGQYWRSLFDSRVGKTTWPYGGVWSKKEWVLPEID  
SDDIVSAFEGNSNLFWAERFGKQFLGMSDLWVKHCGISHTGSFKDLGMTVLVSQVNRLRKMHPVVGVCAGTGD  
15 SAALSAYCASAGIPSIVFLPANKISMAQLVQPIANGAFVLSIDTDFDGMQLIREVTAELPIYLANSLNSLRLEGQKTAIE  
ILQQFDWQVPDWVIVPGGNLGNIAFYKGFMMCKELGLVDRIPLVCAQAANANPLYLHYKSGWKDFQPVKANTTFA  
SAIQIGDPV SIDRAV FALKNCDGIVEEATEEELMDAMAQADSTGMFICPHTGVALTALFKLRNSGVIGPNDKTVVSTA  
HGLKFTQSKIDYHSKEIKDMECRFANPPVEVKADFGSVMDVLKLYLLSKNAKH

Sec. con núm. de ident.:8 (Secuencia traducida de la sec. con núm. de ident.: 3)

MAASFMLRSSFLSPPSPQLHHQSPKSNPTIHFINPIKATASTNDIAIPPQKHRRPADENIREEAARRPTSSHNFSAARYV  
PFNADPSSDEWYSLDEIYRSRSGLLDVQHDMDALKKFDGQYWRSLFDSRVGKTTWPYGGVWSKKEWVLPEIDS  
DDIVSAFEGNSNLFWAERFGKQFLGMSDLWVKHCGISHTGSFKDLGMTVLVSQVNRLRKMHPVVGVCAGTGDTS  
25 AALSAYCASAGIPSIVFLPANKISMAQLVQPIANGAFVLSIDTDFDGMQLIREVTAELPIYLANSLNSLRLEGQKTAIEI  
LQQFDWQVPDWVIVPGGNLGNIAFYKGFMMCKELGLVDRIPLVCAQAANANPLYLHYKSGWKDFQPVKANTTFA  
SAIQIGDPV SIDRAV FALKNCDGIVEEATEEELMDAMAKADSTGMFICPHTGVALTALFKLRNSGVIGPNDKTVVSTA  
HGLKFTQSKIDYHSKEIKDMECRFANPPVEVKADFGSVMDVLKLYLLSKNAKH

Sec. con núm. de ident.:9 (Cebador)

ctgaaatcgacagcgatgata

Sec. con núm. de ident.:10 (Cebador)

caaccaatagctaacggagctt

Sec. con núm. de ident.:11 (Cebador)

gagcatcgtggaaaagaagac

Sec. con núm. de ident.:12 (Cebador)

aagctccgttagctattggtg

Sec. con núm. de ident.:13 (Cebador)

ttgattcacgtgctgtaagac

Sec. con núm. de ident.: 14 (secuencia de ARNi usada para silenciar la treonina sintasa)

ctgaaatcgacagcgatgatattgtagtctttgaaggaaactctaatctgtttgggctgagcgtttggcaaacagttttaggcatgagtgacttatgggtaaacac  
tgtggaatcagccatacaggttagtttaaggatctgggtatgaccgttttggtgagcaagtgaaccggttaaggaaaatgcataaacaggttaggtgtgggctgtgc  
ttccactggtgacacgtcagctgattgtcagcttactgtgcatctgcggggattccatccattgtattttaccagcaataagatatctatggcgacgtggtacaacca  
55 atagctaacggagctt

Sec. con núm. de ident.: 15 (secuencia de ARNi usada para silenciar la treonina sintasa)

ctgaaatcgatagtgatgatattgtagtctttgaaggaaactctaatctgtttgggctgagcgtttggtaaacagttttaggcatgagtgacttatgggtaaacact  
gtggaatagccatacaggttagtttaaggatctgggtatgaccgttttggtgagcaagtgaaccggttaaggaaaatgcataaacggttaggtgtgggctgtgctt  
60 ccactggtgacacgtcagctgattgtcagcttactgtgcatctgcggggattccatccattgtattttaccagcaataagatatctatggcgacgtggtacaaccgat  
agctaacggagctt

Sec. con núm. de ident.: 16 (secuencia de ARNi usada para silenciar la treonina sintasa)

ccgaaatcgatagtgatgatattgtagtctttgaaggaaactctaatctgtttgggctgagcgtttggcaaacagttttaggcatgagtgattatgggtaaacact  
gtggaatagtcatacaggttagtttaaggatctaggatgactgttttggtgagcaagtgaaccggttaaggaaaatgcataaacggttaggtgtgggctgtgctt

caactggtgacacgtcagctgcattgtcagcttactgtgcatctgcggggattccatcgattgtatcttttacctgcaaataagatatctatggcgagctggtacaaccgata  
gctaaccggagctt

5 Sec. con núm. de ident.: 17 (secuencia de ARNi usada para silenciar la treonina sintasa)

ccgaaatcgatagtgatgatattgtagtgccttgaaggaaactcaaatcttttgggctgagcgctttggcaaacagtttctagggcatgagtgattatgggtaaaact  
gtggaattagtcatacaggtagtttaaggatctaggtatgactgcttttggtagtcaagtgaaaccgggtaaggaaaatgcataaacgggttgggtggtggctgtgctc  
cactggtgacacgtcagctgcattgtcagcttactgtgcatctgcggggattccatcgattgtatcttttacctgcaaataagatatctatggcgagctggtacaaccgata  
gctaaccggagctt

10 Sec. con núm. de ident.: 18 (secuencia de ARNi usada para silenciar la treonina sintasa)

ccgaaatcgatagtgatgatattgtagtgccttgaaggaaactcaaatcttttgggctgagcgctttggcaaacagtttctagggcatgagtgattatgggtaaaact  
gtggaattagtcatacaggtagtttaaggatctaggtatgactgcttttggtagtcaagtgaaaccgggtaaggaaaatgcataaacgggttgggtggtggctgtgctc  
cactggtgacacgtcagctgcattgtcagcttactgtgcatctgcggggattccatcgattgtatcttttacctgcaaataagatatctatggcgagctggtacaaccgata  
gctaaccggagctt

15 Sec. con núm. de ident.: 19 (secuencia de ARNi usada para silenciar la treonina sintasa)

Ctgaaatcgatagtgatgatattgtagtgccttgaaggaaactcaaatcttttgggctgagcgctttggtaaacagtttctagggcatgagtgacttattgggtaaaact  
gtggaattagtcatacaggtagtttaaggatctgggtatgaccgcttttggtagtcaagtgaaaccgggtaaggaaaatgcataaacgggttgggtggtggctgtgctc  
cactggtgacacgtcagctgcattgtcagcttactgtgcatctgcggggattccatcgattgtatcttttacctgcaaataagatatctatggcgagctggtacaaccgata  
agctaaccggagctt

20 Sec. con núm. de ident.: 20 (secuencia de ADN de otra treonina sintasa de *N. tabacum*)

atggcggcttctcaactgcatgttcagatcctcttctctcccaatctccatccaagcaacaatcccctgctaa  
atccaacggcgctcagttctcactcctattaaagccacagcttctctacagatgatgcaatctccgcatctacacaac  
ctcaaaaacaccgcccctctgtagagaacatccgtgagggaagcccgccacatctctccacaatttctctgcc  
30 aggtatgtgcctttaaaccgacccaactccagtgagtggtattctctcgcagagatcattaccgacggcctccgg  
tggctactgtatgaccagcatgatatggacgctcacaagaagttgatggcagctactggcgctccctgtttgattccc  
gggtggcaagaccacttggccttattggttctgggttggccaagaaggaatgggtcctacctgaaattgacagtgat  
gatattgtcagtgcttgaaggaaattcaaatcttttgggctgagcgcttccgcaaacagttccttggcatgagtg  
35 ttgtgggcaaacattgtggaatcagccacactggtgacttaaggatctcggcatgactgtactggtgagcaagtaa  
atcgggtgcggaataatgcataaacactgctggtgctgcttccactggagacacgtcagctgactgctggct  
tactgcgcatctgacggcatccatcaattgattcttacctgcaaataagatttctatggcgcaactggttcaaccaat  
agccaatgggcttgggtgagcttgcactgattttgatggatgcatgagttgattcgcgaagtcacagctgagt  
tgccatttactggcaaatcctgaatggttggagctagaagggcaaaaagacggcagctatagagattctgcagcag  
40 ttgactgggaagttcctgactgggtgataatcctggtggaacctgggcaatatatgcatttataaaggtttca  
aatgtgcaaggagctgggacttgtgatcgtatcccagactggttctgctcaagcagccaatgcaaatccgcttact  
tgcatataaatcgttggaaagaattcaaatctgcaaggcaatacaacatttgcattctgatacagattggcgac  
cctgtatctatcagataggctgtttatgactgaagaactccaacgggatagtgaggaggcaactgaggaagagttgat  
ggatcgatggctcaggcagattcaactgggatgttcatatgccccacactggcgtggcattgacagcactatccaagc  
45 tgagaagacgggggtattaggccaactgataggaccgtggtgtgagtagcagctcatgggtgaaagttaactcaatcc  
aagggtgattatcattcaaaaagaataaagaacatggaatgccggttgcataatccaccagtgaggtgaaagcagact  
tggatcagctatgattctcaagaaataactgttgacaaaattctaagtctaa

Sec. con núm. de ident.: 21 (Secuencia traducida de la sec. con núm. de ident.: 21)

50 MAASSTCMFRSSFFSPNLHPKQQSPAKSNGVQFFTPIKATASSTDDAISASTQPQKHRRPADENIREEARR  
HISSHNFSARYVPFNADPNSSSEWYSLDEIIRSRSGLLDVQHDMDALKKFDGQYWRSLFDSRVGKTTWPY  
GSGVWSKKEWVLEIDSDDIVSAFEGNSNLFWAERFGKQFLGMSDLWVKHCGISHTGSFKDLGMTVLVSQ  
VNRLRKMHPVVGVCASGDTSAALSAYCASAGIPSVFLPANKISMAQLVQPIANGAFVLSLDTDFDGC  
55 QLIREVTAELPIYLANSLNLSRLEGQKTAIEILQQFDWEVPDWVVIIPGGNLGNIYAFYKGFQMCKELGLVDRI  
PRLVCAQAANANPLYLHYKSGWKEFKSVKANTTFASAIQIDPVSIDRAVYALKNSNGIVEEATEEELMDAM  
AQADSTGMFICPHTGVALTALSRLKRTGVRPTDRVVVSTAHGLKFTQSKVDYHSKEIKNMECRFANPPVQ  
VKADFGSVMDVLKLYLLSKNSKF

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para aumentar la concentración de metionina libre en al menos una parte de una planta de tabaco, que comprende las etapas de:
  - (a) reducir la expresión o actividad de treonina sintasa en la planta de tabaco, mediante la introducción en la planta de un polinucleótido que muestra actividad de interferencia de ARN contra el ARNm de la treonina sintasa, en donde la treonina sintasa comprende
    - (i) un polinucleótido que comprende o que consiste en una secuencia que codifica una treonina sintasa y que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la sec. con núm. de ident.:1, la sec. con núm. de ident.:2, la sec. con núm. de ident.:3, la sec. con núm. de ident.:4, o la sec. con núm. de ident.:5;
    - (ii) un polipéptido codificado por cualquiera de dichos polinucleótidos expuestos en (i); o
    - (iii) un polipéptido que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la sec. con núm. de ident.:6, la sec. con núm. de ident.:7 o la sec. con núm. de ident.:8;
  - (b) medir la concentración de metionina libre en al menos una parte de la planta de tabaco transgénica obtenida en la etapa (i); y
  - (c) identificar una planta de tabaco transgénica en la cual la concentración de metionina libre ha aumentado en al menos 50 % en comparación con una planta de tabaco control en la cual la expresión o actividad de treonina sintasa no se ha reducido y en donde la apariencia visual de dicha planta de tabaco transgénica es esencialmente la misma que la planta de tabaco control tres meses después del trasplante al campo o 36 días después del desmoche.
2. Una planta de tabaco transgénica o material vegetal que se obtiene o que puede obtenerse mediante el método de conformidad con la reivindicación 1, en donde la planta de tabaco transgénica comprende un polinucleótido que muestra actividad de interferencia del ARN contra el ARNm de la treonina sintasa.
3. Una planta de tabaco transgénica de conformidad con la reivindicación 2, en donde la expresión de treonina sintasa o la actividad de la proteína así codificada se reduce y una parte de la planta tiene un aumento en el contenido de metionina de al menos 50 % en comparación con una planta de tabaco control en la que no se ha reducido la expresión o la actividad de treonina sintasa y en donde la concentración de metional en aerosol aumenta en al menos 5 % en comparación con el aerosol de la planta control, en donde la apariencia visual de dicha planta es esencialmente la misma que en la planta control tres meses después del trasplante al campo o 36 días después del desmoche, en donde la altura del tallo de las plantas transgénicas es esencialmente la misma que la altura del tallo de la planta control tres meses después del trasplante al campo o 36 días después del desmoche y/o el contenido de clorofila de la planta transgénica es esencialmente el mismo que el contenido de clorofila de la planta control tres meses después del trasplante al campo o 36 días después del desmoche.
4. La planta de tabaco transgénica de conformidad con la reivindicación 3, en donde la concentración de treonina libre en una parte de la planta aumenta en comparación con la planta control; preferentemente, en donde (i) la concentración de metionina libre en las hojas es al menos aproximadamente 0,03 mg/g; (ii) la concentración de treonina libre en las hojas es al menos aproximadamente 0,5 mg/g; y (iii) la concentración de metional en aerosol después de calentar es al menos aproximadamente 2000 µg/g.
5. Semilla que comprende células o tejido de la planta de tabaco de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en donde dichas semillas comprenden el polinucleótido que muestra actividad de interferencia del ARN contra el ARNm de la treonina sintasa como se definió en la reivindicación 1.
6. Material vegetal que incluye biomasa u hojas que comprenden células o tejido de la planta de tabaco de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en donde dicho material vegetal comprende el polinucleótido que muestra actividad de interferencia del ARN contra el ARNm de la treonina sintasa como se definió en la reivindicación 1.
7. Un producto de tabaco que comprende una parte de la planta de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4 o material vegetal de conformidad con la reivindicación 6, en donde dicho producto de tabaco comprende el polinucleótido que muestra actividad de interferencia del ARN contra el ARNm de la treonina sintasa como se definió en la reivindicación 1.
8. Un método para producir metional que comprende las etapas de:



(a) proporcionar parte de una planta de tabaco transgénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, material vegetal de conformidad con la reivindicación 6, o el producto de tabaco de conformidad con la reivindicación 7; y

5

(b) proporcionar calor a estos.

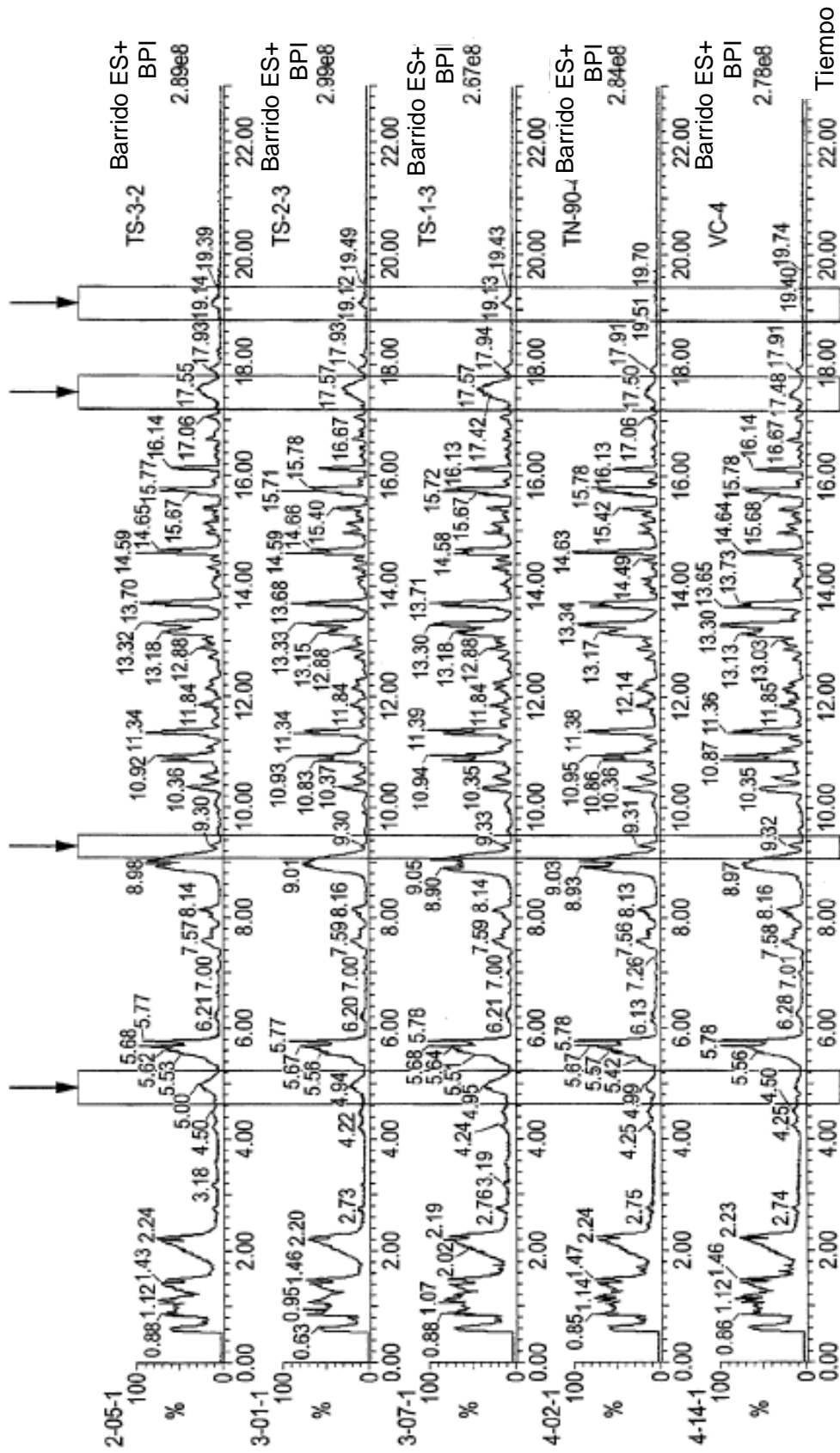


Figura 1