(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 742 271**

(51) Int. CI.:

C12N 9/10 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
A01H 5/12 (2008.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.08.2012 PCT/EP2012/003662**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **07.03.2013 WO13029799**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.08.2012 E 12758404 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2019 EP 2751262**

(54) Título: **Isopropilmalato sintasa de Nicotiana tabacum y métodos y usos de esta**

(30) Prioridad:

02.09.2011 EP 11179882

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.02.2020

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

BAKAHER, NICOLAS;
BINDLER, GREGOR NICOLAS;
BLANC, MICHEL PHILIPPE;
GOEPFERT, SIMON y
MARTIN, FLORIAN

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

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

Isopropilmalato sintasa de Nicotiana tabacum y métodos y usos de esta

Campo de la invención

La presente invención describe el gen de la isopropilmalato 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 de esta manera para alterar la composición de éster de sacarosa de una planta, tal como una planta de tabaco.

Antecedentes de la invención

Los ésteres de sacarosa se reconocen ampliamente como que tienen propiedades insecticidas en las plantas y han mostrado toxicidad hacia insectos de cuerpos blandos, lo que incluye áfidos, ácaros, psílidos de pera y moscas blancas, así como también actividad antibiótica. Los ésteres de sacarosa se consideran, además, como precursores de sabor y se acumulan sobre la superficie de la hoja durante la vida de la planta. Son compuestos estables que pueden identificarse en material curado y fumable. Los ácidos carboxílicos pequeños esterificados se liberan de los ésteres de sacarosa tras el calentamiento. Estos ácidos carboxílicos pequeños son moléculas de sabor muy potente y se consideran responsables en parte del sabor oriental del tabaco. Los ésteres de sacarosa se producen en las células del tricoma glandular de las plantas. Las células del tricoma glandular son, además, el lugar para la síntesis de otros exudados de hoja, tales como proteínas (filoplaninas) y diterpenoides (cembrenoides y labdenoides). La sacarosa y los ácidos carboxílicos pequeños que se esterifican a la sacarosa para dar lugar a los ésteres de sacarosa se producen a través de dos bloques metabólicos distintos.

Las variedades de tabaco difieren en sus cantidades y calidades del éster de sacarosa presente sobre la superficie de la hoja. Como regla general, las variedades de curado al humo, burley y Maryland acumulan cantidades bajas de ésteres de sacarosa con grupos acilo con una longitud de la cadena de hasta cinco carbonos, mientras que la mayoría de las variedades orientales y muchos tipos de tabaco para cigarrillo acumulan cantidades altas de ésteres de sacarosa que tienen grupos acilo con una longitud de la cadena de hasta seis carbonos, y en menor medida, pueden observarse ésteres que tienen grupos acilo con una longitud de la cadena de siete carbonos. La dicotomía observada en el éster de sacarosa producido entre las variedades de tabaco se vincula a un único locus dominante llamado BMVSE (ésteres de sacarosa que contienen beta-metilvalerilo) para su alelo funcional y *bmvse* para su alelo no funcional. El locus genómico BMVSE se ha ubicado en el cromosoma A del tabaco.

Kroumova y Wagner (2009) *General and Applied Plant Physiology* 35, 3-4, p95-110 describen intentos de cambiar el contenido de grupos acilo de los ésteres de sacarosa en diversas plantas mediante el uso de un enfoque genético inverso para reducir la expresión de la isopropilmalato sintasa mediante el uso de ARN de interferencia bicatenario. En este estudio, el gen de la isopropilmalato sintasa de *Solanum pennellii* se usó para amplificar parte de los genes a partir del ADNc. Después, se introdujeron en la orientación sentido y antisentido en un constructo de ARN de interferencia bicatenario y se transformaron mediante *Agrobacterium* en *Nicotiana tabacum* T.I. 1068, *Nicotiana glutinosa* cv. 24a y *S. pennelli.* Los resultados obtenidos mediante el uso de plantas de *N. tabacum* mostraron algunos cambios en la abundancia de grupos acilo en los ésteres de azúcar a través de beta-metilvalerilo reducido y aumento de la acilación de 2-metilbutirilo en comparación con los controles no transformados. Sin embargo, las plantas de *N. tabacum* que se obtuvieron se afectaron fenotípicamente, ya que eran cloróticas y algunas tenían hojas rizadas. Igualmente, las plantas de *N. glutinosa* y *S. pennelli* transformadas se afectaron fenotípicamente. Los autores concluyen que la isopropilmalato sintasa es una enzima fundamental y que su deterioro conduciría probablemente a una planta poco saludable.

Existe una necesidad en la técnica de plantas en las cuales la composición de ésteres de sacarosa se modula y a la vez se minimizan los efectos no deseados en la planta. Un objeto de la presente invención es satisfacer esta necesidad.

Resumen de la invención

La presente invención se basa, al menos en parte, en el hallazgo sorprendente de que la modulación de la actividad o la expresión del gen de la isopropilmalato sintasa de *Nicotiana tabacum* produce un cambio en la composición de ésteres de sacarosa con menos efectos no deseados sobre el metabolismo general de la planta. La mayoría de los efectos se concentran en los tricomas de la planta y en el metabolismo secundario. Por lo tanto, modular la actividad o la expresión del gen de la isopropilmalato sintasa de *Nicotiana tabacum* no provoca sustancialmente alteraciones en la apariencia visual de la planta en comparación con una planta control. Esto es ventajoso porque las plantas pueden usarse para la producción comercial de diversos productos, donde las alteraciones en la apariencia visual no serían aceptables para la industria o podrían resultar en rendimientos de producción reducidos inaceptablemente. Ventajosamente, el perfil de sabor del aerosol generado por el tabaco puede modificarse de manera que pueden crearse nuevos perfiles de sabor. Además, puede cambiarse la resistencia a las plagas de las plantas en las cuales se ha modificado el perfil de ésteres de sacarosa. Las composiciones de los ésteres de sacarosa pueden extraerse

de las plantas para diversos usos, tales como en fármacos, aditivos alimentarios, saborizantes para fumar y como componentes de pesticidas orgánicos y similares.

Aspectos y modalidades de la invención

La presente invención se define en la reivindicación independiente 1 y ciertas características opcionales de estas se definen en las reivindicaciones dependientes. En la medida en que los términos “invención”, “ejemplo” y “modalidad” se usan en la presente descripción, esto se interpretará de manera que la única protección buscada es para la invención como se reivindica.

En un aspecto, se proporciona un polinucleótido aislado que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que codifica una isopropilmalato sintasa y que tiene al menos 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO:10 o la SEQ ID NO: 12 o la SEQ ID NO:14. En otro aspecto, se proporciona un polipéptido aislado codificado por el polinucleótido. En otro aspecto, se proporciona un polipéptido aislado que tiene al menos 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:2 o la SEQ ID NO:11 o la SEQ ID NO:13 o la SEQ ID NO:15.

Un constructo, vector o vector de expresión que comprende la secuencia de polinucleótido aislada, opcionalmente en donde dicho constructo, vector o vector de expresión comprende adicionalmente un promotor que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la SEQ ID NO:8 o una variante de esta con al menos aproximadamente 60 % de identidad con ella o un promotor de tricoma o el promotor de la isopropilmalato sintasa natural.

En otro aspecto, se proporciona un polinucleótido aislado que comprende, consiste o consiste esencialmente en la SEQ ID NO:8 o una variante de esta con al menos aproximadamente un 60 % de identidad con ella.

En otro aspecto, se proporciona una célula vegetal mutante, de origen no natural o transgénica que comprende al menos uno de los polinucleótidos, al menos uno de los polipéptidos o el constructo, vector o vector de expresión de la presente invención. Adecuadamente, la expresión de la isopropilmalato sintasa o la actividad de la proteína codificada de esta manera se modula y al menos una parte de la planta tiene un cambio en la composición de los ésteres de sacarosa en comparación con una planta control en la cual la expresión o la actividad de la isopropilmalato sintasa no se ha modulado. Adecuadamente, la apariencia visual de la planta es sustancialmente la misma que la de la planta control.

En otro aspecto, se proporciona una planta mutante, de origen no natural o transgénica que comprende la célula vegetal de la presente invención.

En otro aspecto, se proporciona un método para modular la cantidad de ésteres de sacarosa en una parte de una planta, que comprende las etapas de: (i) modular la expresión o la actividad de la isopropilmalato sintasa en la planta, preferentemente, en donde la isopropilmalato sintasa comprende la secuencia de polinucleótidos o la secuencia de polipéptidos descrita en la presente descripción; (ii) medir la cantidad de ésteres de sacarosa en al menos una parte de la planta mutante, de origen no natural o transgénica obtenida en la etapa (i); e (iii) identificar una planta mutante, de origen no natural o transgénica en la cual la cantidad de ésteres de sacarosa en ella ha cambiado en comparación con una planta control en la cual la expresión o la actividad de la isopropilmalato sintasa no se modula y, preferentemente, en donde la apariencia visual de dicha planta mutante, de origen no natural o transgénica es sustancialmente la misma que la de la planta control.

En otro aspecto, se proporciona una planta mutante, de origen no natural o transgénica que se obtiene o puede obtenerse mediante este método.

En otro aspecto, se proporciona una planta mutante, de origen no natural o transgénica, en donde la expresión de la isopropilmalato sintasa o la actividad de la proteína codificada de esta manera se modula y al menos una parte de la planta tiene un cambio en la composición de los ésteres de sacarosa en comparación con una planta control en la cual la expresión o la actividad de la isopropilmalato sintasa no se modula y en donde la apariencia visual de dicha planta es sustancialmente la misma que la de la planta control.

En un aspecto adicional, se proporciona material vegetal, lo que incluye biomasa, semillas u hojas que comprenden células o tejido de dicha planta.

En otro aspecto, se proporciona un producto de tabaco que comprende una parte de la planta o material vegetal de conformidad con la presente invención.

En otro aspecto, se proporciona un método para producir una composición de ésteres de sacarosa que comprende las etapas de: (i) proporcionar al menos parte de una planta mutante, de origen no natural o transgénica, material vegetal o el producto de tabaco de conformidad con la presente invención; (ii) extraer los (por ejemplo, uno o más) ésteres de sacarosa de los mismos; y (iii) opcionalmente, purificar los ésteres de sacarosa extraídos.

Además, se proporciona una composición de los ésteres de sacarosa obtenidos o que pueden obtenerse mediante dicho método.

Adecuadamente, el uno o más ésteres de sacarosa tienen la estructura como se muestra en la Figura 5 y en donde R3 es acetilo o hidrógeno, preferentemente, acetilo; uno o más de R1, R2 y R4 comprende al menos una cadena de acilo con 6 carbonos, preferentemente, beta-metilvalerilo; y R5 es un acetilo o hidrógeno, preferentemente, hidrógeno.

Adecuadamente, el uno o más ésteres de sacarosa se seleccionan del grupo que consiste en un éster de sacarosa como se muestra en la Figura 5, en donde R3=acetilo, R1=propionilo o un isómero de este, R2= propionilo o un isómero de este, R4=hexanoilo o un isómero de este y R5 es hidrógeno o acetilo; o un éster de sacarosa como se muestra en la Figura 5, en donde R3=acetilo, R1= propionilo o un isómero de este, R2= valerilo o un isómero de este, R4= valerilo o un isómero de este y R5 es hidrógeno o acetilo; o un éster de sacarosa como se muestra en la Figura 5, en donde R3=acetilo, R1=butirilo, R2=valerilo o un isómero de este, R4=hexanoilo o un isómero de este y R5 es hidrógeno o acetilo (C2C14:0); un éster de sacarosa como se muestra en la Figura 5, en donde R3=acetilo, R1=propionilo o un isómero de este, R2=valerilo o un isómero de este, R4=hexanoilo o un isómero de este y R5 es hidrógeno o acetilo; o un éster de sacarosa como se muestra en la Figura 5, en donde R3=acetilo, R1= valerilo o un isómero de este, R2= valerilo o un isómero de este, R4= valerilo o un isómero de este y R5 es hidrógeno o acetilo; o un éster de sacarosa como se muestra en la Figura 5, en donde R3=acetilo, R1=butirilo, R2=hexanoilo o un isómero de este, R4= hexanoilo o un isómero de este y R5 es hidrógeno o acetilo (C2C15:0); un éster de sacarosa que tiene la estructura general como se muestra en la Figura 5, y en donde R3 es acetilo, R1 es valerilo o un isómero de este, R2 es valerilo o un isómero de este, R4 es hexanoilo o un isómero de este y R5 es o bien un átomo de hidrógeno o un resto acetilo (C2C16:0); o un éster de sacarosa que tiene la estructura general mostrada en la Figura 5, y en donde R3 es acetilo, R1 es propionilo o un isómero de este, R2 es hexanoilo o un isómero de este, R4 es hexanoilo o un isómero de este y R5 es o bien un átomo de hidrógeno o un resto acetilo (C2C16:0); un éster de sacarosa que tiene la estructura general mostrada en la Figura 5, y en donde R3 es acetilo, R1 es valerilo o un isómero de este, R2 es hexanoilo, R4 es hexanoilo y R5 es o bien un átomo de hidrógeno o un resto acetilo (C2C17:0); o un éster de sacarosa que tiene la estructura general mostrada en la Figura 5, y en donde R3 es acetilo, R1 es hexanoilo, R2 es hexanoilo, R4 es hexanoilo y R5 es o bien un átomo de hidrógeno o un resto acetilo (C2C18:0); o sus combinaciones.

Adecuadamente, el uno o más ésteres de sacarosa se seleccionan del grupo que consiste en un éster de sacarosa como se muestra en la Figura 5, en donde R3=acetilo, R1=propionilo o un isómero de este, R2=valerilo o un isómero de este, R4=hexanoilo o un isómero de este y R5 es hidrógeno o acetilo; o un éster de sacarosa como se muestra en la Figura 5, en donde R3=acetilo, R1=valerilo o un isómero de este, R2=valerilo o un isómero de este, R4=valerilo o un isómero de este y R5 es hidrógeno o acetilo; o un éster de sacarosa como se muestra en la Figura 5, en donde R3=acetilo, R1= butirilo, R2= hexanoilo o un isómero de este, R4=hexanoilo o un isómero de este y R5 es hidrógeno o acetilo (C2C15:0); un éster de sacarosa que tiene la estructura general mostrada en la Figura 5, en donde R3 es acetilo, R1 es valerilo o un isómero de este, R2 es valerilo o un isómero de este, R4 es hexanoilo o un isómero de este y R5 es o bien un átomo de hidrógeno o un resto acetilo (C2C16:0); o un éster de sacarosa que tiene la estructura general mostrada en la Figura 5, y en donde R3 es acetilo, R1 es propionilo o un isómero de este, R2 es hexanoilo o un isómero de este, R4 es hexanoilo o un isómero de este y R5 es o bien un átomo de hidrógeno o un resto acetilo (C2C16:0); un éster de sacarosa que tiene la estructura general mostrada en la Figura 5, y en donde R3 es acetilo, R1 es valerilo o un isómero de este, R2 es hexanoilo, R4 es hexanoilo y R5 es o bien un átomo de hidrógeno o un resto acetilo (C2C17:0); o un éster de sacarosa que tiene la estructura general mostrada en la Figura 5, y en donde R3 es acetilo, R1 es hexanoilo, R2 es hexanoilo, R4 es hexanoilo y R5 es o bien un átomo de hidrógeno o un resto acetilo (C2C18:0) o sus combinaciones.

En un aspecto adicional, se proporciona un método para modular el sabor del tabaco o un producto de tabaco que comprende: (i) añadir al tabaco o un producto de tabaco, parte de una planta, preferentemente las hojas, de una planta o material vegetal mutante, de origen no natural o transgénico como se describe en la presente descripción, preferentemente, en donde dicha planta o material vegetal mutante, de origen no natural o transgénico pertenece al género *Nicotinia*; o (ii) añadir al tabaco o un producto de tabaco una composición que comprende ésteres de sacarosa que contienen beta-metilvalerilo obtenidos o que pueden obtenerse mediante el método descrito en la presente descripción.

En un aspecto adicional, se proporciona un método para producir ácido beta-metilvalérico que comprende las etapas de: (i) proporcionar al menos parte de la planta mutante, de origen no natural o transgénica, el material vegetal o el producto de tabaco; (ii) hidrolizar el material proporcionado en la etapa (i) o un extracto de este; y (iii) aislar o purificar opcionalmente el ácido beta-metilvalérico. Adecuadamente, la planta es una planta de tabaco, tal como una planta del género Nicotiana o de la especie *Nicotiana tabacum.*

Adecuadamente, la apariencia visual de la planta es sustancialmente la misma que la de la planta control. Adecuadamente, la apariencia visual de la planta es sustancialmente la misma que la de 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 sustancialmente 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 sustancialmente el mismo que el contenido de clorofila de las plantas control 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 sustancialmente las mismas que la de las plantas controles a los tres meses después del trasplante al campo o 36 días después del desmoche.

Un aspecto adicional se refiere a la biomasa, semillas u hojas que comprenden células o tejido de la planta o plantas descritas en la presente descripción como un producto de tabaco que comprende una parte de la planta o biomasa, semillas u hojas.

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

La resistencia a las plagas de la planta puede modularse.

Aún otros aspectos de la presente invención se exponen más abajo.

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

Un constructo de polinucleótido de isopropilmalato sintasa que comprende, consiste o 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, 600-700 nucleótidos, 700-1000 nucleótidos, 1000-1300 nucleótidos, 1300-1500 nucleótidos o 1500-1900 nucleótidos.

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

Una célula o línea celular que comprende el polinucleótido aislado, el gen quimérico, el constructo de polinucleótido, el ARN bicatenario, el conjugado o el vector de expresión y similares de conformidad con la presente invención.

Un método para modular la expresión de la isopropilmalato sintasa o la actividad de la proteína codificada de esta manera en una célula, dicho método comprende administrar el gen quimérico, el constructo del polinucleótido, el ARN bicatenario, el conjugado o el vector de expresión descrito en la presente descripción.

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

El uso de un agente que modula la expresión de la isopropilmalato sintasa o la actividad de la proteína codificada de esta manera para modular del contenido de éster de sacarosa en al menos una parte de una planta, tal como las hojas.

En una modalidad, el agente es o se deriva del ácido nucleico de isopropilmalato sintasa, un gen quimérico de isopropilmalato sintasa, un constructo de polinucleótido que comprende un polinucleótido de isopropilmalato sintasa, un ARN antisentido, un ARN bicatenario, un ADNc, un conjugado que comprende un polinucleótido de isopropilmalato sintasa y al menos un resto no nucleotídico o no polinucleotídico que se une covalentemente a este, una ribozima, un mutágeno, una dedos de zinc, una molécula pequeña o una meganucleasa.

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.

Un aspecto adicional se refiere a un método para producir un producto de tabaco que comprende las etapas de: (a) obtener semilla de la planta mutante, de origen no natural o transgénica descrita en la presente descripción; (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.

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

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra la cantidad estimada de isómeros del éster de sacarosa medida en exudados de hojas. La medición se realiza en lavados de acetona/metanol de discos de hojas verdes de un variedad de tabaco *bmvse* Hicks Broadleaf (HBL) y de una variedad de tabaco BMVSE Red Russian (RR). La cantidad se estima a partir de la adición de octaacetato de sacarosa como un estándar externo. n=4 para cada variedad. C2C12:0 incluye un éster de sacarosa (saturado) como se muestra en la Figura 5, en donde R3=acetilo, R1=butirilo, R2=propionilo o un isómero de este, R4=valerilo o un isómero de este y R5 es hidrógeno o acetilo; o un éster de sacarosa como se muestra en la Figura 5, en donde R3=acetilo, R1=acetilo, R2=valerilo o un isómero de este, R4=valerilo o un isómero de este, y R5 es hidrógeno o acetilo. C2C13:0 incluye un éster de sacarosa (saturado) como se muestra en la Figura 5, en donde R3=acetilo, R1=butirilo, R2= butirilo, R4=valerilo o un isómero de este y R5 es hidrógeno o acetilo; o un éster de sacarosa como se muestra en la Figura 5, en donde R3=acetilo, R1=butirilo, R2= propionilo o un isómero de este, R4=hexanoilo o un isómero de este y R5 es hidrógeno o acetilo; o un éster de sacarosa como se muestra en la Figura 5, en donde R3=acetilo, R1=butirilo, R2= propionilo o un isómero de este, R4=valerilo o un isómero de este y R5 es hidrógeno o acetilo. C2C14:0 incluye un éster de sacarosa (saturado) como se muestra en la Figura 5, en donde R3=acetilo, R1=propionilo o un isómero de este, R2= propionilo o un isómero de este, R4=hexanoilo o un isómero de este y R5 es hidrógeno o acetilo; o un éster de sacarosa como se muestra en la Figura 5, en donde R3=acetilo, R1= propionilo o un isómero de este, R2=valerilo o un isómero de este, R4= valerilo o un isómero de este y R5 es hidrógeno o acetilo; o un éster de sacarosa como se muestra en la Figura 5, en donde R3=acetilo, R1=butirilo, R2=valerilo o un isómero de este, R4=hexanoilo o un isómero de este, y R5 es hidrógeno o acetilo. C2C15:0 incluye un éster de sacarosa (saturado) como se muestra en la Figura 5, en donde R3=acetilo, R1=propionilo o un isómero de este, R2=valerilo o un isómero de este, R4=hexanoilo o un isómero de este y R5 es hidrógeno o acetilo; o un éster de sacarosa como se muestra en la Figura 5, en donde R3=acetilo, R1=valerilo o un isómero de este, R2=valerilo o un isómero de este, R4=valerilo o un isómero de este y R5 es hidrógeno o acetilo; o un éster de sacarosa como se muestra en la Figura 5, en donde R3=acetilo, R1=butirilo, R2=hexanoilo o un isómero de este, R4=hexanoilo o un isómero de este y R5 es hidrógeno o acetilo; C2C16:0 incluye un éster de sacarosa (saturado) que tiene la estructura general mostrada en la Figura 5, y en donde R3 es acetilo, R1 es valerilo o un isómero de este, R2 es valerilo o un isómero de este, R4 es hexanoilo o un isómero de este y R5 es o bien un átomo de hidrógeno o un resto acetilo; o en donde el éster de sacarosa tiene la estructura general mostrada en la Figura 5, y en donde R3 es acetilo, R1 es propionilo o un isómero de este, R2 es hexanoilo o un isómero de este, R4 es hexanoilo o un isómero de este y R5 es o bien un átomo de hidrógeno o un resto acetilo. C2C17:0 incluye un éster de sacarosa (saturado) como se muestra en la Figura 5, en donde R3 es acetilo, R1 es valerilo o un isómero de este, R2 es hexanoilo, R4 es hexanoilo y R5 es o bien un átomo de hidrógeno o un resto acetilo. C2C18:0 incluye un éster de sacarosa (saturado) como se muestra en la Figura 5, en donde R3 es acetilo, R1 es hexanoilo, R2 es hexanoilo, R4 es hexanoilo y R5 es o bien un átomo de hidrógeno o un resto acetilo.

La Figura 2 muestra los principales isómeros del éster de sacarosa ordenados por masa molecular y su aparición en variedades de tabaco que producen o no producen ésteres de sacarosa que contienen ésteres de beta-metilvalerilo. No se hace distinción entre los ésteres de 2 y 3-metilbutirilo o 3 y 4 metilvalerilo enumerados como C5 y C6 respectivamente. La siguiente nomenclatura se usa para definir la composición del acilo. En referencia, por ejemplo, a C2C4C4C5, esto se refiere al número de carbonos en el grupo acilo en R3, R1, R2 y R4, respectivamente. C2 puede ser acetilo; C3 puede ser butirilo; C4 puede ser propionilo o un isómero de este o isobutirilo; C5 puede ser valerilo (pentanoilo) o un isómero de este o 2-metil-butirilo o isovalerilo o isopentenoilo o pentenoilo; C6 puede ser hexanoilo o un isómero de este o 2-metilvalerilo o beta-metilvalerilo o 4-metilvalerilo. Puede presentarse un acetilo o hidrógeno en R5 (no se muestra), adecuadamente, hidrógeno.

La Figura 3 ilustra la vía de síntesis de aminoácidos de cadena ramificada y la generación de las cadenas de acilo que se esterifican sobre sacarosa. Las etapas en caja representan la vía de síntesis de aminoácidos de cadena ramificada central, donde las cadenas de carbono se extienden por un carbono por ciclo de condensación, isomerización y descarboxilación. 1: Acetolactato sintasa [2.2.1.6]; 2: Acetohidroxiácido isómeroreductasa [1.1.1.86]; 3: 3,4-Dihidroxiácido deshidratasa [4.2.1.9]; 4: Aminotransferasa de aminoácido de cadena ramificada [2.6.1.42]; 5: Complejo de deshidrogenasa de ceto ácido de cadena ramificada (BCKD) ([1.2.4.4] [2.3.1.168] [1.8.1.4]); 6: Isopropilmalato sintasa [2.3.3.13]; 7: Isopropilmalato isomerasa [4.2.1.33]; 8: Isopropilmalato deshidrogenasa [1.1.1.85]; 9: Treonina desaminasa [4.3.1.19]. C4: isobutanoil éster; iC5: 3-metil-butiril éster (isovaleril éster); aiC5: 2-metil-butiril éster (anteiso-valeril éster); iC6: 4-metil-valeril éster (iso-caproil éster); aiC6: 3-metil-valeril éster (anteiso-caproil éster), β-metilvaleril éster, BMV). Los ácidos carboxílicos se presentan en forma neutra, aunque los nombres reflejan las formas solubles. Las etapas catalizadas de IPMS2 propuestas se circulan.

La Figura 4 muestra la estimación de la abundancia de tetraéster de sacarosa en el exudado de superficie de hojas de plantas transformantes. Las hojas se recogen de plantas regeneradas de un mes de edad, resultantes de eventos de transformación independientes. Se añade un estándar interno (octaacetato de sacarosa) a una tasa de 2,5 ng/mg de peso fresco. El área de la señal registrada para el ion específico de cada éster de sacarosa se mide y se traza como la relación del área del estándar interno. La relación con respecto al área de la señal del estándar interno permite la normalización de las señales sobre el peso fresco de la hoja. La nomenclatura del éster de sacarosa presentada aquí se describe en la Figura 2. A: composición de exudados de hojas de la variedad parental K326 (curada al humo, n=3) y los transformantes que expresan la SEQ ID NO:1 bajo un promotor específico de tricomas; B: composición de exudados de hojas de la variedad parental K326 y los transformantes que expresan la SEQ ID

NO:1 bajo el control de un promotor viral; C: composición de exudados de hojas de la variedad parental Basma (Oriental, n=4) y los transformantes que expresan el constructo de ARNi de la SEQ ID NO: 9 bajo un promotor específico de tricomas; y D: composición de exudados de hojas de la variedad parental Basma y transformantes que expresan el constructo de ARNi de la SEQ ID NO: 9 bajo un promotor viral. C2C14:0 incluye un éster de sacarosa (saturado) como se muestra en la Figura 5, en donde R3=acetilo, R1=propionilo o un isómero de este, R2= propionilo o un isómero de este, R4=hexanoilo o un isómero de este y R5 es hidrógeno o acetilo; o un éster de sacarosa como se muestra en la Figura 5, en donde R3=acetilo, R1= propionilo o un isómero de este, R2=valerilo o un isómero de este, R4= valerilo o un isómero de este y R5 es hidrógeno o acetilo; o un éster de sacarosa como se muestra en la Figura 5, en donde R3=acetilo, R1=butirilo, R2=valerilo o un isómero de este, R4=hexanoilo o un isómero de este, y R5 es hidrógeno o acetilo. C2C15:0 incluye un éster de sacarosa (saturado) como se muestra en la Figura 5, en donde R3=acetilo, R1=propionilo o un isómero de este, R2=valerilo o un isómero de este, R4=hexanoilo o un isómero de este y R5 es hidrógeno o acetilo; o un éster de sacarosa como se muestra en la Figura 5, en donde R3=acetilo, R1=valerilo o un isómero de este, R2=valerilo o un isómero de este, R4=valerilo o un isómero de este y R5 es hidrógeno o acetilo; o un éster de sacarosa como se muestra en la Figura 5, en donde R3=acetilo, R1=butirilo, R2=hexanoilo o un isómero de este, R4=hexanoilo o un isómero de este y R5 es hidrógeno o acetilo; C2C16:0 incluye un éster de sacarosa (saturado) que tiene la estructura general mostrada en la Figura 5, y en donde R3 es acetilo, R1 es valerilo o un isómero de este, R2 es valerilo o un isómero de este, R4 es hexanoilo o un isómero de este y R5 es o bien un átomo de hidrógeno o un resto acetilo; o en donde el éster de sacarosa tiene la estructura general mostrada en la Figura 5, y en donde R3 es acetilo, R1 es propionilo o un isómero de este, R2 es hexanoilo o un isómero de este, R4 es hexanoilo o un isómero de este y R5 es o bien un átomo de hidrógeno o un resto acetilo. C2C17:0 incluye un éster de sacarosa (saturado) como se muestra en la Figura 5, en donde R3 es acetilo, R1 es valerilo o un isómero de este, R2 es hexanoilo, R4 es hexanoilo y R5 es o bien un átomo de hidrógeno o un resto acetilo. C2C18:0 incluye un éster de sacarosa (saturado) como se muestra en la Figura 5, en donde R3 es acetilo, R1 es hexanoilo, R2 es hexanoilo, R4 es hexanoilo y R5 es o bien un átomo de hidrógeno o un resto acetilo.

La Figura 5 ilustra la estructura de la armazón del éster de sacarosa. R1 a R5 son átomos de hidrógeno o restos acilo unidos por un enlace éster.

La Figura 6 ilustra las cadenas de acilo esterificadas en los ésteres de sacarosa. R' representa la molécula de sacarosa. 1. acetilo, 2. butirilo, 3. propionilo, 4. isobutirilo, 5. valerilo (pentanoilo), 6. 2-metil-butirilo, 7. isovalerilo, 8. isopentenoilo, 9. pentenoilo, 10. hexanoilo o un isómero de este 11. 2-metilvalerilo, 12, beta-metilvalerilo, 13. 4-metilvalerilo. Además, se contemplan los isómeros y los derivados de estos. De esta forma, a manera de ejemplo, el isómero puede ser un isómero de propionilo, tal como isobutirilo. A manera de ejemplo adicional, el isómero puede ser un isómero de valerilo (pentanoilo) – tal como 2-metil-butirilo o isovalerilo; o un isómero de valerilo (pentanoilo) con un doble enlace – tal como isopentenoilo o pentenoilo, A manera de ejemplo adicional, el isómero puede ser un isómero de hexanoilo – tal como 2-metilvalerilo, beta-metilvalerilo o 4-metilvalerilo. El isómero puede o no comprender uno o más dobles enlaces.

Definiciones

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

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

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

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

El término "constructo" se refiere a un fragmento de ácido nucleico bicatenario recombinante que comprende uno o más polinucleótidos. El constructo comprende una “cadena molde” con apareamiento de bases con una “cadena codificante o sentido” complementaria. Un constructo dado puede insertarse en un vector en dos orientaciones posibles, ya sea en la misma orientación (o sentido) o en la orientación inversa (o antisentido) con respecto a la orientación de un promotor ubicado dentro de un vector – tal como un vector de expresión. Un constructo ilustrativo se expone en la SEQ ID NO: 9.

Un "promotor" se refiere a un elemento/secuencia de ácido nucleico, ubicado típicamente aguas arriba y unido operativamente a un fragmento de ácido nucleico bicatenario. Los promotores pueden derivarse totalmente a partir de regiones próximas a un gen de interés nativo, o pueden componerse de elementos diferentes derivados a partir de promotores nativos diferentes o segmentos de ácidos nucleicos sintéticos. Un promotor ilustrativo se expone en la SEQ ID NO: 8.

Los términos "homología, identidad o similitud" se refieren al grado de similitud de secuencias entre dos polipéptidos o entre dos moléculas de ácidos nucleicos comparadas mediante alineación de secuencias. El grado de homología entre dos secuencias de ácidos nucleicos discretas que se comparan es una función del número de nucleótidos idénticos, o coincidentes, en posiciones comparables. El por ciento de identidad puede determinarse mediante inspección visual y cálculos matemáticos. Alternativamente, el por ciento de identidad de dos secuencias de ácidos nucleicos puede determinarse al comparar la información de las secuencias mediante el uso de un programa informático tal como – ClustalW, ClustalX, 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 preferidas 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 altamente organizada, tal como, pero sin limitarse a, 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, lo que incluye biomasa, hojas, láminas de hoja, nervios, tallos, raíces, flores o partes de flores, frutos, polen, óvulos, cigotos, semillas, esquejes, secreciones, extractos, cultivos de células o tejidos, o cualquiera de otras partes o productos de una planta. En una modalidad, el material vegetal comprende o consiste en biomasa, 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 “modular” puede referirse a reducir, inhibir, aumentar o afectar de cualquier otra manera la actividad de un polipéptido. El término puede referirse, además, a reducir, inhibir, aumentar o afectar de cualquier otra manera la actividad de un gen que codifica un polipéptido lo cual puede incluir, pero no se limita a, modular la actividad transcripcional.

El término “reducir” o “reducido”, como se usa en la presente descripción, se refiere a una reducción de aproximadamente 10 % a aproximadamente 99 %, o una reducción de al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o al menos 100 % o más de una cantidad o una actividad, tal como, pero sin limitarse 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 de aproximadamente 10 % a aproximadamente 99 %, o un aumento de al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 25 %,

al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 100 %, al menos 150 %, o al menos 200 % o más 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 "control" en el contexto de una planta control o células vegetales controles significa una planta o células vegetales en las cuales la expresión o actividad de la isopropilmalato sintasa no se ha modificado (por ejemplo, aumentado o reducido) y por tanto puede proporcionar una comparación con una planta en la cual la expresión o la actividad de la isopropilmalato 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, consiste o consiste esencialmente en una secuencia de polinucleótidos y que tiene al menos 60 % de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias descritas en la presente descripción, lo que incluye cualquiera de los polinucleótidos mostrados en el listado de secuencias. Adecuadamente, los polinucleótidos 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 estos.

En otro aspecto, se proporciona un polinucleótido aislado que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia de polinucleótidos que codifica una isopropilmalato sintasa y que tiene al menos 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:1. Adecuadamente, los polinucleótidos 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 la SEQ ID NO:1.

En otro aspecto, se proporciona un polinucleótido aislado que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia de polinucleótidos que codifica una isopropilmalato sintasa y 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 la SEQ ID NO:10.

En otro aspecto, se proporciona un polinucleótido aislado que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia de polinucleótidos que codifica una isopropilmalato sintasa y que tiene al menos 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 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 la SEQ ID NO:12.

En otro aspecto, se proporciona un polinucleótido aislado que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia de polinucleótidos que codifica una isopropilmalato sintasa y 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 la SEQ ID NO:14.

En otro aspecto, se proporciona un polinucleótido aislado que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia de polinucleótidos que tiene al menos 60 %, 61%, 62%, 63%, 64%, 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 la SEQ ID NO: 8. La SEQ ID NO: 8 codifica un promotor preferido.

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 ácido nucleico monocatenario o bicatenario, ácido nucleico que es una mezcla de regiones monocatenarias y bicatenarias, una molécula híbrida que comprende ADN y ARN, o una molécula híbrida con una mezcla de regiones monocatenarias y bicatenarias o un(unos) fragmento(s) de estas. Adicionalmente, el polinucleótido puede componerse de regiones de triple cadena que comprenden ADN, ARN, o ambos o un(unos) fragmento(s) de estos. Un polinucleótido puede contener una o más bases modificadas, tales como fosfotioatos, y puede ser un ácido nucleico peptídico (PNA). Generalmente, los polinucleótidos pueden ensamblarse a partir de fragmentos aislados o clonados de ADNc, ADN genómico, oligonucleótidos, o nucleótidos individuales, o una combinación de los anteriores. Aunque las secuencias de polinucleótidos descritas en la presente descripción se muestran como secuencias de ADN, las secuencias incluyen sus secuencias de ARN correspondientes, y sus secuencias de ADN o ARN complementarias (por ejemplo, complementarias completamente), lo que incluye los complementos inversos de estas.

El término "polinucleótido de isopropilmalato sintasa" incluye polinucleótidos que codifican la isopropilmalato sintasa (IMPS) de *Nicotiana tabacum* e incluye polinucleótidos que comprenden, consisten o consisten esencialmente de polinucleótidos con homología sustancial (es decir, similitud de secuencia) o identidad sustancial con la SEQ ID

NO:1, SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 12 o la SEQ ID NO: 14; variantes de polinucleótidos que tienen al menos aproximadamente 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO:1, la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 12 o la SEQ ID NO: 14; fragmentos de los polinucleótidos, lo que incluye fragmentos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 12 o la SEQ ID NO: 14; y fragmentos de la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 12 o la SEQ ID NO: 14 con homología sustancial (es decir, similitud de secuencia) o identidad sustancial con ella que tiene al menos aproximadamente 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con los fragmentos correspondientes de la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 12 o la SEQ ID NO: 14. Los polinucleótidos de isopropilmalato sintasa incluyen, además, secuencias que comprenden un grado suficiente o sustancial de identidad o similitud con la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 12 o la SEQ ID NO: 14 para codificar un polipéptido que funciona como una isopropilmalato sintasa. En una modalidad, el término "polinucleótido de isopropilmalato sintasa" se refiere a un polímero de nucleótidos que comprende, consiste o consiste esencialmente en un polinucleótido designado en la presente descripción como SEQ ID NO:1, SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 12 o la SEQ ID NO: 14.

Un polinucleótido como se describe en la presente descripción contendrá generalmente enlaces fosfodiéster, aunque en algunos casos, se incluyen análogos de polinucleótidos que pueden tener cadenas principales alternativas, que comprenden, por ejemplo, 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 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.

Se conoce una variedad de análogos de polinucleótidos, lo que incluye, por ejemplo, enlaces fosforamidato, fosforotioato, fosforoditioato, 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. Se incluyen además polinucleótidos que contienen uno o más azúcares carbocíclicos.

Otros análogos incluyen ácidos nucleicos de péptidos que son análogos de polinucleótidos peptídicos. Estas cadenas principales son esencialmente no iónicas en condiciones neutras, a diferencia de la cadena principal de fosfodiéster altamente cargada de los polinucleótidos de origen natural. Esto puede resultar en ventajas. En primer lugar, la cadena principal de polinucleótidos peptídicos puede mostrar una mejor cinética de hibridación. Los ácidos nucleicos peptídicos tienen cambios más grandes en la temperatura de fusión para los pares de bases con error de apareamiento frente a los apareados perfectamente. El ADN y el ARN muestran típicamente una caída de 2-4 °C en la temperatura de fusión para un error de apareamiento interno. Con la cadena principal de polinucleótido peptídico no iónica, la caída es cercana a 7-9 °C. De manera similar, debido a su naturaleza no iónica, la hibridación de las bases unidas a estas cadenas principales es relativamente insensible a la concentración de sales. Adicionalmente, los ácidos nucleicos peptídicos no deben degradarse o se degradan en un menor grado por las enzimas celulares, y por lo tanto, 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 como cebadores en ensayos de amplificación de ácidos nucleicos. Dichos fragmentos comprenden generalmente al menos aproximadamente 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 o más nucleótidos contiguos de una secuencia de ADN. En otras modalidades, un fragmento de ADN comprende al menos aproximadamente 10, 15, 20, 30, 40, 50 o 60 o más nucleótidos contiguos de una secuencia de ADN. Estas técnicas pueden usarse, además, para identificar plantas BMVSE y *bmvse* ya que se muestra en la presente descripción que un gen de la isopropilmalato sintasa funcional es necesario para la formación de ésteres de sacarosa. El cierre por los marcadores genéticos y los alelos del gen de la isopropilmalato sintasa pueden usarse como predictivos de la producción de ésteres de sacarosa por una planta. Dicha prueba podría usarse para rastrear variedades de plantas o para predecir la calidad al fumar o la homogeneidad del tipo de lote. Por lo tanto, en un aspecto, se proporciona, además, un método para la detección de un polinucleótido de isopropilmalato sintasa como se describe en la presente descripción, que comprende el uso de sondas o cebadores capaces de detectar específicamente o amplificar específicamente dicho polinucleótido o detectar específicamente y amplificar específicamente dicho polinucleótido. En un aspecto adicional, se proporciona un método para identificar una planta que es capaz de producir ésteres de sacarosa que comprende las etapas de: (a) proporcionar una muestra que comprende ácido nucleico de una planta de interés; y (b) determinar la presencia de un polinucleótido de isopropilmalato sintasa como se describe en la presente descripción, en donde la presencia de dicho polinucleótido en dicha planta indica que dicha planta es capaz de producir los ésteres de sacarosa. Se proporcionan, además, kits para detectar al menos una porción del polinucleótido de isopropilmalato sintasa, los cuales comprenden uno o más cebadores o sondas para detectar específicamente al menos una porción del polinucleótido de isopropilmalato sintasa. 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 ésteres de sacarosa. 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. Los métodos y kits pueden ser de uso en un enfoque de mejoramiento que descansa en un cruzamiento entre una variedad BMVSE y una *bmvse* y una selección basada en secuencias de las plantas en la descendencia. Típicamente, se seleccionarán las plantas que muestren la región genética de la isopropilmalato sintasa funcional que estaba presente en la variedad productora BMVSE o plantas que muestren la región genética de isopropilmalato sintasa disfuncional que estaba presente en la variedad no productora *bmvse*.

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 del código genético en combinación con las secuencias de aminoácidos descritas en la presente descripción, pueden prepararse conjuntos de oligonucleótidos degenerados. Dichos oligonucleótidos son útiles como cebadores, por ejemplo, en PCR, en donde los fragmentos de ADN se aíslan y se amplifican. En ciertas modalidades, pueden usarse cebadores degenerados como sondas para las genotecas. Dichas genotecas incluirían, pero no se limitan a, librerías de ADNc, librerías genómicas, e incluso librerías de ADN o etiquetas de secuencias de expresión electrónicas. Las secuencias homólogas identificadas mediante este método podrían usarse después como sondas para identificar homólogos de las secuencias identificadas en la presente descripción.

Además, son de uso potencial los polinucleótidos y oligonucleótidos (por ejemplo, cebadores o sondas) que hibridan en condiciones de rigurosidad reducidas, típicamente condiciones moderadamente rigurosas, y comúnmente condiciones altamente rigurosas para el(los) polinucleótido(s) como se describe en la presente descripción. Los parámetros básicos que afectan la elección de las condiciones de hibridación y la guía para idear condiciones adecuadas se exponen en Sambrook, J., E. F. Fritsch y T. Maniatis (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) y pueden determinarse fácilmente por los expertos en la técnica basados en, por ejemplo, la longitud o composición en 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 al 0,5 %, ácido etilendiaminotetraacético 1,0 mM (pH 8,0), tampón de hibridación de formamida aproximadamente al 50 %, Citrato de sodio estándar 6x, y una temperatura de hibridación de aproximadamente 55 °C (u otras soluciones de hibridación similares, tales como una que contiene formamida aproximadamente al 50 %, con una temperatura de hibridación de aproximadamente 42 °C), y condiciones de lavado de aproximadamente 60 °C, en Citrato de sodio estándar 0,5x, Dodecil sulfato de sodio al 0,1 %. Generalmente, las condiciones altamente rigurosas se definen como las condiciones de hibridación anteriores, pero con lavado a aproximadamente 68 °C, Citrato de sodio estándar 0,2x, Dodecil sulfato de sodio al 0,1 %. SSPE (SSPE 1x es cloruro de sodio 0,15 M, fosfato de sodio 10 mM, y ácido etilendiaminotetraacético 1,25 mM, pH 7,4) puede sustituirse por Citrato de sodio estándar (Citrato de sodio estándar 1x es cloruro de sodio 0,15 M y citrato de sodio 15 mM) en los tampones de hibridación y lavado; los lavados se realizan durante 15 minutos después que se completa la hibridación. Debe entenderse que la temperatura del lavado y la concentración de sales del lavado pueden ajustarse según sea necesario para alcanzar un grado de rigurosidad deseado mediante la aplicación de los principios básicos que gobiernan las reacciones de hibridación y la estabilidad de dúplex, como se conoce por los expertos en la técnica y se describe con más detalle más abajo (ver, por ejemplo, Sambrook, J., E. F. Fritsch, y T. Maniatis (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y). Cuando un polinucleótido hibrida con un polinucleótido objetivo de secuencia desconocida, se asume que la longitud del híbrido es la del polinucleótido con que hibrida. Cuando los polinucleótidos de secuencia conocida se hibridan, la longitud del híbrido puede determinarse mediante la alineación de las secuencias de los polinucleótidos y la identificación de la región o regiones de complementariedad de secuencias óptima. La temperatura de hibridación para los híbridos que se anticipa que sean menores de 50 pares de bases de longitud debe ser de 5 a 10 °C menos de la temperatura de fusión del híbrido, donde la temperatura de fusión se determina de conformidad con las siguientes ecuaciones. Para híbridos de menos de 18 pares de bases de longitud, la temperatura de fusión (°C)=2(número de bases A+T)+4(número de bases G+C). Para híbridos por encima de 18 pares de bases de longitud, la temperatura de fusión (°C)=81,5+16,6(log10 [Na+])+0,41(% G+C)-(600/N), donde N es el número de bases en el híbrido, y [Na+] es la concentración de iones de sodio en el 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 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) con un polinucleótido con el cual hibrida.

Como se entenderá por el experto en la técnica, un ADN lineal tiene dos orientaciones posibles: la dirección 5' a 3' y la dirección 3' a 5'. Por ejemplo, si una secuencia de referencia se ubica en la dirección 5' a 3', y si una segunda

secuencia se ubica en la dirección 5' a 3' dentro de la misma molécula/cadena de polinucleótido, entonces la secuencia de referencia y la segunda secuencia se orientan en la misma dirección, o tienen la misma orientación. Típicamente, una secuencia promotora y un gen de interés bajo la regulación del promotor dado se ubican en la misma orientación. Sin embargo, con respecto a la secuencia de referencia ubicada en la dirección 5' a 3', si una segunda secuencia se ubica en la dirección 3' a 5' dentro de la misma molécula/cadena de polinucleótido, entonces la secuencia de referencia y la segunda secuencia se orientan en la dirección antisentido, o tienen orientación antisentido. Dos secuencias que tienen orientaciones antisentido 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') se ubican dentro de la misma molécula/cadena de polinucleótido. Las secuencias que se exponen en la presente descripción se muestran en la dirección 5' a 3'.

Los constructos recombinantes proporcionados en la presente descripción pueden usarse para transformar plantas o células vegetales para modular los niveles de expresión de proteínas de isopropilmalato sintasa. Un constructo de polinucleótidos recombinante puede comprender un polinucleótido que codifica un polinucleótido de isopropilmalato sintasa como se describe en la presente descripción, unido operativamente a una región regulatoria adecuada para expresar el polipéptido de isopropilmalato sintasa en la planta o célula. De esta forma, un polinucleótido puede comprender una secuencia codificadora que codifica el polipéptido de isopropilmalato sintasa como se describe en la presente descripción.

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

Se proporcionan, además, vectores que contienen constructos 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 tales 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 al armazón o marcadores. Un gen marcador puede conferir un fenotipo seleccionable en una célula vegetal. Por ejemplo, un marcador puede conferir resistencia a biocidas, tal como resistencia a un antibiótico (por ejemplo, kanamicina, G418, bleomicina, o higromicina), o a un herbicida (por ejemplo, glifosato, clorosulfuron o fosfinotricina). Adicionalmente, un vector de expresión puede incluir 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. Dichas etiquetas pueden insertarse en cualquier lugar dentro del polipéptido, lo que incluye lo mismo en el carboxilo terminal que en el amino terminal.

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

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 ácido nucleico foráneo en cromosomas de plantas se ha estudiado, modificado, y explotado extensamente para la ingeniería genética de plantas. Las moléculas de ácido nucleico recombinante desnudo que comprenden secuencias de ácido nucleico que corresponden a la proteína de tabaco purificada objetivo unida operativamente, en la orientación sentido o antisentido, a secuencias regulatorias, se unen a las 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, dichos vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico recombinante que codifican la proteína de tabaco objetivo purificada se introducen en células de Agrobacterium vivas, las que después transfieren el ácido nucleico dentro de las células vegetales. La transformación por ADN desnudo sin secuencias del vector de T-ADN acompañantes puede llevarse a cabo mediante la fusión de protoplastos de tabaco con liposomas que contienen

ácido nucleico 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 un constructo recombinante depende de varios factores, lo que incluye, pero no se limita a, eficiencia, selectividad, inducibilidad, nivel de expresión deseado, y expresión preferencial en células o tejidos. Para un experto en la técnica es un asunto de rutina modular la expresión de una secuencia codificante mediante la selección y ubicación apropiada de las regiones regulatorias con relación a la secuencia codificante. La transcripción de un polinucleótido puede modularse de manera similar. Algunas regiones regulatorias adecuadas inician la transcripción solo, o predominantemente, en ciertos tipos celulares. Los métodos para identificar 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 isopropilmalato sintasa incluyen los 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV/35S), SSU, OCS, lib4, usp, STLS1, B33, nos o los promotores de ubiquitina o faseolina. Los expertos en la técnica son capaces de generar variaciones múltiples de promotores recombinantes.

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

Los promotores específicos de hoja adecuados incluyen el promotor de piruvato ortofosfato diquinasa (PPDK) de plantas C4 (maíz), promotor cab-m1Ca+2 del maíz, el promotor del gen relacionado con myb de *Arabidopsis thaliana* (Atmyb5), los promotores de ribulosa bifosfato carboxilasa (RBCS) (por ejemplo, los genes de tomate RBCS 1, RBCS2 y RBCS3A expresados en hojas y plántulas cultivadas a la luz, RBCS1 y RBCS2 expresados en frutos de tomate en desarrollo o el promotor de ribulosa bisfosfato carboxilasa expresado casi exclusivamente en células mesófilas en las láminas foliares y las vainas foliares a 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 abscisión de las hojas, un promotor de maíz del gen que codifica una cisteína proteasa. Pueden usarse promotores específicos de anteras adecuados. Pueden seleccionarse promotores adecuados con preferencia por la raíz conocidos por los expertos en la técnica. Los promotores adecuados con preferencia por las semillas incluyen tanto los promotores específicos de semillas (aquellos 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 (aquellos promotores activos durante la germinación de semillas). Dichos promotores con preferencia por las semillas incluyen, pero no se limitan a, Cim1 (mensaje inducido por citoquinina); cZ19B1 (zeína de 19 kDa de maíz); milps (mio-inositol-1-fosfato sintasa); mZE40-2, conocido además como Zm-40; 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, β-conglicinina, lectina de frijol de soja, cruciferina, y similares. Para las monocotiledóneas, los promotores específicos de semilla incluyen, pero no se limitan a, un promotor de la zeína de 15 kDa de maíz, un promotor de la zeína de 22 kDa, un promotor de zeína de 27 kDa, un promotor de la gamma-zeína, un promotor de la γγ-zeína de 27 kDa (tal como el promotor gzw64A, ver núm. de acceso al GenBank S78780), un promotor ceroso, un promotor shrunken 1, un promotor shrunken 2, un promotor de globulina 1 (ver núm. de acceso al GenBank L22344), un promotor ltp2, promotor cim1, promotores de maíz end1 y end2, promotor nuc1, promotor Zm40, eep1 y eep2; promotor lec1, tioredoxina H; promotor mlip15, promotor PCNA2; y el promotor shrunken-2.

Los ejemplos de promotores inducibles incluyen promotores que responden al ataque de patógenos, condiciones anaeróbicas, temperatura elevada, luz, sequía, temperatura fría, o concentración alta de sales. Los promotores inducibles por patógenos incluyen aquellos de las proteínas relacionadas con la patogénesis (proteínas PR), las

cuales se inducen después de una infección por un patógeno (por ejemplo, proteínas PR, proteínas SAR, beta-1,3-glucanasa, quitinasa).

Adicionalmente a los promotores de plantas, otros promotores adecuados pueden derivarse de un origen bacteriano por ejemplo, el promotor de octopina sintasa, el promotor de nopalina sintasa y otros promotores derivados de plásmidos Ti), o pueden 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 escrofularia).

El término "polipéptido de isopropilmalato sintasa" se refiere a un polipéptido que codifica la isopropilmalato sintasa (IPMS) de *Nicotiana tabacum* e incluye variantes polipeptídicas que comprenden, consisten o consisten básicamente en una secuencia de aminoácidos codificada por una variante de polinucleótido con al menos aproximadamente 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 15; fragmentos del (de los) polipéptido(s) de isopropilmalato sintasa, y fragmentos de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13 o SEQ ID NO: 15 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 SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13 o la SEQ ID NO: 15. El polipéptido de isopropilmalato sintasa incluye, además, secuencias que comprenden un grado de identidad o similitud suficiente o sustancial con la SEQ ID NO:2, la SEQ ID NO:11, la SEQ ID NO:13 y la SEQ ID NO: 15 para funcionar como una isopropilmalato sintasa. Los fragmentos del polipéptido de isopropilmalato sintasa retienen normalmente la actividad de la isopropilmalato sintasa. Los polipéptidos de isopropilmalato sintasa incluyen, además, 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 replegamiento o las isomerizaciones, las estructuras tridimensionales o los estados de autoasociación), los que pueden diseñarse deliberadamente o aislarse de manera natural siempre y cuando aún funcionen como una isopropilmalato sintasa. Los polipéptidos de isopropilmalato sintasa pueden estar en forma lineal o cíclica mediante el uso de métodos conocidos. El término "polipéptido de isopropilmalato sintasa" puede referirse, además, a un polipéptido codificado por la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12 o SEQ ID NO: 14 que tiene 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 él o un polipéptido que comprende, consiste o consiste esencialmente de la secuencia expuesta en la SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13 o SEQ ID NO:15 que tiene un 100 % de identidad de secuencia con él.

En otro aspecto, se proporciona un polipéptido aislado que comprende, consiste o 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 descripción, lo que incluye cualquiera de los polipéptidos mostrados en el listado de secuencias. Adecuadamente, 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 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 replegamiento o isomerizaciones, estructuras tridimensionales, o estados de autoasociación), las que pueden modificarse genéticamente deliberadamente o aislarse de manera natural. La variante puede tener alteraciones que producen un cambio silente y resultan en una proteína funcionalmente equivalente. Las sustituciones de aminoácidos deliberadas pueden realizarse sobre la base de la similitud en polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofilicidad y la naturaleza anfipática de los residuos siempre y cuando se retenga la actividad de unión secundaria de la sustancia. Por ejemplo, los aminoácidos cargados negativamente incluyen ácido aspártico y ácido glutámico; los aminoácidos cargados positivamente incluyen lisina y arginina; y los aminoácidos con grupos principales polares no cargados que tienen valores de hidrofilicidad similar incluyen leucina, isoleucina, valina, glicina, alanina, asparagina, glutamina, serina, treonina, fenilalanina, y tirosina. Las sustituciones conservadoras pueden realizarse, por ejemplo de conformidad con la Tabla más abajo. Los aminoácidos en el mismo bloque en la segunda columna y preferentemente en la misma línea en la tercera columna pueden sustituirse entre sí:

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

El polipéptido puede ser una proteína madura o una proteína inmadura o una proteína derivada a partir de una proteína inmadura. Los polipéptidos pueden estar en forma lineal o cíclica mediante el uso de métodos conocidos.

Los polipéptidos comprenden típicamente al menos 10, al menos 20, al menos 30, o al menos 40 aminoácidos contiguos.

En otro aspecto, se proporciona un polipéptido de isopropilmalato sintasa aislado que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que codifica una isopropilmalato sintasa que tiene al menos 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 la SEQ ID NO:2.

En otro aspecto, se proporciona un polipéptido de isopropilmalato sintasa aislado que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que codifica una isopropilmalato sintasa que tiene al menos 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 la SEQ ID NO:11.

En otro aspecto, se proporciona un polipéptido de isopropilmalato sintasa aislado que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que codifica una isopropilmalato sintasa que tiene al menos 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 la SEQ ID NO:13.

En otro aspecto, se proporciona un polipéptido de isopropilmalato sintasa aislado que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que codifica una isopropilmalato sintasa que tiene al menos 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 la SEQ ID NO:15.

En la presente descripción se describen además, adecuadamente, dichos fragmentos que retienen la actividad de la secuencia de longitud completa.

Pueden usarse polipéptidos mutantes para crear plantas mutantes, plantas de origen no natural, o plantas transgénicas que comprenden el polipéptido mutante. Adecuadamente, el polipéptido mutante retiene la actividad del polipéptido sin mutar. La actividad del polipéptido mutante puede ser superior, inferior o aproximadamente la misma que la del polipéptido sin mutar.

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

Es posible usar, además, una columna de afinidad tal como un anticuerpo monoclonal generado contra los polipéptidos, para purificar por afinidad los polipéptidos expresados. Estos polipéptidos pueden eliminarse de una columna de afinidad mediante el uso de técnicas convencionales, por ejemplo, en un tampón de elución con alto contenido de sales y después separarse mediante 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 usada, o eliminarse de manera competitiva mediante el uso del sustrato de origen natural del resto de afinidad.

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, lo que incluye la actividad biológica.

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. Dichas entidades de origen no natural o entidades artificiales pueden

obtenerse, sintetizarse, iniciarse, modificarse, intervenirse, 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 crearse mediante la modificación de una secuencia genética en una primera planta o célula vegetal de origen natural o artificial, lo que da como resultado una secuencia genética modificada (i) que es artificial; o (ii) que se produce naturalmente en una segunda planta o célula vegetal, siempre y cuando la segunda planta o célula vegetal comprende un fondo genético diferente de la primera planta o célula vegetal. Las diferencias en el fondo genético de una planta o célula vegetal 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 microsatélites de ARN).

Puede usarse un número de métodos basados en polinucleótidos para aumentar la expresión génica en las plantas. A manera de ejemplo, puede prepararse un constructo, vector o vector de expresión que es compatible con la planta que va a transformarse que comprende el gen de interés junto con un promotor aguas arriba que es capaz de sobreexpresar el gen en la planta. En la presente descripción se describen promotores ilustrativos. Tras la transformación y cuando se cultiva en condiciones adecuadas, el promotor puede impulsar la expresión para modular (por ejemplo, aumentar) los niveles de esta enzima en la planta, o en un tejido específico de esta. En una modalidad ilustrativa, se genera un vector que porta isopropilmalato sintasa para sobreexpresar el gen en una planta. El vector porta un promotor adecuado aguas arriba del gen de la isopropilmalato sintasa que impulsa su expresión en todos los tejidos de la planta. El vector puede portar, además, un gen de resistencia a antibióticos para conferir la selección de las células y líneas celulares transformadas. En una modalidad, el promotor promueve la actividad transcripcional en los tricomas de una planta. En una modalidad, el promotor tiene actividad transcripcional en los tricomas de una planta. En otra modalidad, el promotor tiene actividad transcripcional específicamente en los tricomas de una planta sin actividad o sustancialmente ninguna actividad en ninguna otra parte de una planta. Adecuadamente, el promotor comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 8 o un promotor de tricoma o un promotor de isopropilmalato sintasa natural. El promotor de la isopropilmalato sintasa natural se localizará en el extremo 5' del gen de la isopropilmalato sintasa. En la SEQ ID NO:6, por ejemplo, el promotor de la isopropilmalato sintasa endógeno se localizará antes del nucleótido 2826. En consecuencia, el gen de la isopropilmalato sintasa puede sobreexpresarse en el tricoma de una planta. Sorprendentemente, los inventores han descubierto que la expresión constitutiva no da como resultado una acumulación tan alta de ésteres de sacarosa en comparación con los niveles alcanzados mediante el uso de expresión específica de tricoma (ver la Figura 4 y la descripción de esta).

De conformidad con una modalidad, la expresión o actividad de la isopropilmalato sintasa se incrementa en una planta que ya es capaz de producir ésteres de sacarosa que contienen beta-metilvalerilo, lo que da como resultado la acumulación aumentada de isopropilmalato sintasa en la misma y, por lo tanto, aumenta la producción de ésteres de sacarosa que contienen beta-metilvalerilo. De conformidad con otra modalidad, la expresión o actividad de la isopropilmalato sintasa se aumenta en una planta que aún no es capaz de producir ésteres de sacarosa que contienen beta-metilvalerilo, lo que da como resultado la acumulación de isopropilmalato sintasa en la misma y, por tanto, la producción de ésteres de sacarosa que contienen beta-metilvalerilo.

Pueden usarse un número de métodos basados en polinucleótidos, lo que incluye ARN antisentido, escisión de ARN dirigida por ribozima, silenciamiento génico postranscripcional, por ejemplo, ARN de interferencia y silenciamiento génico transcripcional, para modular la expresión génica en plantas. Aunque dichos enfoques se usan de forma clásica para reducir o inhibir la expresión génica, pueden usarse, además, para aumentar la expresión génica al aumentar la productividad celular y la calidad de las proteínas que se expresan. Dichos enfoques pueden incluir el silenciamiento de la expresión génica asociada a la apoptosis, la expresión génica asociada a la glicosilación proteica, la lactato deshidrogenasa involucrada en el metabolismo celular y la dihidrofolato reductasa usada para la amplificación génica. Otros enfoques pueden extenderse a reducir o inhibir múltiples objetivos involucrados en diferentes vías celulares para cambiar la regulación génica en las células vegetales.

En algunas modalidades, puede usarse un complemento del polinucleótido de longitud completa o un fragmento de este. Típicamente, un fragmento es de al menos 10 nucleótidos contiguos, por ejemplo, al menos 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 30, 35, 40, 50, 80, 100, 200, 500 nucleótidos contiguos o más. En otra modalidad, el(los) fragmento(s) polinucleotídico(s) es(son) capaces de reducir la expresión o actividad y pueden codificar, por ejemplo, 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, un ARN guía, u otro ARN no traducido y similares. En otra modalidad, el(los) fragmento(s) polinucleotídico(s) codifican un ARN de interferencia.

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

La tecnología antisentido es un método que se conoce bien que puede usarse para modular (por ejemplo, reducir o inhibir) la expresión de un polipéptido. Un polinucleótido a reprimir se clona y se une operativamente a una región regulatoria y una secuencia de terminación de la transcripción de manera que la cadena de ARN antisentido se transcribe. El constructo recombinante se transforma después en las plantas y se produce la cadena de ARN antisentido. El polinucleótido no necesita ser la secuencia completa del gen a reprimir, pero típicamente será complementaria sustancialmente a al menos una porción de la cadena sentido del gen a reprimir.

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

En una modalidad, el polinucleótido de secuencia específica que puede interferir con la traducción de transcritos de ARN es un ARN de interferencia. La interferencia por ARN o el silenciamiento por ARN es un proceso conservado evolutivamente mediante el cual los ARNm específicos pueden dirigirse para la degradación enzimática. Un ARN bicatenario debe introducirse o se produce por una célula (por ejemplo, virus de ARN bicatenario, o polinucleótidos de ARN de interferencia) para iniciar la vía del ARN de interferencia. El ARN bicatenario puede convertirse en múltiples dúplex de ARN de interferencia pequeños de 21-23 pb de longitud por las ARNasas III, que son endonucleasas específicas de ARN bicatenario. Los ARN de interferencia pequeños pueden reconocerse posteriormente mediante complejos de silenciamiento inducidos por ARN que promueven el desenrollamiento de ARN de interferencia pequeño a través de un proceso dependiente de ATP. La cadena antisentido desenrollada del ARN de interferencia pequeño guía los complejos de silenciamiento inducidos por ARN activados al ARNm objetivo que comprende una secuencia complementaria a la cadena antisentido del ARN de interferencia pequeño. 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 reconocerse por los complejos de silenciamiento inducidos por ARN activados. El ARNm objetivo puede escindirse mediante complejos de silenciamiento inducidos por ARN activados en un sitio único definido por el sitio de unión del extremo 5' de la cadena del ARN de interferencia pequeño. El complejo de silenciamiento inducido por ARN activado puede reciclarse para catalizar otro evento de escisión.

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

Los polinucleótidos pueden producirse en diversas formas, lo que incluye como estructuras bicatenarias (es decir, una molécula de ARN bicatenario que comprende una cadena antisentido y una cadena sentido complementaria), estructuras bicatenarias similares a horquilla, o estructuras monocatenarias (es decir, una molécula de ARN monocatenaria que comprende solo una cadena antisentido). Las estructuras pueden comprender un dúplex, dúplex

asimétrico, horquilla o estructura secundaria de horquilla asimétrica, que tiene cadenas sentido y antisentido autocomplementarias. El ARN de interferencia bicatenario puede convertirse enzimáticamente en ARN de interferencia pequeños bicatenarios. Una de las cadenas del dúplex de ARN de interferencia pequeño puede aparearse con una secuencia complementaria dentro del ARNm objetivo y variantes de ARN relacionadas. Los dúplex ARN de interferencia pequeño/ARNm se reconocen por el complejo de silenciamiento inducido por ARN que puede escindir los ARN en múltiples sitios de una manera dependiente de la secuencia, lo que da como resultado la degradación del ARNm objetivo y variantes del ARN relacionadas.

Las moléculas de ARN bicatenario pueden incluir moléculas de ARN 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 ARN de interferencia pequeño se unen por medio de un enlazador(es) basado(s) en un polinucleótido o no basado(s) en un polinucleótido, así como también ARN circular monocatenario que tiene dos o más estructuras de lazo y un tallo que comprende las cadenas sentido y antisentido autocomplementarias, en donde el ARN circular puede procesarse ya sea *in vivo* o *in vitro* para generar una molécula activa de ARN de interferencia pequeño capaz de mediar el ARN de interferencia.

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

Cualquier polinucleótido de ARN de interés puede producirse al seleccionar una adecuada composición de secuencias, tamaño del lazo, y longitud del tallo para producir el dúplex en horquilla. Un intervalo adecuado para diseñar las longitudes del tallo de un dúplex en horquilla, incluye las longitudes del tallo de al menos aproximadamente 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleótidos – tales como aproximadamente 14-30 nucleótidos, aproximadamente 30-50 nucleótidos, aproximadamente 50-100 nucleótidos, aproximadamente 100-150 nucleótidos, aproximadamente 150-200 nucleótidos, aproximadamente 200-300 nucleótidos, aproximadamente 300-400 nucleótidos, aproximadamente 400-500 nucleótidos, aproximadamente 500-600 nucleótidos, y aproximadamente 600-700 nucleótidos. Un intervalo adecuado para diseñar las longitudes del lazo de un dúplex en horquilla, incluye las longitudes del lazo de aproximadamente 4-25 nucleótidos, aproximadamente 25-50 nucleótidos, o más largas si la longitud del tallo del dúplex en horquilla es sustancial. Una molécula de ARN bicatenario o de ARN monocatenario es de entre aproximadamente 15 y aproximadamente 40 nucleótidos de longitud. La molécula de ARN de interferencia pequeño puede ser una molécula de ARN bicatenario o ARN monocatenario entre aproximadamente 15 y aproximadamente 35 nucleótidos de longitud. La molécula de ARN de interferencia pequeño puede ser una molécula de ARN bicatenario o ARN monocatenario entre aproximadamente 17 y aproximadamente 30 nucleótidos de longitud. La molécula de ARN de interferencia pequeño puede ser una molécula de ARN bicatenario o ARN monocatenario entre aproximadamente 19 y aproximadamente 25 nucleótidos de longitud. La molécula de ARN de interferencia pequeño es una molécula de ARN bicatenario o un ARN monocatenario entre aproximadamente 21 a aproximadamente 23 nucleótidos de longitud. Las estructuras de horquillas con regiones dúplex más largas que 21 nucleótidos pueden promover un silenciamiento dirigido por el ARN de interferencia pequeño efectivo, independientemente de la secuencia y la longitud del bucle.

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

Pueden seleccionarse secuencias de ARNm objetivo que sean entre aproximadamente 14 y aproximadamente 30 nucleótidos de longitud que cumplan uno o más de los criterios anteriores, o pueden seleccionarse secuencias objetivo que están entre aproximadamente 16 y aproximadamente 30 nucleótidos de longitud que cumplan uno o más de los criterios anteriores. Pueden seleccionarse secuencias objetivo que sean entre aproximadamente 19 y aproximadamente 30 nucleótidos de longitud que cumplan con uno o más de los criterios anteriores. Se seleccionan secuencias objetivo que sean entre aproximadamente 19 y aproximadamente 25 nucleótidos de longitud que cumplan con uno o más de los criterios anteriores.

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

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

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

Un método para inducir el silenciamiento por ARN bicatenario en plantas es la transformación con un constructo génico que produce ARN en horquilla (ver Smith *y otros*, (2000) *Nature*, 407, 319-320). Tales 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). Adecuadamente, la longitud del tallo es de aproximadamente 50 nucleótidos a aproximadamente 1 kilobase de longitud. Los métodos para producir ARN en horquilla empalmado con intrones se describen bien en la técnica (ver, por ejemplo, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* (2008) 72, 2, 615-617).

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

Cuando la molécula de ARN de interferencia comprende un saliente en 3' en un extremo de la molécula, el otro extremo puede ser un extremo romo o tener también un saliente (5' o 3'). Cuando la molécula de ARN de interferencia comprende un saliente en ambos extremos de la molécula, la longitud de los salientes puede ser la misma o diferente. En una modalidad, la molécula de ARN de interferencia comprende salientes en 3' de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 nucleótidos en ambos extremos de la molécula. En una modalidad

adicional, la molécula de ARN de interferencia es un ARN bicatenario que tiene un saliente en 3' de 2 nucleótidos en ambos extremos de la molécula. En aún otra modalidad, los nucleótidos que comprenden el saliente del ARN de interferencia son dinucleótidos TT o dinucleótidos UU.

Cuando se determina el porcentaje de identidad de la molécula de ARN de interferencia que comprende uno o más salientes con respecto a la secuencia de ARNm objetivo, el(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 5' o 3' terminales de la doble cadena pueden modificarse sin una pérdida significativa de la actividad de la molécula de ARN de interferencia pequeño.

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

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

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'-fluoro, modificaciones 2'-alquilo, modificaciones a la cadena principal no cargada, modificaciones morfolino, modificaciones 2'-O-metil, y fosforamidato. Así, al menos un grupo 2'-hidroxilo de los nucleótidos en un ARN bicatenario se reemplaza por un grupo químico. Además, al menos un nucleótido puede modificarse para formar un nucleótido bloqueado. Tal nucleótido bloqueado contiene un puente de metileno o etileno que conecta el oxígeno 2' de la ribosa con el carbono 4' de la ribosa. La introducción de un nucleótido bloqueado en un oligonucleótido mejora la afinidad por secuencias complementarias y aumenta la temperatura de fusión en varios grados.

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

De conformidad con una modalidad, la expresión o actividad de la isopropilmalato sintasa se reduce en una planta que ya es capaz de producir ésteres de sacarosa que contienen beta-metilvalerilo, lo que da como resultado la disminución de la acumulación de isopropilmalato sintasa en el mismo y, por consiguiente, disminuye la producción de ésteres de sacarosa que contienen beta-metilvalerilo.

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 dicha síntesis puede emplearse adicionalmente o alternativamente.

Diversas modalidades se dirigen a vectores de expresión que comprenden uno o más de los polinucleótidos descritos en la presente descripción o constructos de ARN de interferencia que comprenden uno o más polinucleótidos.

Diversas modalidades se dirigen a vectores de expresión que comprenden uno o más de los polinucleótidos o uno o más constructos de ARN de interferencia.

Diversas modalidades se dirigen a vectores de expresión que comprenden uno o más polinucleótidos o uno o más constructos de ARN de interferencia que codifican uno o más polinucleótidos de ARN de interferencia capaces de autohibridar para formar una estructura de horquilla, en la que el constructo comprende (a) uno o más de los polinucleótidos descritos en la presente descripción; (b) una segunda secuencia que codifica un elemento espaciador que incluye un intrón, que cuando se corta y empalma, 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 se une operativamente a la primera secuencia y a la tercera secuencia.

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

Así, diversas modalidades se dirigen a vectores de expresión que comprenden polinucleótidos de isopropilmalato sintasa o constructos de ARN de interferencia que codifican polinucleótidos de ARN de interferencia capaces de autohibridar, en los que el constructo comprende (a) uno o más de los polinucleótidos descritos en la presente descripción; y (b) una segunda secuencia que comprende una secuencia complementaria (por ejemplo, complementaria inversa) a la primera secuencia, ubicada en la misma orientación que la primera secuencia.

Se proporcionan diversas composiciones y métodos para reducir los niveles de expresión endógenos de isopropilmalato sintasa al promover la cosupresión de la expresión génica. El fenómeno de cosupresión se produce como un resultado de introducir múltiples copias de un transgén en una célula vegetal huésped. La integración de múltiples copias de un transgén puede 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 de ambos, el gen endógeno y el transgén, puede producirse por metilación extensa de los loci silenciados (es decir, el promotor endógeno y el gen endógeno de interés) que puede impedir la transcripción. Alternativamente, en algunos casos, la cosupresión del gen endógeno y el transgén puede producirse mediante silenciamiento génico post transcripcional, en la cual pueden producirse los transcritos pero el aumento de las tasas de degradación impide la acumulación de transcritos. El mecanismo para la cosupresión mediante silenciamiento génico post transcripcional parece asemejarse a la interferencia por ARN, en que el ARN parece ser tanto un cebador importante como un objetivo en estos procesos, y puede mediarse al menos en parte por la misma maquinaria molecular, a través posiblemente de la degradación de los ARNm guiada por ARN.

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

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

Alternativamente, el direccionamiento a los genes puede ser por inactivación mediante la introducción de transposones (por ejemplo, elementos IS) en los genomas de las plantas de interés. Estos elementos genéticos móviles pueden introducirse por fecundación sexual cruzada y los mutantes por inserción pueden tamizarse para determinar la pérdida de la actividad de proteína. El gen interrumpido en una planta parental puede introducirse en otras plantas mediante el cruzamiento de la planta parental con una planta no sujeta a mutagénesis inducida por transposones mediante, por ejemplo, fertilización cruzada sexual. Puede usarse cualquier técnica de mejoramiento estándar conocida por los expertos en la técnica. En una modalidad, uno o más genes pueden inactivarse mediante la inserción de uno o más transposones. Las mutaciones pueden dar como resultado la interrupción homocigótica de uno o más genes, la interrupción heterocigótica de uno o más genes, o una combinación de ambas interrupciones homocigóticas y heterocigóticas si se interrumpe más de un gen. Los elementos transponibles adecuados incluyen retrotransposones, retroposones, y elementos similares a SINE. Tales métodos se conocen por los expertos en la técnica.

Alternativamente, el direccionamiento a los genes puede ser por inactivación al introducir ribozimas derivadas a partir de un número de ARN circulares pequeños que son capaces de autoescisión y replicación en plantas. Estos

ARN pueden replicarse lo mismo solos (ARN viroides) o con un virus auxiliar (ARN satélites). Los ejemplos de ARN adecuados incluyen los derivados del viroide del veteado marrón rojizo del aguacate y ARN satélites derivados de virus de la mancha de anillo del tabaco, virus del veteado transitorio de la alfalfa, virus del moteado del tabaco suave, virus del moteado nodoso de flor del género Solanum, y virus del moteado del trébol subterráneo. Varias ribozimas específicas de ARN objetivo se conocen por los expertos en la técnica.

En algunas modalidades, la expresión de un polipéptido de isopropilmalato sintasa puede modularse por medios no transgénicos, tal como crear una mutación en un gen. 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 y una repetición de una secuencia simple. Después de la mutación, puede realizarse el tamizaje para identificar deleciones que crean codones de parada prematuros o de cualquier otra manera genes no funcionales. Después de la mutación, puede realizarse el tamizaje para identificar mutaciones que crean genes funcionales capaces de expresarse a niveles elevados. El 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. Las mutaciones específicas en los polinucleótidos pueden crearse, además, de manera que puedan dar como resultado una expresión génica reducida o aumentada, estabilidad reducida o aumentada del ARNm, o estabilidad reducida o aumentada de la proteína. 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 modulados del polipéptido. Por ejemplo, las plantas mutantes pueden tener una única mutación en un único gen; varias mutaciones en un único gen; una única mutación en dos o más o tres o más genes; o múltiples mutaciones en dos o más o tres o más genes. En consecuencia, se describen plantas mutantes que comprenden las variantes polipeptídicas mutantes.

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

Los mutágenos que crean mutaciones puntuales, deleciones cortas, inserciones, transversiones, o transiciones, lo que incluye mutágenos químicos o radiación, pueden usarse para crear las mutaciones. Los mutágenos incluyen, pero no se limitan a, metanosulfonato de etilo, metanosulfonato de metilo, N-etil-N-nitrosourea, trietilmelamina, N-metil-N-nitrosourea, procarbazina, clorambucilo, ciclofosfamida, sulfato de dietilo, monómero de acrilamida, melfalán, mostaza de nitrógeno, vincristina, dimetilnitrosamina, N-metil-N'-nitro-nitrosoguanidina, nitrosoguanidina, 2-aminopurina, 7,12 dimetil-benzo(a)antraceno, óxido de etileno, hexametilfosforamida, bisulfán, diepoxialcanos (diepoxioctano, diepoxibutano y similares), dihidrocloruro de 2-metoxi-6-cloro-9[3-(etil-2-cloro-etil)aminopropilamino]acridina y formaldehído. Además, se contemplan las mutaciones espontáneas en el locus de isopropilmalato sintasa que pueden no haberse causado directamente por el mutágeno siempre y cuando resulten en el fenotipo deseado. Los agentes mutagénicos adecuados incluyen además, por ejemplo, radiación ionizante – tales como rayos X, rayos gamma, radiación con neutrones rápidos y radiación UV.

Cualquier método de preparación de ácidos nucleicos de plantas, conocido por los expertos en la técnica, puede usarse para preparar el ácido nucleico de plantas para el tamizaje de mutaciones.

El ácido nucleico preparado a partir de plantas individuales, células vegetales, o material vegetal puede agruparse opcionalmente con el objetivo de lograr un tamizaje expedito en busca de mutaciones en el gen de isopropilmalato sintasa de la población de plantas que se origina del tejido, células o material vegetal sometido a mutagénesis. 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 agrupan opcionalmente, pueden someterse a técnicas de amplificación específicas de polinucleótidos, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Cualquiera de uno o más cebadores o sondas específicos para el gen de isopropilmalato sintasa o las secuencias inmediatamente adyacentes a este pueden usarse para amplificar las secuencias dentro de la muestra de ácidos nucleicos agrupada opcionalmente. Preferentemente, se diseñan uno o más cebadores para amplificar las regiones del locus de isopropilmalato sintasa 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 isopropilmalato sintasa. 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) puede(n) diseñarse en base a las secuencias descritas en la presente descripción mediante el uso de métodos que se comprenden bien en la técnica. Los polimorfismos pueden identificarse por medios conocidos en la técnica. En un aspecto adicional, se proporciona un método de preparación de una planta mutante. El método implica proporcionar al menos una célula de una planta que comprende un gen que codifica un polipéptido de isopropilmalato sintasa funcional. A continuación, al menos una célula de la planta se trata en condiciones efectivas para modular la actividad del gen de isopropilmalato sintasa. La al menos una célula vegetal mutante se propaga después para obtener una planta mutante, donde la planta mutante tiene un nivel modulado del polipéptido de isopropilmalato sintasa 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 cuales el genotipo se modifica en comparación con una planta control, adecuadamente, 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 manera 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, el experto es capaz de buscar e identificar una planta que porta naturalmente en su genoma uno o más alelos mutantes del gen de isopropilmalato sintasa que confieren un rasgo deseado. El(los) alelo(s) mutante(s) que se produce(n) naturalmente pueden transferirse a la segunda planta mediante diversos métodos, lo que incluye mejoramiento, retrocruzamiento e introgresión para producir líneas, variedades o híbridos que tienen una o más mutaciones en el gen de isopropilmalato sintasa. Las plantas que muestran un rasgo deseado pueden tamizarse de una mezcla de plantas mutantes. Adecuadamente, la selección se lleva a cabo mediante el uso del conocimiento de las secuencias de nucleótidos de isopropilmalato sintasa como se describe en la presente descripción. En consecuencia, es posible tamizar en busca de un rasgo genético que indique cambios en la composición de ésteres de sacarosa 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 de la presente invención se refiere a un método para identificar una planta mutante que comprende las etapas de: (a) proporcionar una muestra que comprende un polinucleótido de isopropilmalato sintasa procedente de una planta; y (b) determinar la secuencia de ácidos nucleicos del polinucleótido de isopropilmalato sintasa, en donde una diferencia en la secuencia del polinucleótido de isopropilmalato sintasa en comparación con el polinucleótido de isopropilmalato sintasa de una planta control indica que dicha planta es una planta mutante para isopropilmalato sintasa. En otro aspecto, se proporciona un método para identificar una planta mutante que tiene un cambio en la composición de ésteres de sacarosa en comparación con una planta control, que comprende las etapas de: (a) proporcionar una muestra procedente de una planta que va a tamizarse; (b) determinar si dicha muestra comprende una o más mutaciones en el polinucleótido de isopropilmalato sintasa; y (c) determinar la composición de ésteres de sacarosa en dicha planta; en donde si dicha muestra comprende una o más mutaciones en el polinucleótido de isopropilmalato sintasa 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 la composición de ésteres de sacarosa en comparación con una planta control en la cual la expresión o la actividad de isopropilmalato sintasa no se ha reducido indica que una planta mutante tiene un cambio en la composición de ésteres de sacarosa. En otro aspecto, se proporciona un método para preparar una planta mutante que tiene un cambio en la composición de ésteres de sacarosa en comparación con una planta control, que comprende las etapas de: (a) proporcionar una muestra a partir de una primera planta; (b) determinar si dicha muestra comprende una o más mutaciones en el polinucleótido de isopropilmalato sintasa que dan como resultado un cambio en la composición de ésteres de sacarosa 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 mediante 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 tiene un cambio en la composición de ésteres de sacarosa en comparación con una planta control, que comprende las

etapas de: (a) proporcionar una muestra a partir de una primera planta; (b) determinar si dicha muestra comprende una o más mutaciones en el polinucleótido de isopropilmalato sintasa que dan como resultado el cambio en la composición de ésteres de sacarosa en ella; e (c) introgresar la una o más mutaciones a partir 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 isopropilmalato sintasa. 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, la planta mutante puede tener una o más mutaciones localizadas en más de una región de la planta – tal como dentro de la secuencia del polinucleótido de isopropilmalato sintasa - 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, la planta mutante no tiene 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 isopropilmalato sintasa; o en uno o más, dos o más, tres o más, cuatro o más o cinco o más intrones del polinucleótido de isopropilmalato sintasa; en un promotor del polinucleótido de isopropilmalato sintasa; en la región no traducida 3' del polinucleótido de isopropilmalato sintasa; en la región no traducida 5' del polinucleótido de isopropilmalato sintasa; en la región de codificación del polinucleótido de isopropilmalato sintasa; o en la región no codificante del polinucleótido de isopropilmalato sintasa; o cualquier combinación de dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, cuatro o más, cinco o más, o seis o más partes de esta. 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 isopropilmalato sintasa 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 ácidos nucleicos del gen que codifica isopropilmalato sintasa o una variante o un fragmento de este, en donde una diferencia en dicha secuencia indica una o más mutaciones en ella.

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

Una proteína con dedos de zinc puede diseñarse para que reconozca un sitio objetivo seleccionado en un gen de isopropilmalato sintasa. 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 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 diversas modalidades, una nucleasa con dedos de zinc introduce una ruptura de la doble cadena en una región regulatoria, una región codificante, o una región no codificante de una secuencia de ADN genómico de un polinucleótido y conduce a una reducción del nivel de expresión de un polinucleótido, o una reducción en la actividad de la proteína codificada de esta manera. La escisión por nucleasas con dedos de zinc frecuentemente resulta en la deleción de ADN en el sitio de escisión después de la reparación del ADN por la unión de extremos no homólogos.

En otras modalidades, puede seleccionarse una proteína con dedos de zinc para unirse a una secuencia regulatoria de un polinucleótido de isopropilmalato sintasa. 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 isopropilmalato sintasa, y métodos para obtener dicha 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, se proporcionan métodos para producir plantas mutantes, de origen no natural o transgénicas o de cualquier otra manera modificadas genéticamente mediante el uso de meganucleasas, tales como meganucleasas I-CreI. Las meganucleasas de origen natural, así como también 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 isopropilmalato sintasa. 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 uno o más de los polinucleótidos descritos en la presente descripción en una célula vegetal o planta. Otros aspectos se refieren, además, a un método para inactivar un polinucleótido en una planta mediante el uso de una meganucleasa que comprende: (a) proporcionar una célula vegetal que comprende uno o más polinucleótidos descritos en la presente descripción; (b) introducir una meganucleasa o un constructo que codifica una meganucleasa en dicha célula vegetal; y (c) permitir que la meganucleasa inactive sustancialmente el polinucleótido.

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

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

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

Además, pueden usarse meganucleasas y otras estrategias de reparación del ADN para desencadenar una recombinación heteróloga entre un ADN contenido en una célula vegetal y el ADN objetivo. El ADN objetivo comprende típicamente al menos una, preferentemente, dos regiones que son homólogas al ADN contenido en la célula vegetal. Tras la reparación del ADN por la célula, los extremos homólogos se unen, lo que da como resultado la introducción del ADN objetivo en la célula.

En una modalidad adicional, los niveles de expresión de la isopropilmalato sintasa en una planta pueden aumentarse mediante la inserción del gen directamente en el genoma del cloroplasto ya que la isopropilmalato sintasa es una proteína cloroplástica codificada en el núcleo de la célula vegetal. Igualmente, el aumento del transporte o la

importación de proteína de isopropilmalato sintasa en los cloroplastos puede modular, además, el patrón de actividad.

Un objeto es proporcionar plantas mutantes, transgénicas o de origen no natural que exhiban niveles de ésteres de sacarosa modulados a la vez que mantienen sustancialmente el mismo aspecto visual en comparación con una planta control. En consecuencia, se describen en la presente descripción plantas o células mutantes, transgénicas o de origen no natural que tienen niveles modulados de ésteres de sacarosa en comparación con las células control o las plantas control. Las plantas o células mutantes, transgénicas o de origen no natural se han modificado para modular la síntesis o la actividad de la isopropilmalato sintasa descrita en la presente descripción, mediante la modulación de la expresión de uno o más polipéptidos que codifican las secuencias de polinucleótidos descritas en la presente descripción.

Un aspecto adicional, se refiere a una planta o célula mutante, de origen no natural o transgénica, en donde la expresión de o la actividad de la isopropilmalato sintasa se modula y una parte de la planta tiene un aumento o una disminución de los niveles de ésteres de sacarosa de al menos un 5 % en comparación con una planta control en la cual la expresión o la actividad de dicha enzima no se ha modulado. Un aún otro aspecto, se refiere a una planta o célula mutante, de origen no natural o transgénica, en donde la expresión de la isopropilmalato sintasa o la actividad de la proteína codificada de esta manera se modula y en donde los niveles de ésteres de sacarosa en aerosol se incrementan o disminuyen en al menos un 5 % en comparación con el aerosol a partir de la planta control.

El cambio en el contenido de ésteres de sacarosa 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.

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.

Las plantas adecuadas para su uso en la modificación genética de conformidad incluyen plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas y sistemas de células vegetales, lo que incluye 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. (sauce), Eucalyptus spp. (eucalipto), Triticosecale, 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), 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 (betabel), o Pennisetum glaucum (mijo perlado).

Diversas modalidades se dirigen a plantas mutantes, plantas de origen no natural o plantas transgénicas modificadas para reducir los niveles de expresión génica de la isopropilmalato sintasa, lo que produce de esta manera plantas, tal como plantas de tabaco, en las cuales el nivel de expresión de isopropilmalato sintasa 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*, lo que incluye *N. rustica* y *N. tabacum* (por ejemplo, LA B21, LN KY171, TI 1406, Basma, Galpao, Perique, Beinhart 1000-1, K326, Hicks Broadleaf y Petico). 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. thyrsiflora, N. tomentosa, N. tomentosiformis, N. trigonophylla, N. umbratica, N. undulata, N. velutina, N. wigandioides, y N. x sanderae.* En una modalidad muy preferida, la planta es una planta de tabaco, tal como una planta del género Nicotiana o de la especie *Nicotiana tabacum.*

El uso de cultivares de tabaco y cultivares de tabaco élite se contemplan, además, en la presente descripción. La planta transgénica, de origen no natural o mutante puede ser, por lo tanto, una variedad de tabaco o un cultivar de tabaco élite que comprende uno o más transgenes, o una o más mutaciones genéticas o sus combinaciones. La(s) mutación(es) genética(s) (por ejemplo, uno o más polimorfismos) pueden ser mutaciones que no existen naturalmente en la variedad de tabaco individual o cultivar de tabaco (por ejemplo, cultivar de tabaco élite) o pueden ser mutación(es) genética(s) que se producen naturalmente siempre y cuando la mutación no se produzca naturalmente en la variedad de tabaco individual o cultivar de tabaco (por ejemplo, cultivar de tabaco élite). 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, tabaco Galpao DT 538 LC, GL 26H, GL 350, GL 600, GL 737, GL 939, GL 973, HB 04P, HB 04P LC, HB3307PLC, Híbrido 403LC, Híbrido 404LC, Híbrido 501 LC, K 149, K 326, K 346, K 358, K394, K 399, K 730, KDH 959, KT 200, KT204LC, KY10, KY14, KY 160, KY 17, KY 171, KY 907, KY907LC, 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, tabaco “Perique”, PVH03, PVH09, PVH19, PVH50, PVH51, R 610, R 630, R 7-11, R 7-12, RG 17, RG 81, RG H51, RGH 4, RGH 51, RS 1410, Speight 168, Speight 172, Speight 179, Speight 210, Speight 220, Speight 225, Speight 227, Speight 234, Speight G-28, Speight G-70, Speight H-6, Speight H20, Speight NF3, TI 1406, TI 1269, TN 86, TN86LC, TN 90, TN 97, TN97LC, TN D94, TN D950, TR (Tom Rosson) Madole, VA 309, VA359, AA 37-1, 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 Elassona, 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. En ciertas modalidades, se prefieren los cultivares y los cultivos de élite. Las especies de *Nicotiana tabacum* pueden usarse en ciertas otras modalidades. *Puede usarse el tipo Burley de Nicotiana tabacum*.

Las modalidades se dirigen, además, a composiciones y métodos para producir plantas mutantes, de origen no natural o transgénicas que se han modificado para modular la expresión o la actividad de la isopropilmalato sintasa, lo cual puede dar como resultado plantas o componentes de plantas con niveles modulados de ésteres de sacarosa en comparación con un control. La modulación de los niveles de ésteres de sacarosa en plantas puede usarse para generar plantas en las cuales el perfil de sabor del aerosol generado de la misma se cambia. Por lo tanto, la presente invención puede proporcionar nuevas oportunidades de mezcla para generar sabores de tabaco convenientes. Por lo tanto, a manera de ejemplo, el contenido de éster de sacarosa de la planta puede aumentarse al incrementar la expresión o la actividad de la isopropilmalato sintasa lo cual puede dar como resultado una planta capaz de liberar niveles elevados de moléculas de sabor que son más similares al tabaco oriental. Por lo tanto, a manera de ejemplo adicional, el contenido de éster de sacarosa de la planta puede reducirse al disminuir la

expresión o la actividad de la isopropilmalato sintasa, lo cual puede dar como resultado una planta capaz de liberar niveles más bajos de moléculas de sabor, que son más similares al tabaco curado en atmósfera artificial.

En un aspecto adicional, se proporciona un método para mezclar tabaco que comprende la etapa de, reemplazar o añadir al uno o más tipos de tabaco en una mezcla de tabaco, tabaco (por ejemplo, hojas de tabaco o una composición derivada o que puede derivarse de hojas de tabaco) derivada de una planta transgénica, mutante o de origen no natural en la cual el contenido de éster de sacarosa de la planta se ha modulado (por ejemplo, aumentado o disminuido) al modular (preferentemente, aumentar) la expresión o la actividad de la isopropilmalato sintasa como se describe en la presente descripción. En otro aspecto, se proporciona un método para mezclar tabaco que comprende la etapa de reemplazar, reducir u omitir el tabaco de tipo oriental en una mezcla de tabaco y añadir tabaco (por ejemplo, hojas de tabaco o una composición derivada o que puede derivarse de hojas de tabaco) derivado de una planta transgénica, mutante o de origen no natural en la cual el contenido de éster de sacarosa de la planta se ha modulado (preferentemente, aumentado) al modular (preferentemente, aumentar) la expresión o la actividad de la isopropilmalato sintasa como se describe en la presente descripción. La sustitución, reducción o adición de tabaco (tal como tabaco oriental) puede corresponder a aproximadamente 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % del tabaco que se reemplaza, reduce o añade.

Un aspecto adicional se refiere a un método para modular el sabor del tabaco o un producto de tabaco que comprende, añadir al tabaco (por ejemplo, hojas de tabaco o una composición derivada o que puede derivarse de hojas de tabaco) o el producto de tabaco, tabaco derivado o que puede derivarse de una planta transgénica, mutante o de origen no natural en la cual el contenido de éster de sacarosa de la planta se modula como se describe en la presente descripción.

Un aspecto adicional se relaciona con el uso del agente que modula la expresión o la actividad de la isopropilmalato sintasa para modular el sabor del tabaco o de un producto de tabaco.

La modulación de los niveles de ésteres de sacarosa en plantas puede usarse, además, para generar plantas en las cuales se altere la resistencia de la planta a las plagas. La resistencia a las plagas de la planta puede aumentarse al incrementar los niveles de producción de ésteres de sacarosa como se describe en la presente descripción. La resistencia a las plagas de la planta puede reducirse al disminuir los niveles de producción de ésteres de sacarosa como se describe en la presente descripción.

Las composiciones de los ésteres de sacarosa que se producen en las plantas descritas en la presente descripción pueden extraerse y purificarse opcionalmente a partir de estas para diversos otros usos, tales como en fármacos, aditivos alimentarios, saborizantes para fumar y como componentes de pesticidas orgánicos y similares. En una modalidad, los ésteres de sacarosa se extraen de hojas o de la superficie de hojas. En consecuencia, los productos, tales como fármacos, aditivos alimentarios, saborizantes para fumar y pesticidas orgánicos que comprenden los ésteres de sacarosa, son un aspecto adicional de esta descripción.

Los ésteres de sacarosa de conformidad con la presente descripción tienen la estructura general mostrada en la Figura 5, en donde R1, R2, R3, R4 y R5 son átomos de hidrógeno o cadenas de acilo. Las cadenas de acilo que pueden esterificarse en ésteres de sacarosa se exponen en la Figura 6. Algunos ejemplos de ésteres de sacarosa específicos se exponen en la Tabla 1 y la Figura 2.

El número total de carbonos en las cadenas de acilo de R1, R2 y R4 en cada uno de los uno o más ésteres de sacarosa puede ser, por ejemplo, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18; adecuadamente, 14, 15, 16, 17 o 18; adecuadamente, 16, 17 o 18; o adecuadamente 14 o 15. Siempre y cuando este número total de carbonos se presente en cada uno de los ésteres de sacarosa, entonces las cadenas de acilo constituyentes pueden seleccionarse de cualquiera de las expuestas en la Figura 6. Adecuadamente, el éster de sacarosa tiene un acetilo en R3 y un acetilo o hidrógeno en R5. Adecuadamente, el éster de sacarosa tiene un acetilo en R3 y un hidrógeno en R5. Adecuadamente, una o más, dos o más o tres de más de las cadenas de acilo serán beta-metilvalerilo, especialmente cuando se presenta una cadena de acilo de 6 carbonos.

En una modalidad, el éster de sacarosa es un éster de sacarosa que tiene un acetilo o un hidrógeno en R3 y R5 y una cadena de acilo con 3, 4, 5 o 6 carbonos en cualquiera de las posiciones R1, R2 y R4. Adecuadamente, el éster de sacarosa tiene un acetilo en R3 y un acetilo o hidrógeno en R5. Adecuadamente, el éster de sacarosa tiene un acetilo en R3 y un hidrógeno en R5. En otra modalidad, el éster de sacarosa tiene un acetilo o un hidrógeno en R3 y R5 y una cadena de acilo con 4, 5 o 6 carbonos en cualquiera de las posiciones R1, R2 y R4. Adecuadamente, el éster de sacarosa tiene un acetilo en R3 y un acetilo o hidrógeno en R5. Adecuadamente, el éster de sacarosa tiene un acetilo en R3 y un hidrógeno en R5. En otra modalidad, el éster de sacarosa tiene un acetilo o un hidrógeno en R3 y R5 y una cadena de acilo con 5 o 6 carbonos en cualquiera de las posiciones R1, R2 y R4. Adecuadamente, el éster de sacarosa tiene un acetilo en R3 y un acetilo o hidrógeno en R5. Adecuadamente, el éster de sacarosa tiene un acetilo en R3 y un hidrógeno en R5. En otra modalidad, el éster de sacarosa tiene un acetilo o un hidrógeno en R3 y R5 y una cadena de acilo con 6 carbonos en las posiciones R1, R2 y R4. Adecuadamente, el éster de sacarosa tiene un acetilo en R3 y un acetilo o hidrógeno en R5. Adecuadamente, el éster de sacarosa tiene un acetilo en R3 y un hidrógeno en R5.

En una modalidad, el éster de sacarosa tiene un acetilo o un hidrógeno en R3 y R5 y una cadena de acilo con 3, 4, 5 o 6 carbonos en la posición R1, una cadena de acilo con 3, 4, 5 o 6 carbonos en la posición R2 y una cadena de acilo con 3, 4, 5 o 6 carbonos en la posición R4. Adecuadamente, el éster de sacarosa tiene un acetilo en R3 y un acetilo o hidrógeno en R5. Adecuadamente, el éster de sacarosa tiene un acetilo en R3 y un hidrógeno en R5. En otra modalidad, el éster de sacarosa tiene un acetilo o un hidrógeno en R3 y R5 y una cadena de acilo con 4, 5 o 6 carbonos en la posición R1, una cadena de acilo con 4, 5 o 6 carbonos en la posición R2 y una cadena de acilo con 4, 5 o 6 carbonos en la posición R4. Adecuadamente, el éster de sacarosa tiene un acetilo en R3 y un acetilo o hidrógeno en R5. Adecuadamente, el éster de sacarosa tiene un acetilo en R3 y un hidrógeno en R5. En otra modalidad, el éster de sacarosa tiene un acetilo o un hidrógeno en R3 y R5 y una cadena de acilo con 5 o 6 carbonos en la posición R1, una cadena de acilo con 5 o 6 carbonos en la posición R2 y una cadena de acilo con 5 o 6 carbonos en la posición R4. Adecuadamente, el éster de sacarosa tiene un acetilo en R3 y un acetilo o hidrógeno en R5. Adecuadamente, el éster de sacarosa tiene un acetilo en R3 y un hidrógeno en R5.

En una modalidad, el éster de sacarosa tiene un acetilo o un hidrógeno en R3 y R5 y una cadena de acilo con 6 carbonos al menos en una de las posiciones R1, R2 y R4. Adecuadamente, el éster de sacarosa tiene un acetilo en R3 y un acetilo o hidrógeno en R5. Adecuadamente, el éster de sacarosa tiene un acetilo en R3 y un hidrógeno en R5.

En una modalidad, el éster de sacarosa tiene un acetilo o un hidrógeno en R3 y R5 y una cadena de acilo con 6 carbonos en la posición R1, una cadena de acilo con 6 carbonos en la posición R2 y una cadena de acilo con 6 carbonos en la posición R4. Adecuadamente, el éster de sacarosa tiene un acetilo en R3 y un acetilo o hidrógeno en R5. Adecuadamente, el éster de sacarosa tiene un acetilo en R3 y un hidrógeno en R5.

En una modalidad, el éster de sacarosa es un éster de sacarosa que contiene beta-metilvalerilo (cadena ramificada).

En una modalidad, el éster de sacarosa tiene la estructura general mostrada en la Figura 5 y en donde cada uno de R1 a R5 es una cualquiera de las cadenas de acilo seleccionadas del grupo que consiste de acetilo, butirilo, propionilo o un isómero de este, isobutirilo, valerilo (pentanoilo), 2-metil butirilo, isovalerilo, isopentenoilo, pentenoilo, hexanoilo o un isómero de este, 2-metilvalerilo, beta-metilvalerilo y 4-metilvalerilo. En otra modalidad, el éster de sacarosa tiene la estructura general mostrada en la Figura 5 y en donde R3 es acetilo y cada uno de R1, R2, R4 y R5 es una cualquiera de las cadenas de acilo seleccionadas del grupo que consiste de acetilo, butirilo, propionilo o un isómero de este, isobutirilo, valerilo (pentanoilo), 2-metil-butirilo, isovalerilo, isopentenoilo, pentenoilo, hexanoilo o un isómero de este, 2-metilvalerilo, beta-metilvalerilo y 4-metilvalerilo. En una modalidad, se prefiere que la cadena de acilo con 6 carbonos sea una cadena ramificada. En otra modalidad, se prefiere que la cadena de acilo con 6 carbonos sea beta-metilvalerilo.

En otra modalidad, el éster de sacarosa tiene la estructura general mostrada en la Figura 5 y en donde R3 es hidrógeno o acetilo, R5 es hidrógeno o acetilo y cada uno de R1, R2 y R4 es una cualquiera de las cadenas de acilo seleccionadas del grupo que consiste de acetilo, butirilo, propionilo o un isómero de este, isobutirilo, valerilo (pentanoilo) o un isómero de este, 2-metil-butirilo, isovalerilo, isopentenoilo, pentenoilo, hexanoilo o un isómero de este, 2-metilvalerilo, beta-metilvalerilo y 4-metilvalerilo. Los ésteres de sacarosa individuales se describen en la Tabla 1 y la Figura 2.

En otra modalidad, el éster de sacarosa tiene la estructura general mostrada en la Figura 5 y en donde R3 es acetilo, R5 es hidrógeno o acetilo y cada uno de R1, R2 y R4 es cualquiera de las cadenas de acilo seleccionadas del grupo que consiste de acetilo, butirilo, propionilo o un isómero de este, isobutirilo, valerilo (pentanoilo) o un isómero de este, 2-metil-butirilo, isovalerilo, isopentenoilo, pentenoilo, hexanoilo o un isómero de este, 2-metilvalerilo, beta-metilvalerilo y 4-metilvalerilo.

En otra modalidad, el éster de sacarosa tiene la estructura general mostrada en la Figura 5 y en donde R3 es acetilo, R5 es butirilo o acetilo; R1 es butirilo, propionilo o un isómero de este, valerilo (pentanoilo) o un isómero de este, o hexanoilo o un isómero de este; R2 es propionilo o un isómero de este, valerilo (pentanoilo) o un isómero de este, o hexanoilo o un isómero de este, y R4 es valerilo (pentanoilo) o un isómero de este, o hexanoilo o un isómero de este.

En otra modalidad, el éster de sacarosa tiene la estructura general mostrada en la Figura 5 y en donde R3 es acetilo, R5 es hidrógeno o acetilo; R1 es propionilo o un isómero de este, valerilo (pentanoilo) o un isómero de este, o hexanoil o un isómero de este; R2 es valerilo (pentanoilo) o un isómero de este, o hexanoilo o un isómero de este; y R4 es hexanoilo o un isómero de este.

En una modalidad, el éster de sacarosa que se modula tiene la estructura general mostrada en la Figura 5, en donde R3=acetilo, R1=propionilo o un isómero de este, R2= propionilo o un isómero de este, R4=hexanoilo o un isómero de este y R5 es hidrógeno o acetilo; o un éster de sacarosa como se muestra en la Figura 5, en donde R3=acetilo, R1=propionilo o un isómero de este, R2=valerilo o un isómero de este, R4= valerilo o un isómero de este y R5 es

hidrógeno o acetilo; o un éster de sacarosa como se muestra en la Figura 5, en donde R3=acetilo, R1=butirilo, R2=valerilo o un isómero de este, R4=hexanoilo o un isómero de este y R5 es hidrógeno o acetilo (C2C14:0).

En una modalidad, el éster de sacarosa tiene la estructura general mostrada en la Figura 5, en donde R3=acetilo, R1=propionilo o un isómero de este, R2=valerilo o un isómero de este, R4=hexanoilo o un isómero de este y R5 es hidrógeno o acetilo; o un éster de sacarosa como se muestra en la Figura 5, en donde R3=acetilo, R1=valerilo o un isómero de este, R2=valerilo o un isómero de este, R4=valerilo o un isómero de este y R5 es hidrógeno o acetilo; o un éster de sacarosa como se muestra en la Figura 5, en donde R3=acetilo, R1=butirilo, R2=hexanoilo o un isómero de este, R4=hexanoilo o un isómero de este y R5 es hidrógeno o acetilo (C12C15:0).

En una modalidad, el éster de sacarosa tiene la estructura general mostrada en la Figura 5 y en donde R3 es acetilo, R1 es valerilo o un isómero de este, R2 es valerilo o un isómero de este, R4 es hexanoilo o un isómero de este y R5 es o bien un átomo de hidrógeno o un resto acetilo (C2C16:0)

En una modalidad, el éster de sacarosa que se modula tiene la estructura general mostrada en la Figura 5 y en donde R3 es acetilo, R1 es propionilo o un isómero de este, R2 es hexanoilo o un isómero de este, R4 es hexanoilo o un isómero de este y R5 es o bien un átomo de hidrógeno o un resto acetilo (C2C16:0).

En una modalidad, el éster de sacarosa tiene la estructura general mostrada en la Figura 5 y en donde R3 es acetilo, R1 es valerilo o un isómero de este, R2 es hexanoilo o un isómero de este, R4 es hexanoilo o un isómero de este y R5 es o bien un átomo de hidrógeno o un resto acetilo (C2C17:0).

En una modalidad, el éster de sacarosa que se modula tiene la estructura general mostrada en la Figura 5 y en donde R3 es acetilo, R1 es hexanoilo o un isómero de este, R2 es hexanoilo o un isómero de este, R4 es hexanoilo o un isómero de este y R5 es o bien un átomo de hidrógeno o un resto acetilo (C2C18:0).

En otra modalidad, el éster de sacarosa tiene un peso molecular de aproximadamente 594 daltons a 692 daltons. En una modalidad, el éster de sacarosa tiene un peso molecular de aproximadamente 608 daltons a 692 daltons. En una modalidad, el éster de sacarosa tiene un peso molecular de aproximadamente 622 daltons a 692 daltons. En una modalidad, el éster de sacarosa tiene un peso molecular de aproximadamente 636 Daltons a 692 Daltons. En una modalidad, el éster de sacarosa tiene un peso molecular de aproximadamente 650 Daltons a 692 daltons. En una modalidad, el éster de sacarosa tiene un peso molecular de aproximadamente 650 Daltons a 678 Daltons. En otra modalidad, el éster de sacarosa tiene un peso molecular de aproximadamente 594 Daltons a 678 Daltons. En una modalidad, el éster de sacarosa tiene un peso molecular de aproximadamente 608 Daltons a 678 Daltons. En una modalidad, el éster de sacarosa tiene un peso molecular de aproximadamente 622 Daltons a 678 Daltons. En una modalidad, el éster de sacarosa tiene un peso molecular de aproximadamente 636 Daltons a 678 Daltons. En una modalidad, el éster de sacarosa tiene un peso molecular de aproximadamente 650 Daltons a 678 Daltons. En una modalidad, el éster de sacarosa tiene un peso molecular de aproximadamente 664 Daltons a 678 Daltons.

Un aspecto adicional se refiere a un método para modular el sabor del tabaco o un producto de tabaco que comprende la adición de composiciones de los ésteres de sacarosa descritos en la presente descripción a estos.

En otra modalidad, se aumenta la concentración, los niveles o la producción de los ésteres de sacarosa en una planta. En otra modalidad, se reduce la concentración, los niveles o la producción de los ésteres de sacarosa en una planta.

En una modalidad específica, se proporcionan composiciones y métodos específicos para producir plantas mutantes, de origen no natural o transgénicas que se han modificado para aumentar la expresión o la actividad de la isopropilmalato sintasa lo cual puede dar como resultado plantas o material vegetal en los cuales se aumenta la concentración, los niveles o la producción de ésteres de sacarosa. Concretamente, los niveles o la producción de los ésteres de sacarosa descritos en la presente descripción se incrementan o se inducen.

En otra modalidad específica, se proporcionan composiciones y métodos específicos para producir plantas mutantes, de origen no natural o transgénicas que se han modificado para reducir o inhibir la expresión o la actividad de la isopropilmalato sintasa, lo cual puede dar como resultado plantas o material vegetal en lo cuales se reducen la concentración, los niveles o la producción de ésteres de sacarosa. Específicamente, los niveles de los ésteres de sacarosa descritos en la presente descripción se reducen o se suprimen.

Ventajosamente, las plantas mutantes, de origen no natural, o transgénicas que se obtienen de conformidad con los métodos descritos en la presente descripción son similares o sustancialmente las mismas en su apariencia visual que las plantas control. En una modalidad, la altura del tallo de las plantas mutantes, de origen no natural o transgénicas es sustancialmente la misma que la de las plantas control, por ejemplo, a los dos o tres meses después del trasplante al campo o 10, 20, 30 o 36 días después del 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. En otra modalidad, el contenido de clorofila de las plantas mutantes, de origen no natural o transgénicas es sustancialmente el mismo que el de las plantas control. En otra modalidad, la altura del tallo de las plantas mutantes, de origen no

natural o transgénicas es sustancialmente la misma que la de las plantas control y el contenido de clorofila de las plantas mutantes, de origen no natural o transgénicas es sustancialmente el mismo que el de las plantas control. En otras modalidades, el tamaño o la forma, el número o la coloración de las hojas de las plantas mutantes, de origen no natural o transgénicas son sustancialmente iguales que las de las plantas control. Adecuadamente, la planta es una planta de tabaco.

En otro aspecto, se proporciona un método para modular el contenido de éster de sacarosa (tal como el contenido de éster de sacarosa con beta-metilvalerilo) en al menos una parte de una planta, que comprende las etapas de: (i) reducir la expresión o la actividad de la isopropilmalato sintasa en la planta, preferentemente, en donde la isopropilmalato sintasa comprende la secuencia de polinucleótidos descrita en la presente descripción o la secuencia polipeptídica descrita en la presente descripción; (ii) medir opcionalmente el contenido de ésteres de sacarosa en al menos una parte (por ejemplo, las hojas) de la planta mutante, de origen no natural o transgénica obtenida en la etapa (i); e (iii) identificar una planta mutante, de origen no natural o transgénica en la cual el contenido de ésteres de sacarosa en ella se ha modulado en comparación con una planta control. Adecuadamente, la apariencia visual de dicha planta mutante, de origen no natural o transgénica es sustancialmente la misma que la de la planta control. Adecuadamente, la planta es una planta de tabaco.

En otro aspecto, se proporciona un método para aumentar el contenido de ésteres de sacarosa (tal como el contenido de ésteres de sacarosa con beta-metilvalerilo) en al menos una parte de una planta (por ejemplo, las hojas), que comprende las etapas de: (i) aumentar la expresión o la actividad de la isopropilmalato sintasa en la planta, preferentemente, en donde la isopropilmalato sintasa comprende la secuencia de polinucleótidos descrita en la presente descripción o la secuencia polipeptídica descrita en la presente descripción; (ii) medir opcionalmente el contenido de ésteres de sacarosa en al menos una parte (por ejemplo, las hojas) de la planta mutante, de origen no natural o transgénica obtenidas en la etapa (i); e (iii) identificar una planta mutante, de origen no natural o transgénica en la cual el contenido de ésteres de sacarosa en ella se ha aumentado en comparación con una planta control.

En otro aspecto, se proporciona un método para reducir el contenido de ésteres de sacarosa (tal como el contenido de ésteres de sacarosa con beta-metilvalerilo) en al menos una parte de una planta, que comprende las etapas de: (i) reducir la expresión o la actividad de la isopropilmalato sintasa en la planta, preferentemente, en donde la isopropilmalato sintasa comprende la secuencia de polinucleótidos descrita en la presente descripción o la secuencia polipeptídica descrita en la presente descripción; (ii) medir el contenido de ésteres de sacarosa en al menos una parte (por ejemplo, las hojas) de la planta mutante, de origen no natural o transgénica obtenidas en la etapa (i); e (iii) identificar una planta mutante, de origen no natural o transgénica en la cual el contenido de ésteres de sacarosa en ella ha reducido en comparación con una planta control.

Ventajosamente, los métodos descritos en la presente descripción pueden usarse, además, para generar plantas que tienen rasgos de oriental al aumentar la expresión o la actividad de la isopropilmalato sintasa. De este modo, de conformidad con esta modalidad, puede diseñarse una variedad de plantas no orientales (tal como una planta de curado al humo o una planta de variedad burley) de manera que la expresión o la actividad de la isopropilmalato sintasa se incremente en ellas. Esto puede impartir rasgos orientales en plantas lo cual puede ser ventajoso ya que esto puede cambiar (por ejemplo, aumentar o mejorar) el sabor oriental de estas, lo que produce de esta manera nuevas líneas, variedades o híbridos de plantas aromáticas.

Los métodos descritos en la presente descripción pueden usarse, además, para generar plantas en las cuales se reducen, se inhiben, o se suprimen los rasgos orientales, al disminuir la expresión o la actividad de la isopropilmalato sintasa. De este modo, de conformidad con esta modalidad, puede diseñarse una variedad de plantas orientales de manera que la expresión o la actividad de la isopropilmalato sintasa se reduce en ellas. La reducción o la supresión de los rasgos orientales en las plantas pueden ser ventajoso ya que esto puede cambiar o reducir el sabor oriental de estas, lo que produce de esta manera nuevas líneas, variedades o híbridos de plantas aromáticas.

El aumento de la expresión de la isopropilmalato sintasa en comparación con la planta control puede ser de aproximadamente 5 % a aproximadamente 100 % o más, 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 %, 100 %, 150 % o 200 % o más, lo cual incluye un aumento de la actividad transcripcional o expresión de proteínas, o ambas.

El aumento en la actividad de la isopropilmalato sintasa 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 %, 100 %, 150 % o 200 % o más.

La reducción en la expresión de la isopropilmalato sintasa en comparación con la planta control puede ser de aproximadamente 5 % a aproximadamente 100 %, o una reducción de al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %,

al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, o 100 %, lo cual incluye una reducción en la actividad transcripcional o la expresión de proteínas o ambas.

La reducción en la actividad de la isopropilmalato sintasa en comparación con una planta control puede ser de aproximadamente 5 % a aproximadamente 100 %, o una reducción de al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, o 100 % o más.

El aumento en el contenido de ésteres de sacarosa 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 %.

El aumento en el contenido de ésteres de sacarosa en comparación con una planta control puede ser de aproximadamente 5 % a aproximadamente 100 %, o una reducción de al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, o hasta 100 %.

Los polinucleótidos y los constructos recombinantes descritos en la presente descripción pueden usarse para modular la expresión de la isopropilmalato sintasa descrita en la presente descripción en una especie vegetal de interés, adecuadamente, tabaco.

Un aspecto es 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 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, la presente invención proporciona una planta mutante, una planta de origen no natural, una planta híbrida o una planta transgénica como se describe, la cual comprende, además, 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, de la presente invención, cuyo cultivo regenera plantas capaces de expresar todas las características morfológicas y fisiológicas de la planta parental. Las células regenerables incluyen, pero no se limitan a, células de hojas, polen, embriones, cotiledones, hipocótilos, raíces, extremos de raíces, anteras, flores y una parte de estas, óvulos, brotes, tallos, rabillos, médula y cápsulas o callos o protoplastos derivados de ellos.

De conformidad con la descripción, una planta que porta un alelo mutante de isopropilmalato sintasa puede usarse en un programa de mejoramiento de plantas para crear líneas, variedades e híbridos útiles. En particular, el alelo mutante de isopropilmalato sintasa puede introgresarse en las variedades comercialmente importantes descritas anteriormente. Por lo tanto, se proporcionan métodos para el mejoramiento de plantas, que comprenden cruzar, mejorar o introgresar una planta mutante, una planta de origen no natural o una planta transgénica como se describe en la presente descripción con otra planta, tal como una planta con una identidad genética diferente, un fondo genético diferente, una variedad diferente, una línea diferente o un híbrido diferente. Un método comprende cruzar, mejorar o introgresar una planta mutante, una planta de origen no natural o una planta transgénica como se describe en la presente descripción con un cultivar o un cultivar de élite o una planta del género *Nicotiana, tal como Nicotiana tabacum* (por ejemplo, tipo Burley). 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. El método puede comprender, además, la etapa de identificar una planta en la cual se modula la expresión o la actividad de la isopropilmalato sintasa. El método puede comprender, además, la etapa de seleccionar una planta en la cual la expresión o la actividad de la isopropilmalato sintasa se modula en comparación con una planta control. Un propósito ofrecido por dichos métodos de mejoramiento es introducir un rasgo genético conveniente en otras variedades, líneas de mejoramiento, híbridos o cultivares, particularmente los que son de interés comercial. Otro propósito es facilitar el apilamiento de modificaciones genéticas de diferentes genes en una sola variedad de planta, líneas, híbridos o cultivares. Se contemplan apareamientos intraespecíficos así como también interespecíficos. Las plantas de la progenie que surgen de tales cruces, también referidas como líneas de mejoramiento, son ejemplos de plantas de origen no natural de la descripción.

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, la etapa opcional de identificar una planta en la cual se modula la expresión o la actividad de la isopropilmalato sintasa. El método puede comprender, además, la etapa opcional de selección de una planta en la cual la expresión o la actividad de la isopropilmalato sintasa se modula en comparación con una planta control. 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 para el mejoramiento de plantas, particularmente el mejoramiento de plantas de tabaco, se conocen bien y pueden usarse en los métodos descritos. La descripción proporciona, además, plantas de origen no natural producidas, obtenidas o que pueden obtenerse mediante estos métodos.

En algunas modalidades de los métodos descritos en la presente descripción, las líneas que resultan del mejoramiento y tamizaje para determinar variantes de genes de isopropilmalato sintasa se evalúan en el campo mediante el uso de procedimientos de campo estándares. Los genotipos controles, lo que incluye 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 estándares, 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 pareado de los cromosomas.

En una modalidad, las plantas que se obtienen o pueden obtenerse por los métodos de mejora, cruce o introgresión descritos anteriormente no producirán *cis*-abienol, no producirán sustancialmente *cis*-abienol o no producirán niveles detectables de *cis*-abienol. En otra modalidad, las composiciones de éster de sacarosa y las composiciones de éster de sacarosa obtenidas o que pueden obtenerse mediante los métodos descritos en la presente descripción no comprenderán ni contendrán *cis*-abienol, no comprenderán ni contendrán niveles sustanciales de *cis*-abienol o no comprenderán ni contendrán niveles detectables de *cis*-abienol. Por lo tanto, el rasgo de *cis*-abienol puede presentarse o puede ausentarse.

La huella de ADN, el polimorfismo de un solo nucleótido, los marcadores de microsatélites, o tecnologías similares pueden usarse en un programa de mejoramiento por selección asistida por marcadores (MAS) para transferir o cruzar alelos mutantes de los genes de isopropilmalato sintasa en 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 conveniente agronómicamente. Las plantas en las generaciones F2 o de retrocruzamiento pueden tamizarse mediante el uso de un marcador desarrollado a partir de una secuencia genómica de isopropilmalato sintasa o un fragmento de esta, mediante 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.

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 una de las 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 un gen variante de isopropilmalato sintasa (por ejemplo, la versión nula del gen de isopropilmalato sintasa). El proceso de retrocruzamiento, autopolinización, y tamizaje se repite, por ejemplo, al menos 4 veces hasta que el tamizaje final produce una planta que es fértil y similar razonablemente al parental recurrente. Esta planta, si se desea, se autopoliniza y posteriormente la progenie se tamiza de nuevo para confirmar que la planta exhibe la expresión de un gen variante de isopropilmalato sintasa. En algunas modalidades, una población de plantas en la generación F2 se tamiza para detectar la expresión de un gen variante de isopropilmalato sintasa, por ejemplo, se identifica una planta que no expresa isopropilmalato sintasa debido a la ausencia de un gen de isopropilmalato sintasa de conformidad con métodos estándares, por ejemplo, mediante el uso de un método de PCR con cebadores basados en la información de la secuencia nucleotídica para isopropilmalato sintasa descrita en la presente descripción.

Pueden producirse variedades híbridas de tabaco al evitar la autopolinización de plantas parentales femeninas (es decir, parentales de semillas) de una primera variedad, lo que permite que el polen de plantas parentales masculinas de una segunda variedad fecunden a las plantas parentales femeninas, y permite que se formen semillas híbridas F1 en las plantas femeninas. La autopolinización de plantas femeninas puede evitarse mediante la emasculación de las flores en una etapa temprana del desarrollo de las flores. Alternativamente, la formación de polen puede evitarse en las plantas parentales femeninas mediante el uso de una forma de esterilidad masculina. Por ejemplo, la esterilidad masculina puede producirse por esterilidad masculina citoplasmática (CMS), o esterilidad masculina transgénica en

donde un transgén inhibe la microsporogénesis y/o la formación de polen, o autoincompatibilidad. Las plantas parentales femeninas que contienen CMS son útiles particularmente. En modalidades en las cuales las plantas parentales femeninas son CMS, el polen se cosecha a partir de plantas fértiles masculinas y se aplica manualmente a los estigmas de las plantas parentales femeninas CMS, y se cosecha la semilla F1 resultante.

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

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 de un polipéptido o polinucleótido. 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.

En la presente descripción se describe células vegetales o plantas mutantes, de origen no natural o transgénicas que comprenden uno o más polinucleótidos recombinantes, tales como uno o más polinucleótidos de isopropilmalato sintasa aislados, uno o más constructos de polinucleótidos, uno o más ARN bicatenarios, uno o más conjugados o uno o más vectores/vectores de expresión.

La expresión génica puede evaluarse mediante el uso de métodos que incluyen, por ejemplo, RT-PCR, transferencias de Northern, protección de ARNasa, extensiones de cebadores, transferencias Western, electroforesis en gel de proteínas, inmunoprecipitación, inmunoensayos ligados a enzimas, ensayos de chips y espectroscopía de masas. 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. De manera similar, 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 ya sea antes o después de que se module la expresión o la actividad de la isopropilmalato sintasa. Una o más de las siguientes modificaciones genéticas adicionales pueden presentarse 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 en la familia de facilitadores de la difusión de cationes (CDF), la familia de proteínas similares a Zrt e 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 núm. WO2009074325), la familia de homólogos de proteínas de macrófagos asociadas a la resistencia natural (NRAMP), y la familia de transportadores de casetes de unión a ATP (ABC), los cuales participan en el transporte de metales pesados, tal como cadmio. 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 se implican 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-nitrosonornicotina, 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 mediante la transferencia del gen *aroA* (una glifosato EPSP sintetasa de *Salmonella typhimurium* y *E. coli*). Las plantas resistentes a la sulfonilurea se han producido mediante la transformación del 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 mediante la incorporación del 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 genéticamente 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 mediante la transferencia de la enzima de acil glicerol fosfato de Arabidopsis; los genes que codifican manitol deshidrogenasa y sorbitol deshidrogenasa que se implican 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 sustancialmente 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 dar como resultado plantas con almacenamiento mejorado de proteínas y aceites, plantas con eficiencia fotosintética mejorada, plantas con tiempo de vida media prolongada, 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 cuales se ha modulado la expresión de S-adenosil-L-metionina (SAM) y/o cistationina gamma-sintasa (CGS).

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

La última generación de retrocruzamiento puede autofecundarse para proporcionar progenie de mejoramiento 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 prueba apropiado. Aunque los métodos de retrocruzamiento se simplifican cuando el rasgo que se transfiere es un alelo dominante, también puede transferirse un alelo recesivo. En este caso, puede ser necesario introducir una prueba de la progenie para determinar si el rasgo deseado se ha transferido exitosamente.

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 pierden típicamente todo o alguna porción del polinucleótido recombinante introducido con cada división celular, de manera que el polinucleótido recombinante introducido no puede detectarse en las células hijas después de un número suficiente de divisiones celulares.

Se describen restos conjugados que incluyen compuestos macromoleculares tales como proteínas (por ejemplo, anticuerpos), cadenas de ácidos grasos, residuos de azúcar, glicoproteínas, polímeros (por ejemplo, polietilenglicol) o sus combinaciones. Un oligonucleótido puede conjugarse con un resto que aumenta la captación celular del oligonucleótido. Los ejemplos no limitantes de restos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos, polipéptidos, restos lipídicos tales como un resto de colesterol, ácido cólico, un tioéter, por ejemplo, hexil-s-tritiltiol, un tiocolesterol, una cadena alifática, por ejemplo, restos de dodecandiol o undecilo, un fosfolípido, una poliamina o una cadena de polietilenglicol, un ácido acético adamantano, un resto de palmitilo, un resto de octadecilamina o de hexilamino-carbonil-oxicolesterol. El resto puede ser un polímero cargado positivamente, tal como un péptido cargado positivamente que tiene, por ejemplo, aproximadamente 1 a 50 residuos de aminoácidos de longitud o un óxido de polialquileno tal como polietilenglicol (PEG) o polipropilenglicol. Adecuadamente, el polímero cargado positivamente,

tal como un óxido de polialquileno, puede unirse al oligómero a través de un enlazador tal como un enlazador liberable.

Cuando se mide la expresión del polipéptido, la detección de la cantidad de ARNm que codifica un polipéptido en la célula puede cuantificarse mediante, por ejemplo, PCR o transferencia de Northern. Cuando se mide un cambio en la cantidad de un polipéptido en la muestra, la detección mediante el uso de anticuerpos puede usarse para cuantificar la cantidad de polipéptido en la célula mediante el uso de técnicas conocidas. Alternativamente, la actividad biológica de la enzima puede medirse mediante el uso de métodos que se conocen bien en la técnica.

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

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

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

Los anticuerpos pueden usarse, además, en ensayos para detectar presencia de los polipéptidos o fragmentos, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Los anticuerpos pueden emplearse además en la purificación de polipéptidos o fragmentos mediante cromatografía de inmunoafinidad.

Diversas modalidades proporcionan plantas mutantes, plantas de origen no natural o plantas transgénicas, así como también biomasa en las cuales el nivel de expresión del polinucleótido de isopropilmalato sintasa se modula.

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 incluyen, pero no se limitan 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. Los ejemplos de artículos para fumar o artículos fumables incluyen, pero no se limitan a, cigarrillos, puritos y puros. 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 localizarse dentro, cerca o aguas abajo de la fuente de calor. Los productos de tabaco sin humo y los diversos materiales formadores de aerosol que contienen tabaco pueden contener tabaco en cualquier forma, lo 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, tales como hojuelas, capas, lengüetas, espumas, o perlas. Como se usa en la presente descripción, el término “humo” se usa para describir un tipo de aerosol que se produce por los artículos de fumar, tales como cigarrillos, o por combustión de un material formador de aerosol.

En una modalidad, se proporciona además material curado a partir de las plantas 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 que contienen tabaco, que comprenden, hojas, preferentemente hojas curadas, a partir de las plantas de tabaco mutantes, las plantas de tabaco transgénicas o las plantas de tabaco de origen no natural descritas en la presente descripción. Los productos de tabaco descritos en la presente descripción pueden ser un producto de tabaco mezclado que puede comprender, además, tabaco no modificado.

El por ciento de ésteres de sacarosa en los materiales formadores de aerosol o en las composiciones de tabaco puede ser 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 %, 150 %, o 200 % o mayor, cuando se compara con materiales formadores de aerosol o composiciones de tabaco derivadas a partir de las plantas contrapartes no mutantes, de origen no natural o no transgénicas.

El por ciento de ésteres de sacarosa en los materiales formadores de aerosol o en las composiciones de tabaco puede ser 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 % menor, cuando se compara con materiales formadores de aerosol o composiciones de tabaco derivadas a partir de las plantas contrapartes no mutantes, de origen no natural o no transgénicas.

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

La descripción proporciona, además, métodos para producir semillas que comprenden cultivar la planta mutante, planta de origen no natural, o planta transgénica descrita en la presente descripción, y recolectar las semillas de las plantas cultivadas. Las semillas de las plantas 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 embalaje de semilla puede tener una identificación, por ejemplo, una etiqueta o marcador asegurado al material de embalaje, un marcador impreso en el material de empaque, o un marcador insertado dentro del empaque, que describe la naturaleza de las semillas en él.

Un aspecto adicional se refiere a un método para producir una composición que comprende ésteres de sacarosa que comprende las etapas de: (a) proporcionar parte de una planta mutante, de origen no natural o transgénica; biomasa, semilla u hojas; o el producto de tabaco como se describe en la presente descripción; y (b) extraer los ésteres de sacarosa de los mismos; y (c) purificar opcionalmente los ésteres de sacarosa.

Un aspecto adicional se refiere a un método para producir ácido beta-metilvalérico que comprende las etapas de: (a) proporcionar parte de una planta mutante, de origen no natural o transgénica; biomasa, u hojas; o el material formador de aerosol como se describe en la presente descripción; (b) hidrolizar el material obtenido en la etapa (a) o un extracto de esta; y (c) recoger opcionalmente el ácido beta-metilvalérico. El ácido beta-metilvalérico puede usarse en la producción de polihidroxialcanoatos y similares, los cuales pueden dar materiales, lo que incluye plásticos, con propiedades beneficiosas. Los plásticos que pueden producirse pueden ser biodegradables y, por tanto, pueden usarse en la producción de bioplásticos. Una bacteria, tal como *E. coli* o *Pseudomonas* - puede diseñarse para expresar la isopropilmalato sintasa descrita en la presente descripción. Adecuadamente, la bacteria que se usa puede diseñarse, además, para producir polihidroxialcanoatos. Los métodos para la producción de polihidroxialcanoatos mediante el uso de sistemas microbianos se describen en, por ejemplo, en los documentos núms. US5,750,848 y US6,492,134. Por lo tanto, un aspecto se refiere a una bacteria que comprende isopropilmalato sintasa y opcionalmente uno o más genes para producir un polihidroxialcanoato. Un aspecto adicional se relaciona con un método para producir polihidroxialcanoato que comprende el uso de la bacteria.

En una modalidad, se proporciona además material curado a partir de las plantas mutantes, transgénicas y de origen no natural descritas en la presente descripción. Por ejemplo, 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, lo que incluye productos de tabaco que comprenden hojas, por ejemplo hojas curadas, a partir de las plantas mutantes, transgénicas y de origen no natural descritas en la presente descripción o que se producen mediante los métodos descritos en la presente descripción. Los productos de tabaco descritos en la presente descripción pueden comprender, además, tabaco no modificado.

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

Un aspecto adicional se refiere a una composición del éster de sacarosa (aislada) que comprende, consiste o consiste esencialmente en uno o más de los ésteres de sacarosa descritos en la presente descripción. El éster de sacarosa puede ser un éster de sacarosa en el cual el número total de carbonos en las cadenas de acilo en R1, R2 y R4 es 14; un éster de sacarosa en el cual el número total de carbonos en las cadenas de acilo en R1, R2 y R4 es 15; un éster de sacarosa en el cual el número total de carbonos en las cadenas de acilo en R1, R2 y R4 es 16; un éster de sacarosa en el cual el número total de carbonos en las cadenas de acilo en R1, R2 y R4 es 17; y un éster de sacarosa en el cual el número total de carbonos en las cadenas de acilo en R1, R2 y R4 es 18. Siempre y cuando este número total de carbonos se presente, entonces las cadenas de acilo constituyentes pueden seleccionarse de cualquiera de las expuestas en la Figura 6. Adecuadamente, el éster de sacarosa tiene un acetilo en R3 y un acetilo o hidrógeno en R5. Adecuadamente, el éster de sacarosa tiene un acetilo en R3 y un hidrógeno en R5. Adecuadamente, una o más, dos o más o tres de más de las cadenas de acilo serán beta-metilvalerilo. De esta forma, a manera de ejemplo, el éster de sacarosa puede ser un éster de sacarosa como se muestra en la Figura 5, en donde R3=acetilo, R1=propionilo o un isómero de este, R2= propionilo o un isómero de este, R4=hexanoilo o un isómero de este y R5 es hidrógeno o acetilo; o un éster de sacarosa como se muestra en la Figura 5, en donde R3=acetilo, R1= propionilo o un isómero de este, R2=valerilo o un isómero de este, R4= valerilo o un isómero de este y R5 es hidrógeno o acetilo; o un éster de sacarosa como se muestra en la Figura 5, en donde R3=acetilo, R1=butirilo, R2=valerilo o un isómero de este, R4=hexanoilo o un isómero de este y R5 es hidrógeno o acetilo (C2C14:0); un éster de sacarosa como se muestra en la Figura 5, en donde R3=acetilo, R1=propionilo o un isómero de este, R2=valerilo o un isómero de este, R4=hexanoilo o un isómero de este y R5 es hidrógeno o acetilo; o un éster de sacarosa como se muestra en la Figura 5, en donde R3=acetilo, R1=valerilo o un isómero de este, R2=valerilo o un isómero de este, R4=valerilo o un isómero de este y R5 es hidrógeno o acetilo; o un éster de sacarosa como se muestra en la Figura 5, en donde R3=acetilo, R1=butirilo, R2=hexanoilo o un isómero de este, R4=hexanoilo o un isómero de este y R5 es hidrógeno o acetilo (C2C15:0); un éster de sacarosa que tiene la estructura general mostrada en la Figura 5, y en donde R3 es acetilo, R1 es valerilo o un isómero de este, R2 es valerilo o un isómero de este, R4 es hexanoilo o un isómero de este y R5 es o bien un átomo de hidrógeno o un resto acetilo (C2C16:0); o en donde el éster de sacarosa que tiene la estructura general mostrada en la Figura 5, y en donde R3 es acetilo, R1 es propionilo o un isómero de este, R2 es hexanoilo o un isómero de este, R4 es hexanoilo o un isómero de este y R5 es o bien un átomo de hidrógeno o un resto acetilo (C2C16:0); un éster de sacarosa como se muestra en la Figura 5, en donde R3 es acetilo, R1 es valerilo o un isómero de este, R2 es hexanoilo o un isómero de este, R4 es hexanoilo o un isómero de este y R5 es o bien un átomo de hidrógeno o un resto acetilo (C2C17:0); y un éster de sacarosa como se muestra en la Figura 5, en donde R3 es acetilo, R1 es hexanoilo o un isómero de este, R2 es hexanoilo o un isómero de este, R4 es hexanoilo o un isómero de este y R5 es o bien un átomo de hidrógeno o un resto acetilo (C2C18:0).

Alternativamente, el éster de sacarosa puede ser un éster de sacarosa en el cual el número total de carbonos en las cadenas de acilo de R1, R2 y R4 es 14; un éster de sacarosa en el cual el número total de carbonos en las cadenas de acilo de R1, R2 y R4 es 15; un éster de sacarosa en el cual el número total de carbonos en las cadenas de acilo de R1, R2 y R4 es 16; un éster de sacarosa en el cual el número total de carbonos en las cadenas de acilo de R1, R2 y R4 es 17;y un éster de sacarosa en el cual el número total de carbonos en las cadenas de acilo de R1, R2 y R4 es de 18 no se presenta, no se presenta sustancialmente o no se presenta en niveles detectables (C2C18:0). Siempre y cuando este número total de carbonos se presente, entonces las cadenas de acilo constituyentes pueden seleccionarse de cualquiera de las expuestas en la Figura 6. Adecuadamente, el éster de sacarosa tiene un acetilo en R3 y un acetilo o hidrógeno en R5. Adecuadamente, el éster de sacarosa tiene un acetilo en R3 y un hidrógeno en R5. Adecuadamente, una o más, dos o más o tres de más de las cadenas de acilo serán beta-metilvalerilo. De esta forma, a manera de ejemplo, el éster de sacarosa puede ser un éster de sacarosa como se muestra en la Figura 5, en donde R3=acetilo, R1=propionilo o un isómero de este, R2= propionilo o un isómero de este, R4=hexanoilo o un isómero de este y R5 es hidrógeno o acetilo; o un éster de sacarosa como se muestra en la Figura 5, en donde R3=acetilo, R1= propionilo o un isómero de este, R2=valerilo o un isómero de este, R4=valerilo o un isómero de este y R5 es hidrógeno o acetilo; o un éster de sacarosa como se muestra en la Figura 5, en donde R3=acetilo, R1=butirilo, R2=valerilo o un isómero de este, R4=hexanoilo o un isómero de este y R5 es hidrógeno o

acetilo (C2C14:0); un éster de sacarosa como se muestra en la Figura 5, en donde R3=acetilo, R1=propionilo o un isómero de este, R2=valerilo o un isómero de este, R4=hexanoilo o un isómero de este y R5 es hidrógeno o acetilo; o un éster de sacarosa como se muestra en la Figura 5, en donde R3=acetilo, R1=valerilo o un isómero de este, R2=valerilo o un isómero de este, R4=valerilo o un isómero de este y R5 es hidrógeno o acetilo; o un éster de sacarosa como se muestra en la Figura 5, en donde R3=acetilo, R1=butirilo, R2=hexanoilo o un isómero de este, R4=hexanoilo o un isómero de este y R5 es hidrógeno o acetilo (C2C15:0); un éster de sacarosa que tiene la estructura general mostrada en la Figura 5, y en donde R3 es acetilo, R1 es valerilo o un isómero de este, R2 es valerilo o un isómero de este, R4 es hexanoilo o un isómero de este y R5 es o bien un átomo de hidrógeno o un resto acetilo (C2C16:0); o en donde el éster de sacarosa que tiene la estructura general mostrada en la Figura 5, y en donde R3 es acetilo, R1 es propionilo o un isómero de este, R2 es hexanoilo o un isómero de este, R4 es hexanoilo o un isómero de este y R5 es o bien un átomo de hidrógeno o un resto acetilo (C2C16:0); un éster de sacarosa como se muestra en la Figura 5, en donde R3 es acetilo, R1 es valerilo o un isómero de este, R2 es hexanoilo o un isómero de este, R4 es hexanoilo o un isómero de este y R5 es o bien un átomo de hidrógeno o un resto acetilo (C2C17:0); y en donde un éster de sacarosa como se muestra en la Figura 5, en donde R3 es acetilo, R1 es hexanoilo o un isómero de este, R2 es hexanoilo o un isómero de este, R4 es hexanoilo o un isómero de este y R5 es o bien un átomo de hidrógeno o un resto acetilo no se presenta, no se presenta sustancialmente o no se presenta a niveles detectables (C2C18:0).

Alternativamente, el éster de sacarosa puede ser un éster de sacarosa en el cual el número total de carbonos en las cadenas de acilo de R1, R2 y R4 es 14; un éster de sacarosa en el cual el número total de carbonos en las cadenas de acilo de R1, R2 y R4 es de 15; un éster de sacarosa en el cual el número total de carbonos en las cadenas de acilo de R1, R2 y R4 es 16; un éster de sacarosa en el cual el número total de carbonos en las cadenas de acilo de R1, R2 y R4 es 17 no se presenta, no se presenta sustancialmente o no se presenta a niveles detectables; y un éster de sacarosa en el cual el número total de carbonos en las cadenas de acilo de R1, R2 y R4 es 18 no se presenta, no se presenta sustancialmente o no se presenta en niveles detectables. Siempre y cuando este número total de carbonos se presente, entonces las cadenas de acilo constituyentes pueden seleccionarse de cualquiera de las expuestas en la Figura 6. Adecuadamente, el éster de sacarosa tiene un acetilo en R3 y un acetilo o hidrógeno en R5. Adecuadamente, el éster de sacarosa tiene un acetilo en R3 y un hidrógeno en R5. Adecuadamente, una o más, dos o más o tres de más de las cadenas de acilo serán beta-metilvalerilo. Por lo tanto, a manera de ejemplo, el éster de sacarosa puede ser un éster de sacarosa como se muestra en la Figura 5, en donde R3=acetilo, R1= propionilo o un isómero de este, R2= propionilo o un isómero de este, R4=hexanoilo o un isómero de este y R5 es hidrógeno o acetilo; o un éster de sacarosa como se muestra en la Figura 5, en donde R3=acetilo, R1= propionilo o un isómero de este, R2=valerilo o un isómero de este, R4=valerilo o un isómero de este y R5 es hidrógeno o acetilo; o un éster de sacarosa como se muestra en la Figura 5, en donde R3=acetilo, R1=butirilo, R2=valerilo o un isómero de este, R4=hexanoilo o un isómero de este y R5 es hidrógeno o acetilo (C2C14:0); un éster de sacarosa como se muestra en la Figura 5, en donde R3=acetilo, R1=propionilo o un isómero de este, R2=valerilo o un isómero de este, R4=hexanoilo o un isómero de este y R5 es hidrógeno o acetilo; o un éster de sacarosa como se muestra en la Figura 5, en donde R3=acetilo, R1=valerilo o un isómero de este, R2=valerilo o un isómero de este, R4=valerilo o un isómero de este y R5 es hidrógeno o acetilo; o un éster de sacarosa como se muestra en la Figura 5, en donde R3=acetilo, R1=butirilo, R2=hexanoilo o un isómero de este, R4=hexanoilo o un isómero de este y R5 es hidrógeno o acetilo (C2C15:0); un éster de sacarosa que tiene la estructura general mostrada en la Figura 5, y en donde R3 es acetilo, R1 es valerilo o un isómero de este, R2 es valerilo o un isómero de este, R4 es hexanoilo o un isómero de este y R5 es o bien un átomo de hidrógeno o un resto acetilo (C2C16:0); o en donde el éster de sacarosa tiene la estructura general mostrada en la Figura 5, y en donde R3 es acetilo, R1 es propionilo o un isómero de este, R2 es hexanoilo o un isómero de este, R4 es hexanoilo o un isómero de este y R5 es o bien un átomo de hidrógeno o un resto acetilo (C2C16:0); un éster de sacarosa como se muestra en la Figura 5, en donde R3 es acetilo, R1 es valerilo o un isómero de este, R2 es hexanoilo o un isómero de este, R4 es hexanoilo o un isómero de este y R5 es o bien un átomo de hidrógeno o un resto acetilo no se presenta, no se presenta sustancialmente o no se presenta a niveles detectables (C2C17:0); y en donde un éster de sacarosa como se muestra en la Figura 5, en donde R3 es acetilo, R1 es hexanoilo o un isómero de este, R2 es hexanoilo o un isómero de este, R4 es hexanoilo o un isómero de este y R5 es o bien un átomo de hidrógeno o un resto acetilo no se presenta, no se presenta sustancialmente o no se presenta a niveles detectables (C2C18:0).

Alternativamente, el éster de sacarosa puede ser un éster de sacarosa en el cual el número total de carbonos en las cadenas de acilo de R1, R2 y R4 es 14; un éster de sacarosa en el cual el número total de carbonos en las cadenas de acilo de R1, R2 y R4 es 15; un éster de sacarosa en el cual el número total de carbonos en las cadenas de acilo de R1, R2 y R4 es 16 no se presenta, no se presenta sustancialmente o no se presenta a niveles detectables; un éster de sacarosa en el cual el número total de carbonos en las cadenas de acilo de R1, R2 y R4 es 17 no se presenta, no se presenta sustancialmente o no se presenta a niveles detectables; y un éster de sacarosa en el cual el número total de carbonos en las cadenas R1, R2 y R4 es de 18 no se presenta, no se presenta sustancialmente o no se presenta en niveles detectables. Siempre y cuando este número total de carbonos se presente, entonces las cadenas de acilo constituyentes pueden seleccionarse de cualquiera de las expuestas en la Figura 6. Adecuadamente, el éster de sacarosa tiene un acetilo en R3 y un acetilo o hidrógeno en R5. Adecuadamente, el éster de sacarosa tiene un acetilo en R3 y un hidrógeno en R5. Adecuadamente, una o más, dos o más o tres de más de las cadenas de acilo serán beta-metilvalerilo. Por lo tanto, a manera de ejemplo, el éster de sacarosa puede ser un éster de sacarosa como se muestra en la Figura 5, en donde R3=acetilo, R1=propionilo o un isómero de este,

R2= propionilo o un isómero de este, R4=hexanoilo o un isómero de este y R5 es hidrógeno o acetilo; o un éster de sacarosa como se muestra en la Figura 5, en donde R3=acetilo, R1= propionilo o un isómero de este, R2=valerilo o un isómero de este, R4=valerilo o un isómero de este y R5 es hidrógeno o acetilo; o un éster de sacarosa como se muestra en la Figura 5, en donde R3=acetilo, R1=butirilo, R2=valerilo o un isómero de este, R4=hexanoilo o un isómero de este y R5 es hidrógeno o acetilo (C2C14:0); un éster de sacarosa como se muestra en la Figura 5, en donde R3=acetilo, R1=propionilo o un isómero de este, R2=valerilo o un isómero de este, R4=hexanoilo o un isómero de este y R5 es hidrógeno o acetilo; o un éster de sacarosa como se muestra en la Figura 5, en donde R3=acetilo, R1=valerilo o un isómero de este, R2=valerilo o un isómero de este, R4=valerilo o un isómero de este y R5 es hidrógeno o acetilo; o un éster de sacarosa como se muestra en la Figura 5, en donde R3=acetilo, R1=butirilo, R2=hexanoilo o un isómero de este, R4=hexanoilo o un isómero de este y R5 es hidrógeno o acetilo (C2C15:0); un éster de sacarosa que tiene la estructura general mostrada en la Figura 5, y en donde R3 es acetilo, R1 es valerilo o un isómero de este, R2 es valerilo o un isómero de este, R4 es hexanoilo o un isómero de este y R5 es o bien un átomo de hidrógeno o un resto acetilo no se presenta, no se presenta sustancialmente, o no se presenta a niveles detectables (C2C16:0); o en donde el éster de sacarosa tiene la estructura general mostrada en la Figura 5, y en donde R3 es acetilo, R1 es propionilo o un isómero de este, R2 es hexanoilo o un isómero de este, R4 es hexanoilo o un isómero de este y R5 es o bien un átomo de hidrógeno o un resto acetilo no se presenta, no se presenta sustancialmente, o no se presenta a niveles detectables (C2C16:0); un éster de sacarosa como se muestra en la Figura 5, en donde R3 es acetilo, R1 es valerilo o un isómero de este, R2 es hexanoilo o un isómero de este, R4 es hexanoilo o un isómero de este y R5 es o bien un átomo de hidrógeno o un resto acetilo no se presenta, no se presenta sustancialmente o no se presenta a niveles detectables (C2C17:0); y en donde un éster de sacarosa como se muestra en la Figura 5, en donde R3 es acetilo, R1 es hexanoilo o un isómero de este, R2 es hexanoilo o un isómero de este, R4 es hexanoilo o un isómero de este y R5 es o bien un átomo de hidrógeno o un resto acetilo no se presenta, no se presenta sustancialmente o no se presenta a niveles detectables (C2C18:0).

Un aspecto adicional se refiere a una planta mutante, de origen no natural o transgénica (adecuadamente, una planta de tabaco), en donde la expresión de isopropilmalato sintasa como se describe en la presente descripción o la actividad de la proteína codificada de esta manera se aumenta en comparación con una planta control en la cual la expresión de la isopropilmalato sintasa o la actividad de la proteína codificada de esta manera no se ha aumentado y en donde dicha planta produce ésteres de sacarosa que contienen beta-metilvalerilo en niveles superiores a dicha planta control. Un aspecto adicional se refiere a una planta mutante, de origen no natural o transgénica (adecuadamente, una planta de tabaco), en donde la expresión de isopropilmalato sintasa como se describe en la presente descripción o la actividad de la proteína codificada de esta manera se reduce en comparación con una planta control en la cual no se ha reducido la expresión de la isopropilmalato sintasa o la actividad de la proteína codificada de esta manera y en donde la producción de ésteres de sacarosa que contienen beta-metilvalerilo es menor que dicha planta control.

Un aspecto adicional se refiere a una planta de tabaco curado en atmósfera artificial mutante, de origen no natural o transgénica, en donde la expresión de la isopropilmalato sintasa como se describe en la presente descripción o la actividad de la proteína codificada de esta manera se aumenta en comparación con una planta control en la cual no se ha aumentado la expresión de la isopropilmalato sintasa o la actividad de la proteína codificada de esta manera y en donde la producción de ésteres de sacarosa que contienen beta-metilvalerilo es superior a dicha planta control.

Un aspecto adicional se refiere a una planta de tabaco oriental mutante, de origen no natural o transgénico, en donde la expresión de la isopropilmalato sintasa como se describe en la presente descripción o la actividad de la proteína codificada de esta manera se reduce en comparación con una planta control en la cual la expresión de la isopropilmalato sintasa o la actividad de la proteína codificada de esta manera no se ha reducido y en donde la producción de ésteres de sacarosa que contienen beta-metilvalerilo es menor que la de dicha planta control.

Las plantas de tabaco mutantes, de origen no natural o transgénicas descritas en la presente descripción pueden cosecharse y el tabaco derivado de ellas puede tratarse o curarse mediante el uso de prácticas conocidas para el tipo de tabaco elegido. Los compuestos de superficie de hojas pueden recogerse, por ejemplo, mediante el uso de agua o lavados con disolventes orgánicos y secarse posteriormente. El polvo resultante puede usarse después para mejorar las propiedades de sabor del material para fumar. El material de tabaco restante después de los lavados podría usarse después como material para tabaco expandido, por ejemplo.

En un aspecto adicional, se proporciona un método para modular la resistencia a las plagas en al menos una parte de una planta, que comprende las etapas de: (i) modular la expresión o actividad de la isopropilmalato sintasa en la planta, preferentemente, en donde la isopropilmalato sintasa comprende la secuencia de polinucleótidos o la secuencia de polipéptidos descrita en la presente descripción; (ii) medir opcionalmente la cantidad de ésteres de sacarosa con beta-metilvalerilo en al menos una parte de la planta mutante, de origen no natural, o transgénica obtenida en la etapa (i); (iii) identificar una planta mutante, de origen no natural, o transgénica en la cual la cantidad de ésteres de sacarosa que contienen beta-metilvalerilo en ellas ha cambiado en comparación con una planta control en la cual no se ha modulado la expresión o la actividad de la isopropilmalato sintasa y, preferentemente, en donde la apariencia visual de dicha planta mutante, de origen no natural, o transgénica es sustancialmente la misma que la de la planta control; y (iv) obtener una planta en la cual la resistencia a las plagas de esta se ha modulado.

Adecuadamente, se proporciona un método para aumentar la resistencia a las plagas en al menos una parte de una planta, que comprende las etapas de: (i) aumentar la expresión o actividad de la isopropilmalato sintasa en la planta, preferentemente, en donde la isopropilmalato sintasa comprende la secuencia de polinucleótidos o la secuencia de polipéptidos descrita en la presente descripción; (ii) medir opcionalmente la cantidad de ésteres de sacarosa que contienen beta-metilvalerilo en al menos una parte de la planta mutante, de origen no natural o transgénica obtenida en la etapa (i); identificar una planta mutante, de origen no natural o transgénica en la cual la cantidad de ésteres de sacarosa que contienen beta-metilvalerilo en ellas se ha incrementado en comparación con una planta control en la cual la expresión o actividad de la isopropilmalato sintasa no se ha aumentado y preferentemente, en donde la apariencia visual de dicha planta mutante, de origen no natural o transgénica es sustancialmente la misma que la de la planta control; y (iv) obtener una planta en la cual se ha aumentado la resistencia a las plagas de esta.

Además, se proporciona un material vegetal obtenido o que puede obtenerse con dicho método.

Un aspecto adicional se refiere a una planta mutante, de origen no natural o transgénica, en donde la expresión de la isopropilmalato sintasa o la actividad de la proteína codificada de esta manera se modula y al menos una parte de la planta tiene un cambio en la composición de ésteres de sacarosa que contienen beta-metilvalerilo en comparación con una planta control en la cual la expresión o la actividad de isopropilmalato sintasa no se ha modulado y en donde la apariencia visual de dicha planta es sustancialmente la misma que la de la planta control y en donde la resistencia a las plagas de esta también se modula.

Adecuadamente, se proporciona una planta mutante, de origen no natural o transgénica, en donde la expresión de la isopropilmalato sintasa o la actividad de la proteína codificada de esta manera se aumenta y al menos una parte de la planta tiene un cambio en la composición de éster(s) de sacarosa(s) que contienen beta-metilvalerilo en comparación con una planta control en la cual la expresión o la actividad de isopropilmalato sintasa no se ha aumentado y en donde la apariencia visual de dicha planta es sustancialmente la misma que la de la planta control y en donde la resistencia a las plagas de esta también se ha aumentado.

Las composiciones, métodos y kits para genotipar plantas para la identificación, selección o mejoramiento se abarcan y pueden comprender un medio para detectar la presencia de un polinucleótido de isopropilmalato sintasa en una muestra. En consecuencia, se describe una composición que comprende uno de más cebadores para amplificar específicamente al menos una porción del polinucleótido de isopropilmalato sintasa y opcionalmente una o más sondas y opcionalmente uno o más reactivos para llevar a cabo la amplificación o detección. Se describen cebadores o sondas de oligonucleótidos específicos de genes que comprenden aproximadamente 10 o más polinucleótidos contiguos que corresponden al polinucleótido de isopropilmalato sintasa. Dichos cebadores o sondas pueden comprender o consistir en aproximadamente 15, 20, 25, 30, 40, 45, 50 o más polinucleótidos contiguos que hibridan (por ejemplo, hibridan específicamente en, por ejemplo, condiciones de hibridación rigurosas) con el polinucleótido de isopropilmalato sintasa. 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 isopropilmalato sintasa. A manera de ejemplo específico, pueden usarse dos cebadores en un protocolo de reacción en cadena de la polimerasa para amplificar un fragmento de ácido nucleico que codifica un ácido nucleico de isopropilmalato sintasa – tal como ADN o ARN. La reacción en cadena de la polimerasa puede realizarse, además, mediante el uso de un cebador que se deriva de una secuencia de ácido nucleico de isopropilmalato sintasa y un segundo cebador que hibrida con una secuencia aguas arriba o aguas abajo de la secuencia de ácido nucleico de la isopropilmalato sintasa – tal como una secuencia promotora de isopropilmalato sintasa, el extremo 3' del ARNm precursor o una secuencia derivada de un vector y similares. 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.

Por lo tanto, en otro aspecto, se proporciona, además, un método para detectar un polinucleótido de isopropilmalato sintasa en una muestra que comprende las etapas de: (a) proporcionar una muestra que comprende, o se sospecha que comprende, un polinucleótido; (b) poner en contacto dicha muestra con uno de más cebadores o una o más sondas para detectar específicamente al menos una porción del polinucleótido de isopropilmalato sintasa; y (c) detectar la presencia de un producto de amplificación, en donde la presencia de un producto de amplificación indica la presencia del polinucleótido de isopropilmalato sintasa 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 isopropilmalato sintasa. Se proporcionan, además, kits para detectar al menos una porción del polinucleótido de isopropilmalato sintasa, los cuales comprenden uno o más cebadores o sondas para detectar específicamente al menos una porción del polinucleótido de isopropilmalato sintasa. 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 ácidos nucleicos. El kit puede comprender reactivos y/o instrucciones para determinar el contenido de ésteres de sacarosa. 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.

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

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

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Análisis de ésteres de sacarosa en variedades de *Nicotinia tabacum* de Hicks Broadleaf (HBL) y Red Russian (RR) primitiva curadas al humo

Para estudiar la síntesis del éster de sacarosa en el tabaco, se eligen dos variedades modelo: la Hicks Broadleaf (HBL) y la Red Russian (RR) primitiva curadas al humo. Los datos iniciales disponibles del catálogo del National Genetic Resources Program (Germplasm Resources Information Network - (GRIN), National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland) sugieren un contenido diferente en ésteres de sacarosa que contienen beta-metilvalerilo entre estas dos líneas.

Se analiza la composición de los exudados de las hojas de HBL y RR en ésteres de sacarosa y los resultados se presentan en la Figura 1. La composición en ésteres de sacarosa del RR difiere de la composición en ésteres de sacarosa de la HBL. En la HBL, los ésteres de sacarosa se componen principalmente por C2C15:0, mientras que en la RR se observa la presencia de especies de peso molecular superior (tales como C2C16:0, C2C17:0 y C2C18:0). Como se muestra en la Figura 2, las diferencias entre RR y HBL se explican por la presencia o ausencia de ésteres de metilvalerilo en las moléculas. Por lo tanto, se concluye que RR es una variedad BMVSE y HBL una variedad *bmvse*.

Ejemplo 2: Análisis del locus de un rasgo cuantitativo

La composición de los ésteres de sacarosa en los exudados de hojas se analiza en 136 poblaciones de 8 plantas F3 que descienden respectivamente de 136 plantas genotipadas F2 autogeneradas que resultaron del cruzamiento de los parentales de HBL y RR. Se realiza un estudio del locus de un rasgo cuantitativo para correlacionar los marcadores de microsatélites y el fenotipo de ésteres de sacarosa que contienen beta-metilvalerilo. Los datos se analizan mediante el uso del cartógrafo de locus de un rasgo cuantitativo. El rasgo de ésteres de sacarosa que contienen beta-metilvalerilo se vincula a un único locus en el genoma del tabaco. Este locus se encuentra en el grupo de enlace 15 (cromosoma A) del tabaco.

Ejemplo 3: Identificación del gen relacionado con el éster de sacarosa que contiene beta-metilvalerilo

El nivel de transcripción de los exones de tabaco en los tricomas se estudia para seleccionar el objetivo génico preferencial entre todos los genes potenciales que codifican para las funciones descritas en la Figura 3. La expresión se estudió en varias variedades seleccionadas para su perfil de producción de ésteres de sacarosa que contienen beta-metilvalerilo mediante el uso de microarreglos.

Los resultados identifican sondas de exón relacionadas con la isopropilmalato sintasa, ya que su expresión se correlaciona con las cantidades estimadas de ésteres de sacarosa que contienen beta-metilvalerilo medidos en cada uno de los extractos de cada variedad ($R>0,95$).

Se identifican cuatro secuencias de tabaco que codifican los homólogos de las isopropilmalato sintasas de tomates IPMSA e IPMSB. Estas se nombran *NtIPMS1A* (SEQ ID NO: 10), *NtIPMS1Bv1* (SEQ ID NO: 12), *NtIPMS1Bv2* (SEQ ID NO:14) y *NtIPMS2* (SEQ ID NO:1). De conformidad con las bases de datos EST, la SEQ ID NO:1 fue el candidato elegido, ya que la mayoría de su expresión puede observarse en los tricomas.

Se tamiza una biblioteca BAC construida a partir de *N. tabacum* var. HBL mediante el uso del ADNc de *NtIPMS2* como cebo de PCR, donde se identificó un BAC denominado PISOGE. Este BAC se secuencia mediante la técnica del disparo. El ensamble produce varios cóntigos de los cuales pisoge1 y pisoge2 contienen secuencias relacionadas con *NtIPMS2*.

La estructura intrón-exón se conserva entre las isopropilmalato sintasas de tabaco y tomate. Para NtIPMS1Bv1,NtIPMS1Bv2, SlIPMSB and SlIPMSA se observa que los genes están separados en doce exones. Se espera también que NtIPMS2 se componga de doce exones pero, dado que el primer exón de SlIPMSA corresponde a dos exones en pisoge1, se postula que NtIPMS2 contiene trece exones.

La fiabilidad de la predicción de la secuencia genómica se analiza mediante PCR. Globalmente, la secuencia pronosticada a partir del ensamble de pisoge se verifica mediante el uso del ADN genómico o el BAC de PISOGE purificado aislado de las plantas Hicks Broadleaf o Red Russian. Se identifica una estructura genómica de longitud completa que corresponde a NtIPMS2. Además, se observan otras dos estructuras similares al gen y es probable que representen duplicados de pseudogenes. La estructura propuesta por el BAC de PISOGE se verifica parcialmente, pero se observan algunas discrepancias entre la estructura del BAC y el ADN genómico de HBL.

La PCR se usa como marcador genético para distinguir entre los alelos de RR y HBL de *NtIPMS2*. El marcador IPMS2 se usa en la amplificación por PCR del ADN genómico de todas las plantas F2 usadas en el mapeo del locus del rasgo cuantitativo. El locus del rasgo cuantitativo del éster de sacarosa vuelve a calcularse con este marcador adicional. El pico del locus del rasgo cuantitativo identifica la ubicación donde la probabilidad de asociación entre el rasgo y el marcador es máxima. El marcador IPMS2, junto con el marcador de repetición de secuencia simple PT30172 son los marcadores en los que la probabilidad de efecto en el rasgo de éster de sacarosa que contiene beta-metilvalerilo es la más alta.

Ejemplo 4: Demostración de la actividad de NtIPMS2 como factor clave en la síntesis de ésteres de sacarosa que contiene beta-metilvalerilo

Las etiquetas de secuencia exprés que corresponden a *NtIPMS2* se aíslan de las bibliotecas EST de tricoma en forma de: GT09L09 (origen: tricomas Galpao [TI1068]) y OT05C20 (origen: tricomas de Orinocco [TI81]). Ambas moléculas son idénticas en la secuencia de nucleótidos y, por tanto, solo se usa el ADNc de OT05C20 para experimentos de expresión. Se genera un constructo de ARNi mediante el uso del primer exón y el primer intrón de *NtIPMS2* basado en la secuencia consensuada. Ambos constructos se transfieren a un vector binario que comprende ya sea el promotor CPS2p (CPS2 se refiere a la copalil sintasa 2 que participa en la síntesis de cis-abienol que se produce solo en los tricomas) específicos de los tricomas o el promotor viral MMVp (MMV se refiere al virus del mosaico de mirabilis). Se realizan transformaciones estables mediante el uso del *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 que porta los vectores binarios respectivos en la variedad de tabaco oriental Basma xanthi y la variedad curada al humo K326.

Las hojas se recogen de plantas regeneradas de un mes de edad, resultantes de eventos de transformación independientes. Se añade un estándar interno (octaacetato de sacarosa) a una tasa de 2,5 ng/mg de peso fresco. El área de la señal registrada para el ion específico de cada éster de sacarosa se mide y se traza como la relación del área del estándar interno. La respuesta de la señal varía de molécula a molécula, por lo que la comparación solo es válida entre cada molécula. La relación con respecto al área de la señal del estándar interno permite la normalización de las señales sobre el peso fresco de la hoja. La Figura 2 describe la nomenclatura del éster de sacarosa presentada aquí. Referencia a la Figura 4: (A) composición de exudados de hojas de la variedad parental K326 (curado al humo, n=3) y los transformantes que expresan NtIPMS2 bajo un promotor específico de tricoma; (B) composición de los exudados de hojas de la variedad parental K326 y los transformantes que expresan NtIPMS2 bajo un promotor viral; (C) composición de los exudados de hojas de la variedad parental Basma (Oriental, n=4) y los transformantes que expresan el constructo NtIPMS2-ARNi bajo un promotor específico de tricoma; (D): composición de exudados de hojas de la variedad parental Basma y los transformantes que expresan constructos NtIPMS2-ARNi bajo un promotor viral.

Los datos presentados son suficientes para demostrar que NtIPMS2 es el gen clave en la producción de ésteres de sacarosa que contienen ácido beta-metilvalérico. La supresión de IPMS2 en una variedad (oriental) con ésteres de sacarosa que contienen ácido beta-metilvalérico reduce o suprime la producción de ésteres de sacarosa que contienen ácido beta-metilvalérico (ver C y D), lo que demuestra de esta forma que IPMS2 es un componente clave de la vía biosintética. La expresión específica constitutiva y de tricoma de un constructo de ARN de interferencia da como resultado la pérdida de la acumulación de los ésteres de sacarosa C2C16:0, C2C17:0 y C2C18:0 que son los ésteres que pueden contener ácido beta-metilvalérico.

La introducción de NtIPMS2 en una variedad *bmvse* (curada al humo) puede inducir la producción de ésteres de sacarosa (ver A y B). Esto demuestra que la expresión de ADNc de NtIPMS2 por sí sola es suficiente para restaurar la producción de los ésteres de sacarosa. Aquí, la expresión constitutiva y específica del tricoma de ADNc de NtIPMS2 da como resultado la acumulación *de novo* de los ésteres de sacarosa C2C16:0, C2C17:0 y C2C18:0 que son los ésteres que pueden contener ácido beta-metilvalérico. Curiosamente, la expresión constitutiva del ADNc (B) no dio como resultado una alta acumulación de los ésteres de sacarosa, mientras que la expresión específica del tricoma dio como resultado la acumulación de los ésteres de sacarosa a niveles que son comparables a los que pueden observarse en, por ejemplo, en la variedad de ésteres de sacarosa que contienen ácido beta-metilvalérico.

Ejemplo 5: Protocolo de búsqueda para la selección de sitios objetivo de nucleasa con dedos de zinc

Este ejemplo ilustra cómo buscar el gen de isopropilmalato sintasa para detectar la aparición de sitios objetivo únicos dentro de la secuencia de gen dada en comparación con una base de datos genómica dada para desarrollar herramientas para modificar la expresión del gen. Los sitios objetivo identificados mediante los métodos de la descripción, los motivos de secuencia, y el uso de cualquiera de los sitios o motivos para modificar la secuencia génica correspondiente en una planta, tal como tabaco, se abarcan en la descripción.

Algoritmo de búsqueda. Se desarrolla un programa informático que permite tamizar una secuencia de nucleótidos de consulta de entrada (objetivo) para la aparición de dos motivos de ADN de subcadena de longitud fija separados por un tamaño de espaciador dado mediante el uso de un arreglo de sufijos dentro de una base de datos de ADN. La construcción del arreglo de sufijos y la búsqueda usan la biblioteca de código abierto libdivsufsort-2.0.0 (http://code.google.com/p/libdivsufsort/) que convierte cualquier cadena de entrada directamente en una cadena transformada de Burrows-Wheeler. El programa escanea la secuencia de nucleótidos de entrada completa (objetivo) y devuelve todas las combinaciones de subcadenas que se producen menos de un número seleccionado de veces en la base de datos de ADN seleccionada.

Selección del sitio objetivo para la mutagénesis mediada por nucleasa con dedos de zinc de una secuencia de consulta. Un dominio con dedos de zinc de unión a ADN reconoce una secuencia de nucleótidos de tres pares de bases. Una nucleasa con dedos de zinc comprende una proteína con dedos de zinc que comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más dominios con dedos de zinc de unión a ADN, y la nucleasa no específica de una enzima de restricción de tipo IIS. Las nucleasas con dedos de zinc pueden usarse para introducir una ruptura bicatenaria en una secuencia objetivo. Para introducir una ruptura bicatenaria, se requiere un par de nucleasas con dedos de zinc, una de las cuales se une a la hebra más (superior) de la secuencia objetivo y la otra a la hebra menos (inferior) de la misma secuencia objetivo separadas por 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más nucleótidos. Mediante el uso de plurales de 3 para cada uno de los dos motivos de ADN de subcadena de longitud fija, el programa puede usarse para identificar dos sitios objetivo de proteína con dedos de zinc separados por una longitud de espaciador dada.

Entradas del programa:

1. La secuencia de ADN de consulta objetivo
2. La base de datos de ADN a examinar
3. El tamaño fijado del primer motivo de ADN de subcadena
4. El tamaño fijado del espaciador
5. El tamaño fijado del segundo motivo de ADN de subcadena
6. El número umbral de apariciones de la combinación de entradas de programa 3 y 5 separadas por la entrada de programa 4 en la base de datos de ADN elegida de la entrada de programa 2

Salida del programa: Una lista de secuencias de nucleótidos con, para cada secuencia, la cantidad de veces que aparece la secuencia en la base de datos de ADN con un máximo del umbral de entrada del programa 6.

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. Diversas modificaciones y variaciones de la descripción serán evidentes para los expertos en la técnica sin apartarse del alcance de la descripción. Aunque la descripción se ha descrito en relación con modalidades preferidas específicas, debe entenderse que la invención como se reivindica no debe limitarse indebidamente a dichas 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.

Secuencias

SEQ ID NO:1 (secuencia de nucleótidos de NtIPMS2)

ATGGCTTCTCTCTCTGTAAATTCTATAATTTCCCTGAGCACTTCCCTTTCATTACATTCTAAAAACCCACTTATTCACAGTGTCTT
CAGTTTCACGCCTTCAACCACAAGGCATTCAGCTATATGCTGCTCAAATATTCGTCGGCGGCCGGAGTATAAACATGGAAAATTCT

CTGACCCTGATTATGTTGGTATTTTTGACACCAGTCTTCGCGATGGCGAACAGGCCGCTGGTGCTACCATGACTAGTAAAGAAAAA
CTGGACATTGCACGTCAGTTGGCTAAGCTTGGTGTTGATGTTATTGAGGCCGGTTTTCCTTTTGCCTCTGAAGCTGAGTTCGAGCT
TGTAAAGTTGATAGCACAGGAAATTGGTAATAACGTAGACAAAGAAGGATACGTGCCGATGATATGTGCCTTAGCTAGGTCTAGTA
AGAAGGATATTGAAAGAGCTTGGGATGCTTTAAAGTATGCAAAGAAACCAATGCTTCATATGTTTATTGCGACGAGTGATATACAT
ATGAAGTACAAGTTAAAGATGAGTAGAGAAGAAATTGTGGAGACAGCTAGGAGTACGGTGGCTTATGCAAAAACCCTATTTGAGGA
TGTTCGGTTTAGCGCTGAAGATGCTGCAAGATCTGATAGGGAGTTCCTTTATCATATTATTGGAGAAGTTATCAAAGCTGGTGCAA
CAGTGATTGGCCTCCCTGATACAGTTGGATGCAATTTGCCCAGTGAATATGCACAACTGATTTCTGATATAAAAGCCAATACCCCA
GGAATACAAGATGCAAACATTTCAACACACTGTCACAACGATCTTGGGCTTGCTACTGCCAACTCCTTAGCTGGAATTTGCGCAGG
CGCAAGACTAGTAGATGTTACCATCAATGGAATTGGTGAAAGAGCTGGAAATGCTTCTCTGGAGGAGATTGTAATGGCCTTAAAAT
ATCGTGGAGAGCAAGTACTAGGTGGTATCTATACTGGGATTAATACAAAGCATATATTCATGACGAGCAAAATGGTAGAAGAGTAC
AGTGGGCTTAAGCTGCAGCCACATAAGGCCATTGTTGGAGCTAATGCATTTTCTCATGAGAGTGGCATCCATCAGGATGGAGTGTT
AAAGAACAGAGATACATATGAGTTTGTATCTCATGAAGATGTTGGGTATCGTCGTGCTAATGAAAACGGTATTAGTCTGGGAAAGC
TCAGTGGCCGCCATGCATTGAAAGCCAAAATGGCTGAGCTTGGATATGACTTTGATGGAAAAGAACTTGATGACCTCTTTCGTCGA
TTCAAGTCACTAGCTGAGAGGAAAAAGAAAATTACAGATGATGACTTGAGAGCACTTGTATCAGATGACGTTTTCCAGCCTCAAGT
TTCCTGGCAACTTGGAGATGTACAGATTACTTGTGGAAATGTTGGCCGCTCTACAGCAAATGTTAAGCTTATTGACAGCGATGGTC
AAGAGCACACTGCCTTTTCTGTTGGAACAGGACCTGTTGATGCAGCTTACAAGGCAGTTGACCTCATTGTAAAGGTACCTGTAACA
CTCGTTGAATATTCGGTTAATGCAATCACAAAACGTATAAATTCCACAGCTTCAACCAGAGTGTTAGTTCGTGGGAATGATGACTA
TGCATCGTTTAATACTTCAAACGGGCAAACTGTTAATCGTACAGTTAGTGGAACAGGAGCGCATATGGACATTGTCGTTTCAAGTG
TCCAAGCCTATGTTGAGGCGTTGAACAAAATATTCAGTTACAAAAAAACAGGTCTCGTGAACAAATTTGAAGGCAGTGCGCAATCG
TAA

SEQ ID NO:2 (secuencia de aminoácidos de NtIPMS2)

MASLSVNSIISLSTSLSLHSKNPLIHSVFSFTPSTTRHSAICCSNIRRRPEYKHGKFSDPDYVGIFDTSLRDGEQAAGATMTSKEK
LDIARQLAKLGVDVIEAGFPFASEAEFELVKLIAQEIGNNVDKEGYVPMICALARSSKKDIERAWDALKYAKKPMLHMFIATSDIH
MKYKLKMSREEIVETARSTVAYAKTLFEDVRFSAEDAARSDREFLYHIIGEVIKAGATVIGLPDTVGCNLPSEYAQLISDIKANTP
GIQDANISTHCHNDLGLATANSLAGICAGARLVDVTINGIGERAGNASLEEIVMALKYRGEQVLGGIYTGINTKHIFMTSKMVEEY
SGLKLQPHKAIVGANAFSHESGIHQDGVLKNRDTYEFVSHEDVGYRRANENGISLGKLSGRHALKAKMAELGYDFDGKELDDLFRR
FKSLAERKKKITDDDLRALVSDDVFQPQVSWQLGDVQITCGNVGRSTANVKLIDSDGQEHTAFSVGTGPVDAAYKAVDLIVKVPVT
LVEYSVNAITKRINSTASTRVLVRGNDDYASFNTSNGQTVNRTVSGTGAHMDIVVSSVQAYVEALNKIFSYKKTGLVNKFEGSAQS

SEQ ID NO:3 (secuencia de ADNc de NtIPMS2 usada para la complementación)

ctcttttcttagggaaaagaataatggcttctctctctgtaaattctataatttccctgagcacttccctttcattacattctaaa
aacccacttattcacagtgtcttcagtttcacgccttcaaccacaaggcattcagctatatgctgctcaaatattcgtcggcggcc
ggagtataaacatggaaaattctctgaccctgattatgttggtatttttgacaccagtcttcgcgatggcgaacaggccgctggtg
ctaccatgactagtaaagaaaaactggacattgcacgtcagttggctaagcttggtgttgatgttattgaggccggttttccttttt
gcctctgaagctgagttcgagcttgtaaagttgatagcacaggaaattggtaataacgtagacaaagaaggatacgtgccgatgat
atgtgccttagctaggtctagtaagaaggatattgaaagagcttgggatgctttaaagtatgcaaagaaaccaatgcttcatatgt
ttattgcgacgagtgatatacatatgaagtacaagttaaagatgagtagagaagaaattgtggagacagctaggagtacggtggct
tatgcaaaaaccctatttgaggatgttcggtttagcgctgaagatgctgcaagatctgatagggagttcctttatcatattattgg
agaagttatcaaagctggtgcaacagtgattggcctccctgatacagttggatgcaatttgcccagtgaatatgcacaactgattt
ctgatataaaagccaataccccaggaatacaagatgcaaacatttcaacacactgtcacaacgatcttgggcttgctactgccaac
tccttagctggaatttgcgcaggcgcaagactagtagatgttaccatcaatggaattggtgaaagagctggaaatgcttctctgga
ggagattgtaatggccttaaaatatcgtggagagcaagtactaggtggtatctatactgggattaatacaaagcatatattcatga
cgagcaaaatggtagaagagtacagtgggcttaagctgcagccacataaggccattgttggagctaatgcattttctcatgagagt
ggcatccatcaggatggagtgttaaagaacagagatacatatgagtttgtatctcatgaagatgttgggtatcgtcgtgctaatga
aaacggtattagtctgggaaagctcagtggccgccatgcattgaaagccaaaatggctgagcttggatatgactttgatggaaaag
aacttgatgacctctttcgtcgattcaagtcactagctgagaggaaaaagaaaattacagatgatgacttgagagcacttgtatca
gatgacgttttccagcctcaagtttcctggcaacttggagatgtacagattacttgtggaaatgttggccgctctacagcaaatgt
taagcttattgacagcgatggtcaagagcacactgccttttctgttggaacaggacctgttgatgcagcttacaaggcagttgacc
tcattgtaaaggtacctgtaacactcgttgaatattcggttaatgcaatcacaaaacgtataaattccacagcttcaaccagagtg
ttagttcgtgggaatgatgactatgcatcgtttaatacttcaaacgggcaaactgttaatcgtacagttagtggaacaggagcgca
tatggacattgtcgtttcaagtgtccaagcctatgttgaggcgttgaacaaaatattcagttacaaaaaaacaggtctcgtgaaca
aatttgaaggcagtgcgcaatcgtaaaagtgatggtgtgtgctccagaaacaaaagcttaaatgctgcttagtgctcgatgatcat
aaatttatgctctattcatgcatgcattactgaagttaattaagaagtaatcttaattgtataagatgtaaacatgtttctattca
tgcattactatgaaattaattacaatttctgagccaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

SEQ ID NO:4 (Secuencia de ADN genómico de región *NtIPMS2* que cubre exones XI, XII y XIII según se observa en Red Russian. Las regiones coincidentes con ADNc se subrayan. Las negrita muestra las regiones conservadas de ADN entre la secuencia de ADN de Red Russian y Hicks Broadleaf)

AGCAAGATGTCAAGAAGCACACTTGCCTTTTCCTGTTGGAACAGGACCTGTTGATGCAGCTTACAAGGCAGTTGACCTCATTGTAA
AGGTTTATAATGAAACTGAAAACTCTCATAATGTTTGTATCTTGTCACACTAGTAGGATAGGTAATTTAGGTTTTATATACGCTGA
AGGTATAAAAATATTTACTCAATCAGAGCGCTTACAAGACAATTGCAGGTAACTCTATGAGTAGCTTAGACTAAAAGATAAACGTA
GTAATTTCAATGTAAATAGTTTAGGAGACATGCGAATCTTTCCTTGACAAAGAAACTAAAAAACTTGCGAAGCACGCACCTCAATC
ACCCCGTCTGTGTGAATTGAACGAACTTAAAAGTACAACCAGCTTAAACTGATTTTTTACCTATTTTTTAGTGTTCAGACGGATCT

GCAGCAACCATGATTTGATTCACCGGTCGACAAATATCCTCACCGTGCATTCGAACTCCCTTTCTCCACATCCTAAAAATCCTCTT
CTAAGATGTCTTTGTTTGCAAACTCTAGCCGTCATATCTTGGTGGAAAACATGTCTCTTCTAATATGTGTATTTATATGTTATAAA
TAGTATTTAGGAGAATGGCAAGTTAACAGACTAATTAACACCTATTATGAATGGATCCAACCGAATAGAAATATTCCAACATTTAG
CTAAGTAAGCTGCCAAGTCAAATAAGACTGATAGAGTAAAAACTCTTTCATATAGCAATGAATATAACCTAAATCCTTTAGTTACT
GCTAGCAATTTTGTAGGTATAATTGCTTTGTTTGGTAAAAACATCTATGTAACTTTTGTTTTATAAGTAATGTTCTTTGTCATTAT
GCAGGTACCTGTAACACTCGTTGAATATTCGGTTAATGCAATCACAAAACGTATAAATTCCACAGCTTCAACCAGAGTGTTAGTTC
GTGGGAATGATGACTATGCATCCGTTTAATACTTCAAACGGGCAAACTGTTAATCGTACAGTTAGGTATGAAATATACATGAAGTA
CTGTTTCCCTTTAATTTATCCTTATTTCCCTTAATAATATTCTTTCATGCATAATGTGGGAACATGAAGATGACAGAGAAGAATTA
AAACGATTTTTTCCTAAAGGAGAAAATAATATGTGATAGGAATGAAATGTTGTCAGTTTTATATAGTTCTCAAATTTTATGGTACT
ACGGGTATCTAGAGCCAACCTGAGAATAGAAAGTATCATATAAGAAATATACACAGCAGTTAGATAGAGTACATTTTTAATTATTT
AATTATATTTATGCATGCCTCAACACGTTTACTCACCTCTTAGCCTAATTTTTGTTACATGGGATCGTTCTACATTTTGAGTAGCT
GAGAGATTTGAACTTAGGACCTTTATTTTCTCTAACACTATGTTATATTGCCAGTGGAACAGGAGCGCATATGGACATTGTCGTTT
CAAGTGTCCAAGCCTATGTTGAGGCGTTGAACAAAATATTCAGTTACAAAAAAACAGNTCTCGTGAACAAATTTGAAGGCAGTGCG
CAATCGTAAAAGTGATGGTGTGTGCTNCNNCTANAAG

SEQ ID NO:5 (Secuencia de ADN genómico de región *NtIPMS2* que cubre los exones XI y XIII según se observa en Hicks Broadleaf. Las regiones coincidentes con ADNc se subrayan. La negrita muestra regiones conservadas de ADN entre la secuencia de ADN de Red Russian y Hicks Broadleaf.)

GTCAAGAGCACACTGCCTTTTCTGTTGGAACAGGACCTGTTGATGCAGCTTACAAGGCAGTTGACCTCATTGTAAAGGTTTATAAT
GAAACTGAAAACTCTCATAATGTTTGTATCTTGTCACACTAGTAGGATAGGTAATTTAAGTTTTATATACGCTGAAGGTATAAAAA
TATTTACTCAATCAGAGCGCTTACAAGACAATTGCAGGTAACTCTATGAGTAGCTTAGACTAAAAGTTTTAATTATTTAATTATAT
TTATGCATGCCTCAACACGTTTACTCACCTCTTAGCCTAATTTTTGTTACATGGGATCGTTCTACATTTTGAGTAGCTGAGAGATT
TGAACTTAGGACCTTTATTTTCTCTAACACTATGTTATATTGCCAGTGGAACAGGAGCGCATATGGACATTGTCGTTTCAAGTGTC
CAAGCCTATGTTGAGGCGTTGAACAAAATATTCAGTTACAAAAAAACAGGTCTCGTGAACAAATTTGAAGGCAGTGCGCAATCGTA
AAAGTGATGGTGTGTGCTATCTGCNAAAAACTCGA

SEQ ID NO:6 (secuencia del cóntigo BAC que corresponde a NtIPMS2 (la longitud total del BAC es 76 832 pb. Se muestran solo 14 232 pb)

TGATGATTTCTCATTATAATTGTAACTAGTGGTGGCAAAATGGTAAAAAGAAAACAGTTATCCATCCATATTATTCATTAAAAAAT
GGGTTGTATAATGAACTTTTTAAAAAAGGATCAATTATGGATAAGAACCATATTATCCGCTTAGAAAATGGATAACCAATAAGTTA
ACTTCTACACTTGTAAAGCTTCAAATTGGGGGTTCCTCAAGTTTGTGAGAAGAAGAATTCTCCCAAAGTGATCATATTCAAGAAGT
CTTGGATAAATGAATATCCATATTATCCGCCGATTATCTCGTTTTAATCCGTATTAAATATGAGTCGGTTCGAATAATTTATCTGT
TTTTGTATTATCTACTTTGGACATGTCCATACCCGACCCGACCCCGCTCGTTTGTCACCCCTAGTTGTAACATATACTGTTTGCTT
ACCTAACGGGTTGAGTTAAGTACCATCACGACTTGGTGGGATTTTGGCTCTTACAAAACTACAATTGAGCCTGATTATAATATTTT
ATTATAAAATTGAGGTTCGGTATAATTTATTTTGCTGATCAAATCTTGGTGATTCAAAGTTCAACTGAAATATGCAATACTAAATT
ATTTTCTTATTTAATAAATTTTATGATGAGCTAATATTTATAATTTGAATAAAAAAAAATTCATAATACTAGTATTTTTGAGTTGA
ATAGAAATTGTCAGTACAGTTGAATATAACAACTGTAATTATTCATAAAATATTTTAGTTTGATATAATAATAATCTTTCAAAAAA
CATTCTTACAGAACTTGACTGAAACCATAATAAAGTATCTCACTACTTTTGTGCGACAAGGTTTCTTCCTAAATGAGATCAACAAT
CATTCTTTTAAGGATTTTTATTTTTATTTTTATCACAAATATATTACTCAATATCTAAGTAATCTTTAAAAATCTGTATACTCATT
ACTATAAAGCATACATGCAAAACGCGTACAATAAAAACTAATTTTTAAAAAATAGGGGGAAGGAGAAGGGATGAACAGAACCCTCA
TTAATAAAGCAAAAATTTAAATATCCAACAAATTGAACTGTTAAGATTATAAAAAAAAAGAAAAAAGAACTTCATTGTCGAAGTAA
GTCAAAGTATCACTAGCCGTAAAAATTTCGGCACCTTTTAAAAGAATGATAAATATACTAGGGAAAGCCTAAAACCTCTTGGTATT
AATAACTATAGTTTAGAAATTAGGCAAAGCCGCTACTAGGGTAGTTAATTATTGGTTCTGTTTATATTTATATCATTCGTTTTGTT
GATAATGATGAGCAACGTTCCATTACATGAAGAAACCACGTCAATGTTTATTCCCTCATTCGTTTTCTAAATTTATTCGAGATGTG
AGTAAACCTCCCCCCACCCCCACACACCCCCTTTTTTTTTTGCTGTTAAAGTTTCGACAATAAGAACGTTCAGAGTTTCTTGAACT
TCTGTTTTATCTGCAGAAATTATAAATTGGAGTCAACCACTGCATCCCAAATTGATGCAGACTTTATCTGAATAATTAATCAGTAT
ATAATTATAATATCTATTTTCTATGTTTCTAATTTATGTGACACATTTCTTATCCGTTAGTTTAAAAAAAATGATAAATTTATATA
TTTCAGAATAATTTAACTTTAAATTTTTTTATTTTATCCATTTTACCTTTAATGAGAAACTTTTGTAACCATACAAATGTTATAGA
ATATATTTAGAACAACAAGTTTCAAATATTTTATAGTCACATAAATTTAACACACAAATATTAGAGCAAATTTCAAACTACTTCAC
ATAAATTGAAACAGAGGGAAAAATAATACTCCCTCCGTTCCCTTTTACTTGGCACGTTTTGACTTTTTACGCCCCTTAAGAAATAA
TAAATGAAGTGCATAATTTACCATGATACCCATATTAATTGATGTATATTTTATTGGATTTGAAAAATGATTTGAAATGAGTAATA
AATATCGTGGGTATAACAAAAAAAAAATTATCTTCTCTTGATATGCGTAAAGTGACAAGCAAAAATGAAAATCTATTTTTAGTATA
CATGCCAAATAAAAGTGAACGGTAAAAATGAACGGAGGGAGTATATATTATTACTACTAAAACGGGAAACTGGGCATGCTAAGTTT
TTCATTGCTATTTCAAGTTCCGATTAATAGCCATAATATAATGTTTTCTAGAAACAAAGAACAACGCCAAGATAAATTTTCCCAAA
AAGTAGCACAAATGTAACAAATTCTTACCTCAAATTTTAATCTAAACACATAAATTTTCTTTATAATTGTTTCTTAAAAACTTAAA
CTAAATTCAAATGCCAACAAGTTTAAATGAGCAAGGAAGTATTTTCAGTTTCTATTTCTTGAATTTAATAAGAATGGAAATATTTT
CCGTTTGTTTACTGGGTTCTGTCTAGTCTAGCTTAAGACGAAAATTGTCTTGTTTTAAGTTTTACAAACCGTAAGGGGTGGTAATT
CAATTTTCAATTGTAGTATGAGCAATTAATTCCAACACAAAATCTCACGTGAAATAATATACTCTAGTGTTTGTTTGGCGTACGAA
AAAGAAAGTCTACATAATTAATGCAGCGTTCCATAGTTGATATTAAAATAATACCCGTAATAAATTATATAAAACTTTATGTGTTA
TTCTTTTGATAAAACAGCAACCAGACACACCAGGGGCTACTTTGGTCATTTTCTCTCCAATAAAAACCCTTGTTTCACCAGCTTTG
TAGGTGTTCGAATTCACCAAAGCGAACATTCCATTAACTCCGATCCACTCTCTTTTCTTAGGGAAAAGAATAATGGCTTCTCTCTC
TGTAAATTCTATAATTTCCCTGAGCACTTCCCTTTCATTACATTCTAAAAACCCACTTATTCACAGTGTCTTCAGTTTCACGCCTT
CAACCACAAGGCATTCAGCTATATGCTGCTCAAATATTCGTCGGCGGCCGGAGTATAAACATGGAAAATTCTCTGACCCTGATTAT
GTTGGTATTTTTGACACCAGTCTTCGCGATGGCGAACAGGCCGCTGGTGCTACCATGACTAGTAAAGAAAAACTGGACATTGCACG
TCAGTTGGCTAAGCTTGGTGTTGATGTTATTGAGGCCGGTTTTCCTTTTGCCTCTGAAGCTGAGTTCGAGCTTGTAAAGTTGATAG

CACAGGAAATTGGTAACCTTTAATGTTTAACCGTTCACATTTCTAATATTTACTTATTTGTAACATGTCGTCACGTGTTAGTTTCA
TTCTTTTTTATGAACCAAACATGCATGCAAAGATATTTTTAGATATTTGGACGGCGAGTGAGATTTGAAACTAGGACCGTTTGCCTG
ATACAATATTAAAATATGTAACCATTTTATGTACAAGTTTAAACTGTTGATAGTAGCATATTTTTTACTTTTATTTAAGTATACTA
TATTCCAACAGGTAATAACGTAGACAAAGAAGGATACGTGCCGATGATATGTGCCTTAGCTAGGTCTAGTAAGAAGGATATTGAAA
GAGCTTGGGATGCTTTAAAGTATGCAAAGAAACCAATGCTTCATAGTAAGAAAATATTTCAAGATCGAATTAGGTCAAAAGTGTAA
TCGTAAAAAGTAAAAGAGAGAATCTAAAGGTACTTATTTGTTCTGGTCTTTTCTTTTTTTAATATAAGCGGCCTTGAGATTATAGG
AGGTTTGATATAGACCTCTACCATGTAAATTCTTATTTATTTGCTTTTTGTTTAGCTTTTAACCTTTTCCCTGTACTGAAATAGAT
TGTAATGGCCTTAAAATATCGTGGAGAGCAAGTACTAGGTGGTATCTATACTGGGATTAATACAAAGCATATATTCATGACGAGCA
AAATGGTACTCTCATCTTAATCTTCTAGTTAGAGATATATTTTACCAGTTTTAAAGCTGCTTAATTTTTTGTGCCTTTCTGTTGAC
ACAATTGTTGCTATGTAGGTAGAAGAGTACAGTGGGCTTAAGCTGCAGCCACATAAGGCCATTGTCGGAGCTAATGCATTTTCTCA
TGAGAGTGGCATCCATCAGGTTTTGCGTTATTTTTCTCTAAAAGTTTTACTTCTACATACACTAGATTTGTTGAAAGATTACTGAA
TTGGCGACCTTCTACACTAGGTTAAATTGCAATAAACATTTCATACCACTACCGGTTGATATAAAATAAATCCTTTCTCGTTAAGA
TAAGATGGGTAAAATGAAGAATTCAAAGTTGAATTATTTTCAATTATAGAAATGTATCATTCTTTTTGTAACAGACTAATAAGGAA
ATTGTGTCATCTAAATAACACATGAAGTATTTGGATTCAGCCCATTGCCCCTTCCTCTTTCATTATCGCCTTAATCAGGATTCTCT
ACTTCCATAGTATCATTCAGTTTTCATTCTTCCTTTTTAAATTTTTTTTAATGTGGTTTAGGATGGAGTGTTAAAGAACAGAGATA
CATATGAATTTGTATCTCTTGAAGATGTTGGGTATCGTCGTGCTAATGAAAACGGTATTAGTCTGGGAAAGCTCAGGTATGATTTG
ATTTTCAGAGTGATCGATTTGTTATGTTGATGGTTTGATAGAGATTATTGTTTCAAATTCTTTGGTCTTTCCCCCATATTTTTGGA
TGAGTCAAAATAATTCGACTAATATATAGTCCTACCAATTTGGTGTCAACATATGTACGAATTGAATATAGTCATCAATCAACTAT
GTCCAACTATCCATACTGTAAGGTATACTCCCTTTACATTAAAAAATACAAGTGAACTGAAAAAAAAAAAGACATTTTTTAATTAAA
GTGTGCTATCTCTAACCGTTTAAATTTTTAGATTAGATTATCATACAGTTCAAACACTTTAAAACTCGTACTATCCCCTAGAATTT
CAGTACCTCCGTTGTATTGAATCAACCCCAACCCTTCATTTTTCTCATTTACATTAGGCACATTGATGTACCTCTTTCCTTTAAGG
AATACATTTTGTAACATGGTAGAATATTTTGTGCAGTGGCCGCCATGCATTGAAAGCCAAAATGGCTGAGGTAAGATACATAATCT
ATAGTACGATATACTACAAATATTATAGTATATGGAAATGGATCAAATCATTTTATTTTTGTTACAGCTTGGATATGACTTTGATG
GAAAAGAACTTGATGACCTCTTTCGTCGATTCAAGTCACTGGCTGAGAGGAAAAAGGTGATTACGTTGCTGATATTTCATAGTGCA
ACAGTCAAATTTGTGATCGCACCTTTTCGTTCCTAGTGTTTGTCCATATTTTTTGAGTTAATTTCAAATATGATCACTAATTTCTA
CTATAACAATAAAATTTAAATTTTTTTATTCGCATTAAAGTGACTGAACTAACAATTAAAAATATTTGAAAAATATATGAAAAATT
ACGGCCAAAGAAAAACTCTTTTGACTCTCGACATCCGAGCATCACCACATAGTAATAAATGAGAAAATTATTTTTTATCAAATTAA
AGTAACTGAATTTTACTTATTATTCATAATAAAAGAAAATCACTAAACTATACGCACTATAGTGGCAAAACCTATCCATATTCAAG
GTGACTTTAAGTACCGGTCTAGTAGGTAGATTTTTGTGATTTTACTGTTATAGTGGATAAAATTAAAGTCACTTTTTTTGATAAAT
TGGAAGAATAGCCTGACAGACATCTCACTTATTCGGCTTTGACATCCCGGTCCCCCTACTCCATATAATTTCAACCAAACACTTAA
ACTTGTATAAAACATTAGTCTTAAACACCTCTGATACTGTGTGTGTTGTTCACTCGTGCTGATATAAAGGACACATCAGATCCACC
TCAGATATATTAATGCCACATCATTATCTATTTTTACAAAAAATATTTTTTAATAAAAATATCAAACTCATCCCTTTCTTCTCCAA
AAAAAAAAACAAACCTTATTCCTCTCTCCACCATTCCATCTCTGCCTCTTCCACCCGTCACCGCCACTACCAAACACTGCACCCTT
CCTCTTCCATGAGAAAACACTCAATCAAACCTACTTCATCTTTTATTTTTGTCCTAAACTTCTCCATTACTACAATCTATTCAACC
ACCCATGGTAGTCTTGTTGCCACCATCGCCAGCAACCACTCCAAAACCACCACTATATCTCCTCTTCTCTTCATATTCATGTCACT
CTTTCAAAACCTAGACATTGAACGAGTTTAATAAAATCTATCCTTAAATTTTCTTTCTAGCCAAATACCCAAAGCAAAACCAAAAA
AATTGAAAAAGAAAGAGAAGAAATTTTTACTCAAAATTCTTATTGACCCCTCCAGCAACGATAAAATTTATAAAACTAACAAAATC
AAGCTTCGGCGTTTTCAACAACCGATGACGATCCAATTTCTGGCTTAAACACTATTTTCAAGCTTCAATGTCTCTTAATTCTCCGG
CGTCTTCATTGTCTTCTTCAGTTATTTTGAGAAAAACAAAAATTAAATAACTTTGTTCCTTGACTAGCTGCTCTGCTAAACTCTAT
TAGTTTGGTCTTGTTATACTGCTTCTTTTTTTATTTTTATCATAGTCCAGTTGATTGCTAAAATTGTAAGAGAAATAATGTAATGC
TGTTTGAGAAAACTCTACTTGAGAAACAAAAATTTAATATAGAGGGTGTGGAGCGTGTCAATTTCAATGGCGTTTTTAAGAGATTT
GGGGGTAAGAAGAAGCGGCTGGGATAGAGAGGGGCGAGATAATGGCTAGCATTGTTTTTAATTTTTTTTTCTTTTCATTTTTCTCT
TTTATTATTTTCTAATCAAATTTTGTATAGTTACTCGCTTTTAGGAGCGTGCAATCACTTATTTTGTTTGACTCACAAAACAAAGG
CTACATAAGTTTGGTCAATGGTTAGATGAGTTTAAAACTAATGTCTTATACAAGTTCAAGTGCCTGATTGAAACTATGTGGAGTAG
GGTGATCGGAATGTCAAAGCCGAATAAGTCGAGGCAGTGGCGAAGCCAAGAAATTCAACAAGGGTATTCAAACCTTTGCCAGTGGG
CTATGTAAGGGTGTTCAAAGCCTATTTTTAATCAATAACAAGTAATATTTTACCTTATACGGAGTATAATTTTCTGGCGAAGGGTA
GTCAGTTGACCACCCTTGATTGCACGTAGCTTCGCCCCTGAGTCGAGGTGTCTCTTAGGCTAAAATAGCGTGATAAATTTTATAAT
AAAATTTATTTTATATGAGTAAAGTTAATAAAATTTATTTTATATGAGTAAAGTTAAGTAAATTATAATACTTAAAGAAAATTGAA
AGCTTACATATGCAGAGGTCCGGTCCTCGACCCACTTATCTTGATCCCCCTCTTTCTTCTTCTTCACAATATGCGTCTCCTTGAAT
AGCTCATCATGACTCATTGGACGCCCATACTTCTTTTCCTGAAAATAAATTAATTTAGTTAATAAATAAAATAGATATACTTAGAA
AAGTAAAATAATTTAAGCAATTACGTACCAATCTTCTTTTTATTGTCCCTAGGCTGATCGCACCTCTAGTGTGCAAGGAGCCTCCC
TTCTCGGATGCGCGAGCTTTCTTTCCTTTTTCGCTCCTCTCTAAGAACTTTGCGGTAAGCCATTGCCTTTGCAAATCATTCCACAA
ATTCTCAAGTAACCAGCCAGGCCTCTTGTTCTTCTTTCTAGCATCCGAGAAAGCATCCGCCAATCTCTTACTAGCTTTGTGATGAA
AATTTGCAGCCACTTCCGCGCTATAGCGGTCTTTCCATACACACTTGCTCTGTATTTTAAAATTTAATTATTAGATGGAAACATCA
TAAATATAAATTATTAAACTGTTTAAAAAAATATTTATACCTTAAATTGATTGAAAATTTGCTCTTTCAGTGAGAATGGACAATCA
GTCCAAGTCGTATAAGGGCCATCATAAAGCTTTCTGATGGCATTAGTGATTATCTTCGTAGTCTTATTACCCGGCCTGAACCTACA
ATTTAATAATAAAAACACATTAATATCTTAGTAAAAATGTTACAAATCAATAGACGGAAAAATAATGAATAACACTTACCCATCAC
CCTTAGGGACTATGATGATCCTGCCATATCGATCATAATGCACTACCTCGTCATCACTATTCGAAGCATGTGTATCAGAGGCATGT
GAAGACGGTGTAGGCGGGTCAGAGCTACTGCCTCGTAGGCGAAGGCCTGCAATAGATGGAGTCGATAATGAAGATGGTTGTGATCC
CTGTGACTACAACATAGCTGGATGTGACCCAAGTGGATGTGATAATGCTGGCTGTGACCCGAGTGGCTGTGACATGGATGGATGCG
ATCCATGTGGCTGTGATATGTAGGGATGTGATCCATATGGATGTGATGTAGATGGCTGCGATGCAGATGGCTGTGAGGCAGCTGGA
CTGTATGTCGAACATATAGTCCTATGGCCCTGTGATGGAAGACCTGGTGTCTGAACGAAGGTGTATGATTCGTGATGCTGTGGAAA
CTCAGTATAGCCGTGTGGTGGAGGATAAGACATAGGCATCTCTGAAAAGGGTGGACAAGAGGGACTATTATTTTCTACCCTCCTCT
TTCCCTTCCTACCCTTTTCTCGACCCTGAGAACTAGTAGGGTCATTGTTACCTTGACCCTTGCCTGCCATCTGTATGATATAATGC
ACATTTAGATTGAAACATATAAGAAACTAGCTATAAAACAAGAGTGCTTTAAAAAACCAACTTTTTAATCCTCATCGACGTATTGT
TCCTCGTCCGAGAATTCTTCGTCCTCATTTGTTTGAGCTTCATCAGTTGATTCTTCGTCCTCATTTTCTTTAATTGTTACTTCATT
TATATCACCTTCTTCCAATATGCATTCAGGATGTTCCAAATCATTTTCTAACTGATCGTCCACTATTTGGTGAATATTAGAAATAT

CATTTTGATATGCAATATTTAACACATTCTCGACTTCCACCCTACCTACATGCTTAGTTTTTATTACAACCCACCAATCGGACTTA
TTCCGCCGCAATGGATAAGGAGCATAATACACTTGCCTAACGTTATGTGCAATTATGAAAGGATCATAGCGATCATACTCCCTCGT
ATGATTAACCTCAATTATGTTGTATTGGTGGTGTACACTTGTACCTCTTGTTGGATTTGGGTCAAACCACTTGCATATAAAGAGTA
TCAATTTCTTATATGGCCAACCTGTATATTCTAGTTGTAATATTTCTTTGACCACACCATAATAATCAATATCTCCAACTTGGTTG
CCATCACCACCTTGAACCCACACCCCGCTGTTGTTACTATTTTTATTTTTAGAGCCATCCTTTGTATGAAACTTATAACCATTCAC
TACGTACTTAGACATTGTTGTGACCTGAAGCCCAGGTCCCCAAGATATATCTTTCAAAAATTGATTTACACCATTATTTGGATTAT
TTACCTACATAGTGTTAAAAATATTCATAAGTTAGCATAACTTATAAATCAATTTTTATACATTCATTACATATATATATATATAT
ATATATAACTAGTGTATATATATATACAAACTGTTTGAACACGTATCAAATCTCGTATATACAACATCATGGCCAAATTGACCTAC
GAAGTGACTGTGACACATCAAATATTTTTAGTAGTTGCATCAATATGTAGTCACAGTAAATTTTACATTTTGATAACTAATAAATC
AATACTTACTTGAGAAATGGTACAACTTCGGAACAATTTAGCAACACATGAAGTGTAGCTGACTTGTACTCCATATCACTCAAACT
TCTCTTTCTAACATCCTTAGAACATCGGCCTGGTTGATTGAATATAGATATTGGTGGATATAATGGATCATTCACATATTCGACCG
TGTGCCTATTGGGCCTATTCCTAGAACATGGCACGTTATTCTCAAAATAATAAGAACAAAAATATGCAGTTTTCTTTGCAAGATAG
GCTTCGCATATAGATCCTTCAATCCTATTCCCTGCTTAACAAATTGTTTGCATTTGCCAATTGTCCTACATAATGTCATGTTAGCC
AAGAACATTCAAATAAAATAGAATATTACATCAAACTTATAATATTACCTCTCAAAGGGATACATCCATCTGCATTGAACATGCCC
TCCAAGTCGTGCCTCGTGTACAAGGTGTATTGGAAGGTGTTCCATTACATCAAAGAAACCACATGGGAATATTTTTTCCATCTTAC
TAGAAATTACACGAATGTTCTGGTCCATCCGAAGTAGGTTTTCTTCCCTTAATGTGGTAGAACACAAGCCTTTGAAAAACAAATTA
ATCTTTATGATGGGTTTCCAGATTCTTTCAGGCAAACCACAAAATGCAATAGGTACTAAGGTCTCCATGAAAACATGGCAGTCATG
ACTTTTCAAATGGCTCAACTTCCCTACCTCCATATCTATTTTTTTCAAGATTCGACGCATAACCCTCAGGCATCTTCAATTTCGTA
ACCCAATCACAAATTTGTCGTCTTTCCTCCAAAATGAATGTGTAACTTGCTTTGGACTTGAACACCTTACCATTGTTTGCTGTCTG
CAAGTATAATTCAGGCCGCCTGCAATATTCTTGTAAGTCCATTCTAGCCTTCGGGGTATCTTTTGTCTTACCTTTAACATCCATCA
CTATGTTGAACAAATTGTCAAAATAATTCTTCTCTATATGCATGACATCAAGGTTGTGTCGGAGAAGATTATCCTTCCAATAAGGC
AACTCCCAAAATATACTTTGTTTCGTCCAATTATGATTAACACCATATCCGAGGAATCTATAAGGTGGAGCCTCAGTAACTTTACT
GAAGTTCTGGACCCTCTCCCAAATTTTCTCACCTGAAAGTATCGGAGGTGGAGAATCATATTCCACTTTATTCTTTTTGAATGCAT
TTTTCATCCTTCTAAACTCATGATCATCAGGCAAGAATTGACGGTGACAATCAAACCATGATTACTTTCGGCCATGTTTCAAAGTG
AACGCTTTACTATTTTTCATACAGTAAGGATAAGCTAGCTTTCCAGCAGTCATCCACCCAGACAACATTCCATACGCAGGAAAATC
GTTAATAGTCCACATTAAATTAGGACGCAAATTGAAATTCTGCTTGGTTGATATGTCATATGTTTCAACACCATCATACCACAATT
GTTTTAGCTCATCAATCAAAGGTTACAAATATAAATAAATCAAACCTTTTGGATTACGTGGACTGAGGATAATATAATTTCAGAAT
ATATATGGACTAGTCATATACAACTAAGGTGGTAGATTATAAGGTATAAGAAAGACAGGCTAACATGAGTATGGTGTCGCAGATAT
AGAAAAAGGCGTGAAGCCATCCGCACACAGACCTAACCGAATGTTCCTTGATTCACTAGCAAAATCTGGATATGTCCTATCAAAGT
GTTTCCAAGCTTCTCCATCTGAAAGATGACACATAACACCGGGTGGTCTTCTATTTTCAAAGTGCCATCTCATATGAGGAGCAGAA
CTCATCGACGCATATAACCTTTTTAACCTAGGTATAAGAAGTAAATAATGCATCGCCTTGACAACGGCCATATTCCCACTGGAAAG
CCTCTTGAAACGAGGATTTTCGCAAAATTTACAACTGTCTAAAGTTGCATCATCTTTATAATATAACATGCAACCATCTTCACAAC
AATCAATTCTCATTGACGAAAGTCCTAACTTAGAAACCAATCTCTTTGCCTCATAGAAATCACCAGGTAAGTTGATATTAGGGTCA
ACTAGTTCACTCATAAGGTCAATGAAAGAGTCCATGGCTGCTTGAGAAATATTCCAATCAGATTTGATACTTAGTAATCTAACTGC
AACAGACAGCTCAGAGTGCAGACTTCCTTCACGTAGTAGATGACTAGCTTCCTCTAGTGTTCATAAAAACATTTTGCGTCTTCATT
AGGAGTTTGTTCAATATTTTCATTGGGCTCACCCCCGAAGTGCATCCCAAAAGCATCCGCAACCATATCCTGAATTCTAGAATCAA
GATTTGTATTCTCCACCGACCTACTACTTTCACCAACAACCATGTTACGAAATATCCCACGGCTACCATCGATCTCTCCATGATTA
GTCCACACAAAGTAATTCTCTATAAACCCCTTCCTATAAAGATGAAGCTTAATTTCCTCCGATTTTTTAAATTTCATACAATCGCA
CCTGATACAAGGTCACCAAATTACTCCTTCACTTTGGTATGGTGGAAGTGACATTGCATGTCTAATAAAGTCATCAACCCCTTCTA
CAAAATCCTCCCGCAATCCCCGCCGATTAGGATAATTCCTATTGTACATCCAAGTACATGTTCCATCTATACAAATAAAACAAGAA
CAAATTAATTTATTCTACAATTATAAATTAATTATATCTTTTTTAGTTAATTCAAGATAATTATTGTTTCCTAATTATACCAATTT
ATATCCTAAAAGTTCAATTCACACCCAAAAGGTCCAATTCATATCTTAAAAGTTTAATTCATATCCTAAAAGTTTAATTCACAAGA
ACAAATCCTAAAAACTAAAATTTCAATTCATATCCTACGAGTTTAACCATAAACGAACTAAACTAAAGAAATTCAACCCATACCCT
AAAAGTTCGATTCACAAGAACAAATTAATTTATTCTACAATTATAAATTAATTATATTTTTTTTAGTTAATTCAAGATAATTATTT
TTTTCTAATTACACCAATTTATATCCTAAAAGTTCAATTCATATCCAAAAGGTCCAATTCATATCTTAAAAGTTCAATTCATATCC
TAAAAGTTCAATTCACTAGAACAAATCCTAAAAACTAAAATTTCAATTCATATCCTACGAGTTTAAACATAAACTAACTAAACTAA
AAAATTTCAACCCATACCCTAAAAGTTTGATTCACAAGAACAAATCATAAACCCTAGATTCTAACTAAACTATTCAAGAAAATACA
AAGTTAATAATTCAATTCTAACTAGACTATTCAAGACAATACAAACTCAAAATTGAAATACTCATCAATTAAAACTAATTCATAAC
TAATTGACTAACTAACAAAACTAATTAGTTAATAAAACTAATTAACAAAACTAATTAAAACAAGACCTAAACCCTAATCCTCAATA
AAATGCAATGTTCAAATAATTGAAATACTAATCAATTGAAACTAATTCATAACTAATTAACAAAACCTAGAAATAATAAATAAATG
GGTTGTAATTCAAACGTAGAATTTTTAGGAGATGGAGAAGGAGAGGGGCGGCAGTGGCAGTGGCAGTGGCAGTGGCAGCGGCGATG
GCGATGGCGACGGCGCGGCGACGGTGATGGCTGGGCAGTGGCGACGCGGGGTGGGGAATGAGATTTATGTGAGGGAAATATAGAAG
GAGAGGGGAAGGTTTTGAGTGAGAAAAATAGAGAAGGAGAGGGGAAGATAAGAGAGAAATGGGGGTTCCCCCGTTTTTCAATTCTG
ATTTCAGAATTACCGACCAAAGTTGGTCAGTAATTTTGGTCGGTACATTAAGTGTTGACCGTTTGACCAAAAACCGACCAACTTCG
GTCGGTTTTTTTTTTTTAAAATTAAACTTTTTTTTTTGGTGTGTTTTTTTCTTAAAATATTATAAACTATAAAAAATATATTATAAA
CTACAAGCATTTATTTTATTTAACAATACAATTATTATAAATAATTATAAACTATAAGTATAATATTTACAAATAATTATATTAAC
TATTTAATTTTAATAAATTATAATAGCATCTATCTAAGTAAATTTTCTAAGTTATAATTAAGTATGTGAGTAATTTCTCACATACA
CACATACACTATATTGTAATTGATGCTAATTACTTCTTTTTTCATTCGTTCATCACTAATAATGCATGACATAGATTAATCGATAT
ATAGGTCGAGACGTTTTGATGAATCATCGATTAATATTCATCGATACATCTAAGTAAGTTATAAGTCGATGAATCAATTTACAAAT
AGATATATTTGATGATAAAGTATATATACTAATTAGTATCTTCCCAAGTCTATCCCTAAAAGAACCCGACCCTATGGTCCTAGCGC
TTCGTGTTCTTATATATATACGGCTATACCTATATATATATACACACACACACACACACACAAATACACTTCACTGTAATACTTTA
ACTATATATATATATATATATATATATATATATATATATATA

SEQ ID NO:7 (secuencia del cóntigo BAC que corresponde a NtIPMS2 (la longitud total del BAC es de 10 082 pb))

TAAAACACGCTTCGTTGTACTACTTTAACTACATATATAGCATATTATATATAGTATATGTTAGTGTATTCATTATTTGTATTACA
AAAGTGTTAACGAATTACATTTATATTATTTAGATAGTAAATATAAAAGTAATTCGAAAGTTTGACCAATGTTGACGTAATAACCG

ACCAACTTTGGTCGGTTATTTTACAGAAAATATCAATTACCGACCAAAGTTGGTCGGTAAATACTTTCCCTGCATTAACCGACCAA
CGTTGGTCGATAATTTTAAATATAAATTCTTAAATATTATAAAATATTTTAAATAATAAAATAATTATTAAAATTTTAAAAATTGG
GTCCAGATTACCGACCAACGTTGGTCGGTAATCCAAAATTTTCTTGTCTGACCAGCTAGGTCAATTCGTTGACCAATTTTGCCGAC
CAACGTTGGTCGGTATTTAGTTCAAAAAAAATGTAAAATTTTTTGTTTCCAGTTTTCGTCCAAGCTGGACGGTTTTTGGTCGCTTT
TTTTTTTACCGACCAACGTTGGTCGGAAATATTTGGTCAGTTTTTATCAGATTTTTAGTAGTGTCAAACACTTTAAAACTCGTTTT
ATCCCTTAGAATTTCAGTACCTCCATTGTATTGAATCAACCCCAACCCTCCATTTTTCTCATTTACATTAGGCGCATTGATGTACC
TCTTTCCTTTTAAGGAATATATTTTGTAACATGGTGAATATTTTGTGCAGTGGCCACCATGCATTGAAAGCCAAAATGGCTGAGGT
AAGATACATAATCTATAGTACGATATACTACAAATATTATAGTATATGGACTTGGATCAAATCATTTTATTTTTGTTACAGCTTGG
ATATGACTTTGATGGAAAAGAACTTGATGACCTCTTTCGTCGATTCAAGTCACTGGCTGAGAGGAAAAAGGTGATTAAGTTGCTGA
TCTTTCATAGTGCAATGGTCAAACTTGTGATCGCACCTTTTCGTTCCTAGTGTTTGTTCATATTTTTTGAGTTAATTTTAAGTATG
ATCACTAATTTCTATTATAATAATAAAATTTAATTTTATTTATTCACATTAAAATGACTGAACTAACAATTAAAAATATTTGAAAA
ACATATGAAAAATTACGGCCAAAGAAAAATTTCTTTGACTCTCAAACATCCAAGCATCACCACATAGTAATAAATGAAAAAATTAT
TTTTTATCACATTAAAGTAACTGAATTTTACTTACTATTCATAATAAAAGAAAACCACTAAACTTTACGCACTATAGTGGGAAAAC
CTATCCATATTCAAGGTGACTTTAAGTACTGGTCTAATAGGTAGATTTTTGTGATTTTACTGTTATAGTGGATAAAATTAAGTAAC
TTTTTTTGATAAATTAGCAGAATAGCCTGAGTGACATCTCACTAATTCGGCTTTGACATCTCGGTCCCCTTACTCCACAGTTTCAA
CCAAACACTTGAACTTGTATAAAATATTAGTTTTAAACACCTCTGATACTGTGTGTTGTCCACTCGCGCTGATATAAATGACACAT
CAGAGTCACCTCAGATACATTTAATGCCACGTCATTATCTATTTTTACAAAAAATATTTTTTTAATAAAAATATCAAACTCATCCC
TTTTTCTCCAAAAAAAGAAAACAAACCTTAGTTCTCTCTCCACCGTTCCATATCTGCCTCTTCCACCCATCACCGCCACTACCAAA
CACTGCACCCTTCCTCTTCCATGAGAAAACACTCAATCAAACCACTTTATCTTTTTTTTTGTCCTAAATTTCTCCATTACTACAAT
CTATTCAACCACCCATGGAAGTTCTGTTGCCACCATCGCCAGCAACCACTCCAAAACCACCACTATATCTCCTCTTCTCTTCATAT
TCATGTCACCCTTTCAAAACCTAGACATTGAACGAGTTTAAGAAAATTTATCCTTCAATTTTCTTTCTAGCCAAACACCCAAAGAA
AAACCCAAAAATTGAAAAAGAAAGAGAAGAAATTTTTACTTAATATTTGGTACCTCAAAATTCTTATTAACCCCTCTAGCTACGGC
AAAATTTATAAAACTAACAAAATCAAGCTTCGACGTCTTCAACAACCGATGACGACCCAATTTTTGGCTTAAACACTATTTTCAAG
CTTCAATGTCTCTTAATTCTCCGACGTCTTTATTGTCTTCTTCAGTTATTTTGAGAAAAAACAAAAATTAAACAACTTTGTTCCTT
GACTAGCTGCTCTGCTAAGCTCTATTAGTTTGATGTTGTTATGCTACACCTTTTTGTTTTTTATCATAGTCCAGTTGATTGCTAAG
ATTGTAAGAGAAATAATGTAATGTTATTTGAGAAAACTCTACTTGAGAAACAAAAATTTAATATTAGAGGGTGTGGAGCGTGCCAA
TTTCAATGGCGTTTTTAAGGGATTTGGGGGTAAGAAGAAGCGGATGGGATAGAGGGGCGAGATAATGGCTAGCATTGTTTTTAATT
TTTTAATTTTTTATTTTTCTCTTATATTATTTTCTAATCAAATTTTGTATAGTTACTTGCTTTTAGGAGTGTGCAATCACTTATTT
TGCTTGACTCAACAAAACAAAGGCCGTATAAGCTTGGTCAATGGTCATATGGGTTTAAAACTAATGTCTTATACAAGTTCAAGTAC
CTGATTGAAACTATGTGGAGTAGGGGGATCGTAATAGCAAAGCCGAATAAGTCGAGGTGTCTCTTAGTCTAAAGTAGCCTTATTTT
ATAGTGAGTAAAGTTATGTCATTATATTTATATATGAAATTAACCCTATAGGTTTTCCAGTTCTTTGGTGAAGCTTACCTAATTAA
AATTTTACCTGTGTCGGTATAATGAATATGTATGTCCGCCTATTTATCTTCCCTACATCTATTTTTCAGAAAATTACAGATGATGA
CTTGAGAGCACTTGTATCAGATGACGTTTTCCAGCCTCAAGTTTCCTGGCAACTTGGAGATGTACAGGTACATGTAAATACTATTT
CATGTGTTTTTGCCTAAGTTGCTCTGACACGGCAGTTTAGGTGACACGCCCGTGTCGGCAAGACACTAGTATGAGTGTGGATGTGA
GATCCGTACCGGATCTGGTCAAATAATTTTGGGTACTTTGACCGCAGCGTACGAAAAAATTAGAGATAAGATACAATTTGATTCCC
GAAATCAGAACCAAAGCTAGGGTGAATTTGAACAAAATAGCATACATTATCTAGGAAATCAATCCTTTACTTATCTACAACTCGAG
AATAAAAAATAAATCCACACATTACAAGTTATACGTAAGTATTCCACAAAATTTCTCGTAATTTAGATATATTTTTATATTTTTAT
TTAATTGAATTATTTTTAGTCGGATCCCCGCACCCGTATCCGTATTAGGATCAGTATCCCAAAATCTTAGAATTTACATCTCGAAG
GATCCGACCTCTAGATCTGCACCTGTATCGGATACCCGTACCCGTATCTGAGCAACTTAGGTTTTTGCTAGTCTCACTTAGTTGTG
GATTGAAAAGGAATTAATGTTCACCTAAATCTAATGATTTGCTGTTTATTGTACAGATTACTTGTGGAAATGTTGGCCGCTCTACA
GCAAATGTTAAGCTTATTGACAGCGATGGTCAAGAGCACACTGCCTTTTCTGTTGGAACAGGACCTGTTGATGCAGCTTACAAGGC
AGTTGACCTCATTGTAAAGGTTTATAATGAAACTGAAAACTCTCATAATGTTTGTATCTTGTCACACTAGTAGGATAGGTAATTTA
AGTTTTATATACGCTGAAGGTATAAAAATATTTACTCAATCAGAGCGCTTACAAGACAATTGCAGGTAACTCTATGAGTAGCTTAG
ACTAAAAGTTTTAATTATTTAATTATATTTATGCATGCCTCAACACGTTTACTCACCTCTTAGCCTAATTTTTGTTACATGGGATC
GTTCTACATTTTGAGTAGCTGAGAGATTTGAACTTAGGACCTTTATTTTCTCTAACACTATGTTATATTGCCAGTGGAACAGGAGC
GCATATGGACATTGTCGTTTCAAGTGTCCAAGCCTATGTTGAGGCGTTGAACAAAATATTCAGTTACAAAAAAACAGGTCTCGTGA
ACAAATTTGAAGGCAGTGCGCAATCGTAAAAGTGATGGTGTGTGCTCCAGAAACAAAAGCTTAAATGCTGCTTAGTGCTCGATGAT
CATAAATTTATGCTCTATTCATGCATGCATTACTGAAGTTAATTAAGAAGTAATCTTAATTGTATAAGATGTAAACATGTTTCTAT
TCATGCATTACTATGAAATTAATTACAATTTCTGAGCCAATTTTTTTATTTGGTTCTTAAAATTTATACAAATCTCTTTATTTGTA
TTTGACTAACAGATTTTCGGGAATTAGGGCAAGTAGTCCAATCAGAATCACATTAAGCTTGGAGAGTAAAATCAAAATCTGCACTC
CTGAACAAACCTTGACTCAAAGTACCTTTAACATATTTTAAAACATGAAAAGGAGCAGCCATATGAGAAGCAGCCATATGAGAAGC
AGCCATGTGCGGTCCTCACATTGCTTGAGCCTGCAGGTATTCTGTAGCTGCACAATTTGATCTGCAGCTGCACTTCAGCTTCTACG
ATCGCACAATTCATGTGCAGTCCGCACTTCTGGCAAGGCTTCAGTCTTGTTCATTTTGCACGCTCTCTGAACTTTTTGTATTCTTT
TCAGTGCAACTATGTTCTGCGGCCACACAAATTGTGTGCGGTCTGCAATTCTCTTCAATCACTTCTAGGCTTCTACATTAGATCTA
TGGCCGTAGAGAGAATTATATGGTCCGCACTTTCCTCTACGGCCACAGAAATACTTTTGCGGACCGCACTTCTGCTCTACTGCGCT
CCTTCTTGCCTTGTGAGCCGGAACACTCCTTTTTGAGTTGAATTTCTTCATTAGAGTACAAATTTCCAACATTCCTGTAATTTGCA
GACTTTTATTAGTTTTGGGAACATAAATCAATACTTTTGGACTAAAACTAAAGCAAGAAGGTACTAATAAGTGGTCAAAATCCACA
CTTATCACCAATCCATACCCAAAATAACATCAAAATCTACCATATTAAGTAACAAAAGATTAACCCTAGTCTCGTAGCCCCAATAG
TGACAAAACAAGAACAATAGACACAGTCTACCACAATAGAATCCCCAACGGGTGTAGACACATAAGTAGGAGTATTGAGAGAATCA
TGAGACATATCCAAATATGAAGAAAAGTAGGATGACACATACGAATATGTAGAACCCAGATCAAATCAAACTAATGCCTCTCTATG
ACAGATCAGAATGATACCTGTGATAACTGCATCTGAAGCAACTGCCTCAGTCCTACCAAGGAAAGAATAACAACGAGCTCGGCCTC
CTCCTCTATGATGACCTCTACCCGCCTGTCCTCCACCTCCAGCTAGCTGTGCAGGTGAAGTAGCAACTGGAGCGGGAACTGTAGCC
TTAGTACCTTGCTGAGGTCCATCCATCTTAAGTCTGGGACAATCTCTCACCTTGTCCCTAGTATCATCACACTCTAAATAACCTCT
ATGCGAGCGTTGCTGCTGGTACTGAGTTTGCCCGTGACGATTGGAATGACCACTCTAGGAACCTCATGCAGAAGGCACACTGAAAT
ATGTCCGGTACGAGTGCTCTAAGATCCATGGCTAGCTGGAGCACCACAGGAAATGTGAGGTGCATACTGAACTAGTCGACTGACAA
AGCCTCTGCCATAAAGGGTCTAAGCTGTATAGTAAAAACCACTAAATCCTCCAGAACCACGAGGCTTCTTATCCTCCCTATCCTCC
CTCTCCTGACAGCGGATACGCTCTAACATCCTAGCAATCTCCACAACCTGATGAAATGCAATCTCAGTCTCTAACTCCCGTGCCAT

ACCATATCTGAGGCTAAAGGCGAGTCCCTCAATAAATCTACGAACTCTCTCTCTATCAGTGGAAACCAAGGAAGGTGCATGACGAG
ATAACTCCGTAAACCTCATAGCATACTCGGACACAGTCATGCTCCCCTGGCGCAACTGCTCAAACTCATTGCACAACTCATCCCTG
CAGGTCTAAGCTCCATCAAGAAAAGATCAGAGAATAGGGACCATGTAAATGGTGTTGCGCCAACTATCATACTCGCCTCATAAATC
TACCACCATATGTATGCCGAACCCGTCAACTGGAAAAGTAGTAAGGTTGACCCCCCTCGACTCCACCAAACCTATGGTACGTAGAA
TGCGATGATACTAATCCAATAAACTTTGTGCATCCTCAGAAGTCCCTCCACTAAACTAGGGAGGATGAAACTTCAGTAACCTCTCC
AAACACCTCTGTCCCTCAGCCGAGACAACTGGCCCTACCTCGGGCTGAACTGCCGTTATTGGCTGCACCAACACAACACCCAGTGT
CTGGTAAGCATGAGTCGGCTACTCTGGTGTGCGGGCTGCGTGAGTTTGAGCTCCTCCCCCAGTATATGAAGTAGCTGGTGCAACCA
GAATCAACTCTTCCTCGGCCAAACTCACAAACATACTCATGAAGTATGCCAAGGTCTCCTAGAGCGCCAGTGTAGGAATAGGCTGC
TCAGGTGCACGCTCAACCTGCTCGGGCTCCTAATCCTCAACTGGATCTGTTGGAGATCCACCGTTGCTACTCTAGCTATAGCATGT
GCCCCTCCTCGGCCTCTACCTCGGCCCTGGCCTCTTGCGACTCTAATAGCGGGCACTTGTGCCTGCTTAGCTAATTTGGTAGAGCG
TGTCTTCGCCATCTATGGGAGAATAGAAGAGTAAAGGTTCAAACTTTGGAATAACAAATCGACATGATAAAGAATGAAGGAAGGTG
ATGTTTCCTAACAGTTCGGTAGCCTCTCAAAGATAAGTACAAATGTCTTTGTACCGATCGGCAAGATTATACTAAACCTGCTCATG
ACAACTCGTAGAACTTATGAACCTAGAGCTATAATACCAACTTGTCATGATCCAAATCTCACCATAGGGGTCTTGATGGAACCTAG
TCTATAAAACTAGGTAAGTCGACCACTTAACAATATTTAAATCAGCAAAACATGATATAATAAGGCAGAGTTTAATATGAAAGCAG
AAAATAGAGTTAACATCAGCCAAAATGGCAATACTCAAATATTTCCCCAGAATTAGGTAGTACAAAGTCATGAGCTCTGATAGAAT
ACATAAGGATGTCTTAAATTACAATACTGTTTGAATATGAAAATAACAATATAAATATAGGGAAGGGACTCCAAGGGAATGCGCCG
GTCATGCAGGTCTACCTTGAATCCTTGCGGTCAATGTAAGCCTCACTGCCTAGGTCCGCTGCCTCCAACACCTAAATCTACACAAA
ATATGTAGAATTATAGTATGAGTACACTACTATCGATACCAGTAAGTATCAAGACTAACCTCGGTGAAGTAGTGATGAGGTTCAAG
TCATTTGATACTCACTAGTCAAATAAGCTGTACAATATATCAAAGACTAGAAATAGAATGTATAATAGAAAATAATATCAACAATC
TCTTTGGAACATATGATAACAACTCAATGCAAGTAAAGGTTCATCTTGACAAAAAGTTATCAAATAGAAACACAAACGTATGATAC
CTCGTAACACAATAACAATATCCATCTGCATCACTCAGCCCTGACAAAATAACAATACCTAAACTTATCTCTTCGTCCTGACACAA
TAACAATATCCATCTGTATCGCTCTGCCCTGATATAATAACAATATCCATCTGTATTACTCCGCCCTGACATAACAACAATATCCA
CCCGTGTCGTTCCACCCTGACACAATAACAATATCCATCTGTTTCGCTCGGCCTTGACACAATAACAATATCCATATGTATCGCTC
AGAACTGTCACAATAACAATCACAATCGTACGACAGAAACCTCGTGCCAACACCCAAACAATCCGCCAACATGTCCATATGTGTCA
CAATTATAACAAAACAATAATGTCAAGTTTCATCAAATACTAGCTCACAATTTATCAACAAGGTGCACAAGGACATGATAACAATA
AAAATGTGGATGGGTATTCAACATATAAAGCATGACTACGACTAATTCAATTGAAAAGATTATGTTCATGTAGTCACAAAGTGATT
AAGTATGTTTCATGTAGAGGACATTTCCAAATTAAGGCATATTAATAGCCTAAGGTCTAATCTAGTCATAAGCCGTATATAACGCC
CATGTACACGCTCGTCACCTCATGTACACGTCGCTTTTCACATAACACGAATAATAATTAAGGACAAATCATAAGGGGTATTCCCC
CACCCCACAAGATTAGGCAAGATACTTACCTCAAATAAGGCAAATCAATACTTTAAAAAGCCCTTGCCTATCGAATCGGCCTCCGA
AAGGGTCAAATATAGCCTAAAAACAACTCAATAATATCAAATACGACTATAGAAATTGATTTCAAGTAAGAAAGCTCTGATCTTTA
TCAAATATCAAAAATTCACTCCGAACTCGCCTCCCGGAACCCGATAAAATTTACAAATCTCGAGTACCCATTCGAATACGAGTTCA
AATGTGCAAGTTTTATCCAAATTGGACTCCGAATCGGGGTTCAAATCTCTATTTTTTATTTTAGAATAGTTTTTTCCAAAATTCCC
AATTTTCTCACTTTGATTAACCAATAAAAAGCCAAATTCAAGATGGAATCATGAACAATAATCAAATCCGAGTAAAGAACACTTAC
CCAATCCAAGTGGGTGAAAATCGCCTAAAGGATTTCCTCAATTCGAGCTTTAAATCTCAAAATATGATAAAATAAGTCAAACCTTC
AATTAAAATACTCTACTCAGTGATTTTCGCTTCTGCGTACCATCCCATCGCATCTGCAATGCCGCTTTTGTGAGCCCACTCTCGCA
TATGCGAAGTTCAGTGGCTCCCCGATCCTCTGCTTCTCTGATACTATTCTCGCTTCTACGGAGTCGCTTCTGCACCCAAACTAGCA
TACCTGCGCCCAAAGTTCCGTACCTACGGACAATGCTGCCTTCCTCTTCCCTTCGCATCTGTAGCCCTTTTGTCTGCATCTGCAGA
CTCAAACTCGCTAGTGCGAGAACACTAGAATCTGAAGTGCTACCATAATATCAAAATAATCCAAAACACACCCGAGGCCTCGGGAC
CCCATGTAATCATACCAATCAATCCAAAAATATAACACGGACCTACTCGAGTCCGCAAATCACATAGAATAACATCAAAACCATAA
ATCACACATCAATTCAAGTTTAATGAACTAACTAACTTCCAAACTTTCAACACTCACGCCAAAACATATCTAAACTACTTAGAATG
ACCTTAAATTTCACACACAAGTCTCAAATTACATAATTAACCTATTCCAACTTTCAGAATAACAATCCAGACCCGACAGCCTCAAT
GTCAACTCCCGGTAAAACCTATGAACCTTCCAAACCTTTAAATTTCCAACATTCGCCAAATAGAGCCAAATAAACCTAGGAACCTC
CAAATCTAAATCCGGACATACGCCTAAGTCTAAAATCACAATACAAATCTATTGGAACCATCAAAATACCATTCCAGAATCATTTT
ATATAAAAGTCAAACATCGGTCAACTCCTATAACTTAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGTACCGAGCT
CGAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAA
CTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCG
CAGCTGAATGGCGAATGGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGTGGTATTTCACACCGCATATGGTGCACTCTCAG
TACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCCGACACCCCGCCAACACCCGCTGACGCGAACCCCTTGCGGCCGCATCG
AATATAACTTCGTATAATGT

SEQ ID NO:8 (Secuencia promotora usada para impulsar la expresión específica del tricoma. Este promotor se aisló de *Nicotinia tabacum* y se encuentra ubicado 1,5 kb aguas arriba del gen que codifica para la copalil-sintasa implicada en la síntesis de *cis*-abienol).

agcttctgcaaatctcccaacattatcaccttctgccgcctctgaaagcaagtagctaagcattaattaagaatgaccacacaaaa
taaatagtagtagtaaagtagccgaactacatataattagacccatcatataggttttctagccaatacttttccaattaagatta
ggtttccttttaaaaatttgcacaattcttagagagatatctaatagtgcaaaacacagaaatatatatccaaactacctttttct
ctctccttaaacattttatttaactaacacggcactagttgaaacaatcaggggatatttgtaaaggtaataaatgactggttgat
ttttaaacgttagatatgttgaaataaattcaatttgaaaaaacgactaataattaaagctggaacgctacgtattcaacactaag
aaaatataatgtgctatttgacaatatatgaagtcaagaaataagaactggcattatatatgttttcaagtaggtttaggctatgg
caaaatactaataagcaagcacttaattttgcggtacaaaataaagttttgtattgttaaataagaagatatatcacgtaacaaaa
tagagagtattgcctatagttaatttgcatcgctcgtcctttgtgagcatttcaataggcttatgatcacacataaatttgtgtgt
gaattgctttagaaaaattacataatttgaatttgaggtcttaatatgtgttcaatccagaggagtaggcaccttagctcgagcga
tatcgcgtgacaccgcttcgacaacatatttcataaatatgtatgtataaatattaagaaaaataaaaatattgagtataaatata
aaagatgacattgcacttctttaaatattgataccgcttacaaaacttctttgcgcgcacgccattgattcaatctatcatagttc
ttgtaaatgttatttcagatctttaatttaaaatattttaataaagtcaatcatttttaacatctagatttctcgtttttacttt

tgtttattatatcacattttggacatagcactaagtcggtataactaattgtgacttgtgcaagttaagaaaatacaatgcaatgc
tgctgaaacaacagagcaactcgtttccagtaaaaatctaaagtttactactttcacaaaaactaataaaagttttagagtgcgtt
tgacaatttatttcatgcaaagattcgagaacaatcaacacagaattaggctgaagtgtctaagagaatttaatatttgcccttca
tcaagaggcaatatataaataagcctgcgccattgcaacaactcaaaccatttccaatattgcctcacaagtcagtagtgcctttc
ctctctcaaacgttcattgtctttatctcccttccccaattctcattggaagaataaaacaaaaattaaattagaaaatg

SEC ID NO:9 (constructo sintético usado para activar la supresión de la expresión del gen NtIPMS2 a través del mecanismo de ARNi. Compuesto por un fragmento del primer intrón de NtIPMS2 más el primer exón, el fragmento del primer intrón se repite de forma invertida tras el exón. La traducción y el corte y empalme de este constructo da como resultado teóricamente un ARN bicatenario en estructura de horquilla).

gctaagcttgtcgaccatggaaattctctgaccctgattatgttggtatttttgacaccagtcttcgcgatggcgaacaggccgct
ggtgctaccatgactagtaaagaaaaactggacattgcacgtcagttggctaagcttggtgttgatgttattgaggccggttttcc
ttttgcctctgaagctgagttcgagcttgtaaagttgatagcacaggaaattggtaa*cctttaatgtttaaccgttcacatttcta*
atatttacttatttgtaacatgtcgtcacgtgttagtttcattctttttatgaaccaaacatgcatgcaaagatatttttagatat
ttggacggcgagtgagatttgaaactaggaccgtttgcctgatacaatattaaaatatgtaaccattttatgtacaagtttaaact
*gttgatagtagcatatttttacttttatttaagtatactatattccaacag*gtaaGTTAACcaatttcctgtgctatcaacttta
caagctcgaactcagcttcagaggcaaaaggaaaaccggcctcaataacatcaacaccaagcttagccaactgacgtgcaatgtcc
agtttttctttactagtcatggtagcaccagcggcctgttcgccatcgcgaagactggtgtcaaaaataccaacataatcagggtc
agagaatttggcgcgccaattgacc

En negritas y subrayado: exón 1,21-229
Negrita: borde del corte y empalme
Cursiva: sitio del corte y empalme
Cursiva y subrayado: intrón 1

SEQ ID NO:10 (secuencia de nucleótidos de NtIPMS1A)

ATGTCTTCTCTCTGTTCAAACTCTGCAACTTCTCTTAGTTGTAATAACTCCTTCCAATCCAAAAATCCTCTTCTTCACACCATCTT
TAACTTCTTTCCTTCAATCAAACCACACTCTTGTTTCCCATATACAGTTATCCGGTGCTCAATTCAAAAGCGACCTGAATATATAC
CGAGTAAAATCTCCGACCACAAATACGTACGCATTTTCGACACGACTCTCCGCGATGGAGAGCAATCCCCGGGCGCTACGATGACT
ACGAAAGAAAAATTAGATGTTGCCCGTAAATTAGCGAAACTCGGAGTTGACATAATCGAAGCTGGGTTTCCAGCTTCATCTGAAGC
TGATTTTGAAGCTGTGAGATTAATAGCAGAGGAAATTGGTAATAATAGCGACGGTGATTATGTGCCGGTGATTTGTGGATTAGCGA
GGTGCAATAAGAGGGATATTGATAAAGCGTGGGAAGCTGTGAAGTGTGCGAAGAGACCTAGGGTTCATACGTTTATAGCGACGAGT
GAGATACATATGAAGTATAAGTTGAAGATGAGTAAAGAAGAAGTAGTGGAGAAAGCGCGGAGTATGGTTGCTTATGCGAGGAGTTT
GGGATGTGAGGATGTTGAATTTAGCCCTGAAGATGCTGGAAGGTCTGAGCGTGAGTTCCTTTACCATATCCTTGGAGAAGTTATCA
AAGCTGGTGCAACAACCCTTAACATACCTGATACTGTTGGATACACTGTGCCCACTGAATTTGGACAATTAATTGCtgacataaaa
gccaataccccaggaattgaaaatgtgatcatttctacacactgccagaatgatcttggactttctactgccaacactttagctgg
agcttgtgcaggggcaagacaagtagaagtgaccatcaatggcattggtgaaagagctggaaatgcttctctggaggaggttgtaa
tggccttaaaatgtcgtggagagcaagtactaggtggcctgtatacaggaattaatacacaacatatactcatgtcaagcaagatg
gtagaggagtacaccgggcttcatgtgcagccacacaaggccattgttggagctaatgcttttgctcatgaaagtggcatccatca
gGATGGAATGTTAAAACACAAAGATACATATGAGATTATATCTCCTGAAGATATTGGGCTTAGTCGTGCTAATGAAGCCGGTATTG
TCCTTGGGAAGCTCAGTGGGCGCCATGCATTGAAATCCAAAATGCTTGAGCTTGGATATGACATTGAGGGAAAAGAACTGGAGGAC
CTCTTCTGGCGATTTAAGTCGGTGGCTGAGAAGAAAAAGAAAATTACAGATGATGACATAATAGCACTGATGTCAGATGAAGTTTT
CCAGCCTCAAGTTGTTTGGCAACTTGCAGATGTACAGATTGCCTGTGGAAGTCTTGGCCTCTCTACAGCAACTGTTAAGCTTATTG
ACAGTGATGGTCAAGAGCATGTTGCTTGTTCTGTTGGAACCGGACCAGTTGATGCAGCTTATAAGGCAGTTGACCTCATTGTAAAG
GTACCTATAACACTCCTCGAGTATTCCATGAATGCAGTCACAGAAGGTATAGATGCCATAGCCTCAACCAGAGTATTAATCCGCGG
GGAGGATGACCATGCTATAACCAATGGTTCAATTGGACCGACTCATCACCGTATATTTAGTGGAACTGGAGCTGATATGGACGTTG
TCATCTCTAGTGTCCGAGCCTATATTGGTGCATTGAACAAAATGTTGAGTTTCGGGAAGCTGGTTTCGAGGTACAAGAAGCCTGAA
GGTAGTGTGGTAGTATAA

SEQ ID NO:11 (secuencia de aminoácidos de NtIPMS1A)

MSSLCSNSATSLSCNNSFQSKNPLLHTIFNFFPSIKPHSCFPYTVIRCSIQKRPEYIPSKISDHKYVRIFDTTLRDGEQSPGATMT
TKEKLDVARKLAKLGVDIIEAGFPASSEADFEAVRLIAEEIGNNSDGDYVPVICGLARCNKRDIDKAWEAVKCAKRPRVHTFIATS
EIHMKYKLKMSKEEVVEKARSMVAYARSLGCEDVEFSPEDAGRSEREFLYHILGEVIKAGATTLNIPDTVGYTVPTEFGQLIADIK
ANTPGIENVIISTHCQNDLGLSTANTLAGACAGARQVEVTINGIGERAGNASLEEVVMALKCRGEQVLGGLYTGINTQHILMSSKM
VEEYTGLHVQPHKAIVGANAFAHESGIHQDGMLKHKDTYEIISPEDIGLSRANEAGIVLGKLSGRHALKSKMLELGYDIEGKELED
LFWRFKSVAEKKKKITDDDIIALMSDEVFQPQVVWQLADVQIACGSLGLSTATVKLIDSDGQEHVACSVGTGPVDAAYKAVDLIVK
VPITLLEYSMNAVTEGIDAIASTRVLIRGEDDHAITNGSIGPTHHRIFSGTGADMDVVISSVRAYIGALNKMLSFGKLVSRYKKPE
GSVVV

SEQ ID NO:12 (secuencia de nucleótidos de NtIPMS1Bv1)

ATGGCGTCTATCACCATAAACCATTCATTTTCCCGTAACCCTAACATCTCATTCCATCCCCAAAATCCTCTCATTCAAACCCAAGC
TCTCTTCAATTTCAAACCATCAATCTCCAAATGTTCCCCTATTATCCACTGCGCAATCCGCCGTCGACCCGAATATACCCCGAGCC

ACATTCCCGACCCGAACTACATTCGCATCTTCGACACCACTCTCCGCGACGGCGAACAATCCCCAGGCGCCACAATGACCACAAAA
GAAAAACTCGACGTTGCGCGTCAGTTAGCTAAGCTTGGTGTTGACATAATTGAAGCCGGTTTTCCTGCTTCTTCTGAAGCTGATCT
CGAAGCTGTGAAATTAATAGCGAAGGAAGTTGGAAATGGTGTGAATGAAGAGGGACATGTTCCGGTAATTTGTGGACTTGCGAGGT
GTAATAAGAGGGATATTGATAAGGCTTGGGAGGCTGTGAAGTATGCGAAAAAACCGAGGATTCATACGTTTATTGCGACTAGTGAG
ATACATATGAAGTTTAAGTTGAAGATGAGTAGAGATGAAGTTGTGGAGAAAGCTAGGAGTATGGTTGCTTATGCTAGGAGTATTGG
TTGTGAGGATGTTGAATTTAGCCCAGAAGATGCTGGAAGATCCGATCCAGAGTTCCTCTATCATATCCTTGGAGAGGTCATCAAAG
CTGGGGCAACAACCCTTAACATCCCTGATACTGTTGGATACACTGTTCCCAGCGAATTTGGAAAATTGATTGCTGATATAAAGGCC
AATACCCCAGGAATTGGAGATGTGATCATCTCAACACACTGCCAGAACGATCTTGGGCTTTCTACTGCCAACACCTTAGCTGGAGC
ATGCGCAGGTGCAAGACAAGTAGAAGTGACCATCAACGGAATCGGTGAAAGAGCTGGAAATGCTTCTTTGGAGGAGGTTGTAATGG
CCTTAAAATGTCGTGGAGAGCAAGTACTAGGTGGCCTGTATACAGGAATTAATACACAACATATACTCATGTCAAGCAAGATGGTA
GAGGAGTACACCGGGCTTCATGTGCAGCCACACAAGGCCATTGTTGGAGCTAATGCGTTTGCTCATGAAAGTGGCATCCATCAGGA
TGGAATGTTAAAACACAAAGATACATATGAGATTATATCTCCTGAAGATATTGGGCTTAACCGAGTTAATGAATCTGGCATCGTCC
TTGGGAAACTCAGTGGGCGTCATGCTTTGCAAGCCAAAATGCTCGAGCTTGGATACGATATTGAGGGAAAAGAACTTGAGGACCTC
TTTTGGCGATTCAAATCTGTGGCCGAGAAGAAAAAGAAAATTACAGATGATGACCTGATAGCATTAATGTCAGATGAAGTTTTCCA
GCCTCAATTTGTTTGGCAACTTGAAAATGTACAGGTTACATGTGGAAGTCTTGGCCTTTCTACGGCAACTGTTAAGCTCATTGACG
CTGATGGTCAAGAGCATGTTTCTTGTTCTGTTGGAACGGGGCCAGTTGATGCGGCTTATAAGGCAGTTGATCTCATTGTAAAGGTA
CCTGTAGCACTCCTTGAATATTCCTTGAATGCAGTCACGGAAGGTATAGATGCCATAGCTTCAACCAGAGTTTTAATTCGTGGGGA
GAATGGCCATACATCAACCCATGCTTTAACTGGAGAGACTGTACACCGTTCTTTTAGTGGAACCGGAGCAGATATGGATATTGTTA
TCTCCAGTGTCCGAGCCTATATTGGTGCATTGAATAAGATGTTGAGTTTCAGAAAGCTGGTATCGAAACACAGCAAACCTGAAGGC
AGTGCAGTCGTATAG

SEQ ID NO:13 (secuencia de aminoácidos de NtIPMS1Bv1)

MASITINHSFSRNPNISFHPQNPLIQTQALFNFKPSISKCSPIIHCAIRRRPEYTPSHIPDPNYIRIFDTTLRDGEQSPGATMTTK
EKLDVARQLAKLGVDIIEAGFPASSEADLEAVKLIAKEVGNGVNEEGHVPVICGLARCNKRDIDKAWEAVKYAKKPRIHTFIATSE
IHMKFKLKMSRDEVVEKARSMVAYARSIGCEDVEFSPEDAGRSDPEFLYHILGEVIKAGATTLNIPDTVGYTVPSEFGKLIADIKA
NTPGIGDVIISTHCQNDLGLSTANTLAGACAGARQVEVTINGIGERAGNASLEEVVMALKCRGEQVLGGLYTGINTQHILMSSKMV
EEYTGLHVQPHKAIVGANAFAHESGIHQDGMLKHKDTYEIISPEDIGLNRVNESGIVLGKLSGRHALQAKMLELGYDIEGKELEDL
FWRFKSVAEKKKKITDDDLIALMSDEVFQPQFVWQLENVQVTCGSLGLSTATVKLIDADGQEHVSCSVGTGPVDAAYKAVDLIVKV
PVALLEYSLNAVTEGIDAIASTRVLIRGENGHTSTHALTGETVHRSFSGTGADMDIVISSVRAYIGALNKMLSFRKLVSKHSKPEG
SAVV

SEQ ID NO:14 (secuencia de nucleótidos de NtIPMS1Bv2)

ATGGCGTCTATCACCGCAAACCATACATTTTCCCGTAACCCTAACATCTCATTGCATCCCCAAAATCCTCTCATTCAAACCCAAGC
TCTCTTCAACTTCAAATCATCAATCCCCAAATGTTCCCCTATTATCTGCTGCGCAATCCGCCGTCGACCCGACTATACCCCGAGCC
ACATTCCCGACCCGAAATACATCCGCATCTTCGACACCACTCTCCGCGACGGCGAACAATCTCCAGGCGCCACAATGACCACAAAA
GAAAAACTCGACGTTGCGCGTCAGTTAGCTAAGCTTGGTGTTGACATAATTGAAGCCGGTTTTCCTGCTTCTTCTGAAGCTGATCT
CGAAGCTGTGAAATTAATAGCGAAGGAAGTTGGAAATGGTGTGTATGAAGAGGGACATGTTCCGGTAATCTGTGGACTTGCGAGGT
GTAATAAGAGGGATATTGATAAGGCTTGGGAGGCTGTGAAGTATGCGAAAAAACCGAGGATTCATACGTTTATTGCGACTAGTGAG
ATACATATGAAGTTTAAGTTGAAGATGAGTAGAGATGAAGTTGTGGAGAAAGCTAGAAGTATGGTTGCTTATGCTAGGAGTATTGG
TTGTGAGGATGTTGAATTTAGCCCTGAAGATGCTGGAAGATCTGATCCTGAGTTCCTCTATCATATCCTTGGAGAGGTCATCAAAG
CTGGGGCAACAACCCTTAACATCCCTGATACTGTTGGATACACTGTTCCCAGTGAATTTGGAAAATTGATCGCTGATATAAAGGCC
AATACCCCAGGAATTGGAGATGTGATCATCTCAACGCACTGCCAGAACGATCTTGGGCTTTCTACTGCCAACACCTTAGCTGGAGC
ATGTGCAGGTGCAAGACAAGTAGAAGTGACCATCAATGGAATCGGTGAAAGAGCTGGAAATGCTTCTTTGGAGGAGGTTGTAATGG
CCTTAAAATGTCGTGGAGAGCAAGTACTAGGTGGCCTGTATACAGGAATTAATACACAACATATACTCATGTCAAGCAAGATGGTA
GAGGAGTACACCGGGCTTCATGTGCAGCCACACAAGGCCATTGTTGGAGCTAATGCTTTTGCTCATGAAAGTGGCATCCATCAGGA
TGGAATGTTAAAACACAAAGATACATATGAGATTATATCTCCTGAAGATATTGGGCTTAACCGAGCTAATGAATCTGGTATCGTCC
TCGGGAAACTCAGTGGGCGTCATGCTTTGCAAGCCAAAATGCTCGAGCTTGGATACGATATTGAGGGAAAAGAACTTGAGGACCTC
TTTTGGCGATTCAAATCTGTGGCTGAGAAGAAAAAGAAAATTACAGATGATGACCTGATAGCATTGATGTCAGATGAAGTTTTCCA
GCCTCAATTTGTTTGGCAACTCGAAAATGTACAGGTTACATGTGGAAGTCTTGGCCTTTCTACGGCAACTGTTAAGCTCATTGACG
CTGATGGTCAAGAGCATGTTTCTTGTTCTGTTGGAACGGGGCCAGTTGATGCGGCTTACAAGGCAGTTGATCTCATTGTAAAGGTA
CCTGTAGCACTACTTGAATATTCCTTGAATGCAGTCACGGAAGGTATAGATGCCATAGCTTCAACCAGAGTTTTAATTCGTGGGGA
GAATGGACATACATCAACCCATGCTTTAACTGGAGAGACTGTACACCGTTCGTTTAGTGGAACCGGAGCAGATATGGATATTGTTA
TCTCTAGTGTCCGAGCCTATATTGGAGCATTGAATAAGATGCTGAGTTTCAGAAAGCTGGTGTCGAAACACAGCAGACCTGAAGGC
AGTGCAGTCGTATAG

SEQ ID NO:15 (secuencia de aminoácidos de NtIPMS1Bv2)

MASITANHTFSRNPNISLHPQNPLIQTQALFNFKSSIPKCSPIICCAIRRRPDYTPSHIPDPKYIRIFDTTLRDGEQSPGATMTTK
EKLDVARQLAKLGVDIIEAGFPASSEADLEAVKLIAKEVGNGVYEEGHVPVICGLARCNKRDIDKAWEAVKYAKKPRIHTFIATSE
IHMKFKLKMSRDEVVEKARSMVAYARSIGCEDVEFSPEDAGRSDPEFLYHILGEVIKAGATTLNIPDTVGYTVPSEFGKLIADIKA
NTPGIGDVIISTHCQNDLGLSTANTLAGACAGARQVEVTINGIGERAGNASLEEVVMALKCRGEQVLGGLYTGINTQHILMSSKMV
EEYTGLHVQPHKAIVGANAFAHESGIHQDGMLKHKDTYEIISPEDIGLNRANESGIVLGKLSGRHALQAKMLELGYDIEGKELEDL
FWRFKSVAEKKKKITDDDLIALMSDEVFQPQFVWQLENVQVTCGSLGLSTATVKLIDADGQEHVSCSVGTGPVDAAYKAVDLIVKV
PVALLEYSLNAVTEGIDAIASTRVLIRGENGHTSTHALTGETVHRSFSGTGADMDIVISSVRAYIGALNKMLSFRKLVSKHSRPEG
SAVV

TABLA 1

Estructura de los ésteres de sacarosa. La estructura general del éster de sacarosa se muestra en la Figura 5 y se describen las diversas combinaciones de grupos R1, R2, R3, R4 y R5.

R5	R3	R1	R2	R4	Nombre
-	C2	C4i	C4i	C4i	C2C12
-	C2	C4i	C4i	C5ai	C2C13
-	C2	C4i	C4i	C5i	C2C13
-	C2	C4i	C4i	C6ai	C2C14
-	C2	C4i	C4i	C6i	C2C14
-	C2	C4i	C5ai	C4i	C2C13
-	C2	C4i	C5ai	C5ai	C2C14
-	C2	C4i	C5ai	C5i	C2C14
-	C2	C4i	C5ai	C6ai	C2C15
-	C2	C4i	C5ai	C6i	C2C15
-	C2	C4i	C5i	C4i	C2C13
-	C2	C4i	C5i	C5ai	C2C14
-	C2	C4i	C5i	C5i	C2C14
-	C2	C4i	C5i	C6ai	C2C15
-	C2	C4i	C5i	C6i	C2C15
-	C2	C4i	C6ai	C4i	C2C14
-	C2	C4i	C6ai	C5ai	C2C15
-	C2	C4i	C6ai	C5i	C2C15
-	C2	C4i	C6ai	C6ai	C2C16
-	C2	C4i	C6ai	C6i	C2C16
-	C2	C4i	C6i	C4i	C2C14
-	C2	C4i	C6i	C5ai	C2C15
-	C2	C4i	C6i	C5i	C2C15
-	C2	C4i	C6i	C6ai	C2C16
-	C2	C4i	C6i	C6i	C2C16
-	-	C4i	C4i	C4i	C12
-	-	C4i	C4i	C5ai	C13
-	-	C4i	C4i	C5i	C13
-	-	C4i	C4i	C6ai	C14
-	-	C4i	C4i	C6i	C14
-	-	C4i	C5ai	C4i	C13
-	-	C4i	C5ai	C5ai	C14
-	-	C4i	C5ai	C5i	C14
-	-	C4i	C5ai	C6ai	C15
-	-	C4i	C5ai	C6i	C15
-	-	C4i	C5i	C4i	C13
-	-	C4i	C5i	C5ai	C14
-	-	C4i	C5i	C5i	C14
-	-	C4i	C5i	C6ai	C15
-	-	C4i	C5i	C6i	C15
-	-	C4i	C6ai	C4i	C14
-	-	C4i	C6ai	C5ai	C15
-	-	C4i	C6ai	C5i	C15
-	-	C4i	C6ai	C6ai	C16
-	-	C4i	C6ai	C6i	C16
-	-	C4i	C6i	C4i	C14
-	-	C4i	C6i	C5ai	C15
-	-	C4i	C6i	C5i	C15
-	-	C4i	C6i	C6ai	C16
-	-	C4i	C6i	C6i	C16
C2	-	C4i	C4i	C4i	C12C2
C2	-	C4i	C4i	C5ai	C13C2
C2	-	C4i	C4i	C5i	C13C2
C2	-	C4i	C4i	C6ai	C14C2
C2	-	C4i	C4i	C6i	C14C2
C2	-	C4i	C5ai	C4i	C13C2
C2	-	C4i	C5ai	C5ai	C14C2
C2	-	C4i	C5ai	C5i	C14C2
C2	-	C4i	C5ai	C6ai	C15C2
C2	-	C4i	C5ai	C6i	C15C2

C2	-	C4i	C5i	C4i	C13C2
C2	-	C4i	C5i	C5ai	C14C2
C2	-	C4i	C5i	C5i	C14C2
C2	-	C4i	C5i	C6ai	C15C2
C2	-	C4i	C5i	C6i	C15C2
C2	-	C4i	C6ai	C4i	C14C2
C2	-	C4i	C6ai	C5ai	C15C2
C2	-	C4i	C6ai	C5i	C15C2
C2	-	C4i	C6ai	C6ai	C16C2
C2	-	C4i	C6ai	C6i	C16C2
C2	-	C4i	C6i	C4i	C14C2
C2	-	C4i	C6i	C5ai	C15C2
C2	-	C4i	C6i	C5i	C15C2
C2	-	C4i	C6i	C6ai	C16C2
C2	-	C4i	C6i	C6i	C16C2
C2	C2	C4i	C4i	C4i	C2C12C2
C2	C2	C4i	C4i	C5ai	C2C13C2
C2	C2	C4i	C4i	C5i	C2C13C2
C2	C2	C4i	C4i	C6ai	C2C14C2
C2	C2	C4i	C4i	C6i	C2C14C2
C2	C2	C4i	C5ai	C4i	C2C13C2
C2	C2	C4i	C5ai	C5ai	C2C14C2
C2	C2	C4i	C5ai	C5i	C2C14C2
C2	C2	C4i	C5ai	C6ai	C2C15C2
C2	C2	C4i	C5ai	C6i	C2C15C2
C2	C2	C4i	C5i	C4i	C2C13C2
C2	C2	C4i	C5i	C5ai	C2C14C2
C2	C2	C4i	C5i	C5i	C2C14C2
C2	C2	C4i	C5i	C6ai	C2C15C2
C2	C2	C4i	C5i	C6i	C2C15C2
C2	C2	C4i	C6ai	C4i	C2C14C2
C2	C2	C4i	C6ai	C5ai	C2C15C2
C2	C2	C4i	C6ai	C5i	C2C15C2
C2	C2	C4i	C6ai	C6ai	C2C16C2
C2	C2	C4i	C6ai	C6i	C2C16C2
C2	C2	C4i	C6i	C4i	C2C14C2
C2	C2	C4i	C6i	C5ai	C2C15C2
C2	C2	C4i	C6i	C5i	C2C15C2
C2	C2	C4i	C6i	C6ai	C2C16C2
C2	C2	C4i	C6i	C6i	C2C16C2
-	C2	C5ai	C4i	C4i	C2C13
-	C2	C5ai	C4i	C5ai	C2C14
-	C2	C5ai	C4i	C5i	C2C14
-	C2	C5ai	C4i	C6ai	C2C15
-	C2	C5ai	C4i	C6i	C2C15
-	C2	C5ai	C5ai	C4i	C2C14
-	C2	C5ai	C5ai	C5ai	C2C15
-	C2	C5ai	C5ai	C5i	C2C15
-	C2	C5ai	C5ai	C6ai	C2C16
-	C2	C5ai	C5ai	C6i	C2C16
-	C2	C5ai	C5i	C4i	C2C14
-	C2	C5ai	C5i	C5ai	C2C15
-	C2	C5ai	C5i	C5i	C2C15
-	C2	C5ai	C5i	C6ai	C2C16
-	C2	C5ai	C5i	C6i	C2C16
-	C2	C5ai	C6ai	C4i	C2C15
-	C2	C5ai	C6ai	C5ai	C2C16
-	C2	C5ai	C6ai	C5i	C2C16
-	C2	C5ai	C6ai	C6ai	C2C17
-	C2	C5ai	C6ai	C6i	C2C17
-	C2	C5ai	C6i	C4i	C2C15
-	C2	C5ai	C6i	C5ai	C2C16
-	C2	C5ai	C6i	C5i	C2C16
-	C2	C5ai	C6i	C6ai	C2C17
-	C2	C5ai	C6i	C6i	C2C17
-	-	C5ai	C4i	C4i	C13

	-	-	C5ai	C4i	C5ai	C14
	-	-	C5ai	C4i	C5i	C14
	-	-	C5ai	C4i	C6ai	C15
	-	-	C5ai	C4i	C6i	C15
	-	-	C5ai	C5ai	C4i	C14
	-	-	C5ai	C5ai	C5ai	C15
	-	-	C5ai	C5ai	C5i	C15
	-	-	C5ai	C5ai	C6ai	C16
	-	-	C5ai	C5ai	C6i	C16
	-	-	C5ai	C5i	C4i	C14
	-	-	C5ai	C5i	C5ai	C15
	-	-	C5ai	C5i	C5i	C15
	-	-	C5ai	C5i	C6ai	C16
	-	-	C5ai	C5i	C6i	C16
	-	-	C5ai	C6ai	C4i	C15
	-	-	C5ai	C6ai	C5ai	C16
	-	-	C5ai	C6ai	C5i	C16
	-	-	C5ai	C6ai	C6ai	C17
	-	-	C5ai	C6ai	C6i	C17
	-	-	C5ai	C6i	C4i	C15
	-	-	C5ai	C6i	C5ai	C16
	-	-	C5ai	C6i	C5i	C16
	-	-	C5ai	C6i	C6ai	C17
	-	-	C5ai	C6i	C6i	C17
	C2	-	C5ai	C4i	C4i	C13C2
	C2	-	C5ai	C4i	C5ai	C14C2
	C2	-	C5ai	C4i	C5i	C14C2
	C2	-	C5ai	C4i	C6ai	C15C2
	C2	-	C5ai	C4i	C6i	C15C2
	C2	-	C5ai	C5ai	C4i	C14C2
	C2	-	C5ai	C5ai	C5ai	C15C2
	C2	-	C5ai	C5ai	C5i	C15C2
	C2	-	C5ai	C5ai	C6ai	C16C2
	C2	-	C5ai	C5ai	C6i	C16C2
	C2	-	C5ai	C5i	C4i	C14C2
	C2	-	C5ai	C5i	C5ai	C15C2
	C2	-	C5ai	C5i	C5i	C15C2
	C2	-	C5ai	C5i	C6ai	C16C2
	C2	-	C5ai	C5i	C6i	C16C2
	C2	-	C5ai	C6ai	C4i	C15C2
	C2	-	C5ai	C6ai	C5ai	C16C2
	C2	-	C5ai	C6ai	C5i	C16C2
	C2	-	C5ai	C6ai	C6ai	C17C2
	C2	-	C5ai	C6ai	C6i	C17C2
	C2	-	C5ai	C6i	C4i	C15C2
	C2	-	C5ai	C6i	C5ai	C16C2
	C2	-	C5ai	C6i	C5i	C16C2
	C2	-	C5ai	C6i	C6ai	C17C2
	C2	-	C5ai	C6i	C6i	C17C2
	C2	C2	C5ai	C4i	C4i	C2C13C2
	C2	C2	C5ai	C4i	C5ai	C2C14C2
	C2	C2	C5ai	C4i	C5i	C2C14C2
	C2	C2	C5ai	C4i	C6ai	C2C15C2
	C2	C2	C5ai	C4i	C6i	C2C15C2
	C2	C2	C5ai	C5ai	C4i	C2C14C2
	C2	C2	C5ai	C5ai	C5ai	C2C15C2
	C2	C2	C5ai	C5ai	C5i	C2C15C2
	C2	C2	C5ai	C5ai	C6ai	C2C16C2
	C2	C2	C5ai	C5ai	C6i	C2C16C2
	C2	C2	C5ai	C5i	C4i	C2C14C2
	C2	C2	C5ai	C5i	C5ai	C2C15C2
	C2	C2	C5ai	C5i	C5i	C2C15C2
	C2	C2	C5ai	C5i	C6ai	C2C16C2
	C2	C2	C5ai	C5i	C6i	C2C16C2
	C2	C2	C5ai	C6ai	C4i	C2C15C2
	C2	C2	C5ai	C6ai	C5ai	C2C16C2

	C2	C2	C5ai	C6ai	C5i	C2C16C2
	C2	C2	C5ai	C6ai	C6ai	C2C17C2
	C2	C2	C5ai	C6ai	C6i	C2C17C2
	C2	C2	C5ai	C6i	C4i	C2C15C2
	C2	C2	C5ai	C6i	C5ai	C2C16C2
	C2	C2	C5ai	C6i	C5i	C2C16C2
	C2	C2	C5ai	C6i	C6ai	C2C17C2
	C2	C2	C5ai	C6i	C6i	C2C17C2
	-	C2	C5i	C4i	C4i	C2C13
	-	C2	C5i	C4i	C5ai	C2C14
	-	C2	C5i	C4i	C5i	C2C14
	-	C2	C5i	C4i	C6ai	C2C15
	-	C2	C5i	C4i	C6i	C2C15
	-	C2	C5i	C5ai	C4i	C2C14
	-	C2	C5i	C5ai	C5ai	C2C15
	-	C2	C5i	C5ai	C5i	C2C15
	-	C2	C5i	C5ai	C6ai	C2C16
	-	C2	C5i	C5ai	C6i	C2C16
	-	C2	C5i	C5i	C4i	C2C14
	-	C2	C5i	C5i	C5ai	C2C15
	-	C2	C5i	C5i	C5i	C2C15
	-	C2	C5i	C5i	C6ai	C2C16
	-	C2	C5i	C5i	C6i	C2C16
	-	C2	C5i	C6ai	C4i	C2C15
	-	C2	C5i	C6ai	C5ai	C2C16
	-	C2	C5i	C6ai	C5i	C2C16
	-	C2	C5i	C6ai	C6ai	C2C17
	-	C2	C5i	C6ai	C6i	C2C17
	-	C2	C5i	C6i	C4i	C2C15
	-	C2	C5i	C6i	C5ai	C2C16
	-	C2	C5i	C6i	C5i	C2C16
	-	C2	C5i	C6i	C6ai	C2C17
	-	C2	C5i	C6i	C6i	C2C17
	-	-	C5i	C4i	C4i	C13
	-	-	C5i	C4i	C5ai	C14
	-	-	C5i	C4i	C5i	C14
	-	-	C5i	C4i	C6ai	C15
	-	-	C5i	C4i	C6i	C15
	-	-	C5i	C5ai	C4i	C14
	-	-	C5i	C5ai	C5ai	C15
	-	-	C5i	C5ai	C5i	C15
	-	-	C5i	C5ai	C6ai	C16
	-	-	C5i	C5ai	C6i	C16
	-	-	C5i	C5i	C4i	C14
	-	-	C5i	C5i	C5ai	C15
	-	-	C5i	C5i	C5i	C15
	-	-	C5i	C5i	C6ai	C16
	-	-	C5i	C5i	C6i	C16
	-	-	C5i	C6ai	C4i	C15
	-	-	C5i	C6ai	C5ai	C16
	-	-	C5i	C6ai	C5i	C16
	-	-	C5i	C6ai	C6ai	C17
	-	-	C5i	C6ai	C6i	C17
	-	-	C5i	C6i	C4i	C15
	-	-	C5i	C6i	C5ai	C16
	-	-	C5i	C6i	C5i	C16
	-	-	C5i	C6i	C6ai	C17
	-	-	C5i	C6i	C6i	C17
	C2	-	C5i	C4i	C4i	C13C2
	C2	-	C5i	C4i	C5ai	C14C2
	C2	-	C5i	C4i	C5i	C14C2
	C2	-	C5i	C4i	C6ai	C15C2
	C2	-	C5i	C4i	C6i	C15C2
	C2	-	C5i	C5ai	C4i	C14C2
	C2	-	C5i	C5ai	C5ai	C15C2
	C2	-	C5i	C5ai	C5i	C15C2

C2	-	C5i	C5ai	C6ai	C16C2
C2	-	C5i	C5ai	C6i	C16C2
C2	-	C5i	C5i	C4i	C14C2
C2	-	C5i	C5i	C5ai	C15C2
C2	-	C5i	C5i	C5i	C15C2
C2	-	C5i	C5i	C6ai	C16C2
C2	-	C5i	C5i	C6i	C16C2
C2	-	C5i	C6ai	C4i	C15C2
C2	-	C5i	C6ai	C5ai	C16C2
C2	-	C5i	C6ai	C5i	C16C2
C2	-	C5i	C6ai	C6ai	C17C2
C2	-	C5i	C6ai	C6i	C17C2
C2	-	C5i	C6i	C4i	C15C2
C2	-	C5i	C6i	C5ai	C16C2
C2	-	C5i	C6i	C5i	C16C2
C2	-	C5i	C6i	C6ai	C17C2
C2	-	C5i	C6i	C6i	C17C2
C2	C2	C5i	C4i	C4i	C2C13C2
C2	C2	C5i	C4i	C5ai	C2C14C2
C2	C2	C5i	C4i	C5i	C2C14C2
C2	C2	C5i	C4i	C6ai	C2C15C2
C2	C2	C5i	C4i	C6i	C2C15C2
C2	C2	C5i	C5ai	C4i	C2C14C2
C2	C2	C5i	C5ai	C5ai	C2C15C2
C2	C2	C5i	C5ai	C5i	C2C15C2
C2	C2	C5i	C5ai	C6ai	C2C16C2
C2	C2	C5i	C5ai	C6i	C2C16C2
C2	C2	C5i	C5i	C4i	C2C14C2
C2	C2	C5i	C5i	C5ai	C2C15C2
C2	C2	C5i	C5i	C5i	C2C15C2
C2	C2	C5i	C5i	C6ai	C2C16C2
C2	C2	C5i	C5i	C6i	C2C16C2
C2	C2	C5i	C6ai	C4i	C2C15C2
C2	C2	C5i	C6ai	C5ai	C2C16C2
C2	C2	C5i	C6ai	C5i	C2C16C2
C2	C2	C5i	C6ai	C6ai	C2C17C2
C2	C2	C5i	C6ai	C6i	C2C17C2
C2	C2	C5i	C6i	C4i	C2C15C2
C2	C2	C5i	C6i	C5ai	C2C16C2
C2	C2	C5i	C6i	C5i	C2C16C2
C2	C2	C5i	C6i	C6ai	C2C17C2
C2	C2	C5i	C6i	C6i	C2C17C2
-	C2	C6ai	C4i	C4i	C2C14
-	C2	C6ai	C4i	C5ai	C2C15
-	C2	C6ai	C4i	C5i	C2C15
-	C2	C6ai	C4i	C6ai	C2C16
-	C2	C6ai	C4i	C6i	C2C16
-	C2	C6ai	C5ai	C4i	C2C15
-	C2	C6ai	C5ai	C5ai	C2C16
-	C2	C6ai	C5ai	C5i	C2C16
-	C2	C6ai	C5ai	C6ai	C2C17
-	C2	C6ai	C5ai	C6i	C2C17
-	C2	C6ai	C5i	C4i	C2C15
-	C2	C6ai	C5i	C5ai	C2C16
-	C2	C6ai	C5i	C5i	C2C16
-	C2	C6ai	C5i	C6ai	C2C17
-	C2	C6ai	C5i	C6i	C2C17
-	C2	C6ai	C6ai	C4i	C2C16
-	C2	C6ai	C6ai	C5ai	C2C17
-	C2	C6ai	C6ai	C5i	C2C17
-	C2	C6ai	C6ai	C6ai	C2C18
-	C2	C6ai	C6ai	C6i	C2C18
-	C2	C6ai	C6i	C4i	C2C16
-	C2	C6ai	C6i	C5ai	C2C17
-	C2	C6ai	C6i	C5i	C2C17
-	C2	C6ai	C6i	C6ai	C2C18

-	C2	C6ai	C6i	C6i	C2C18
-	-	C6ai	C4i	C4i	C14
-	-	C6ai	C4i	C5ai	C15
-	-	C6ai	C4i	C5i	C15
-	-	C6ai	C4i	C6ai	C16
-	-	C6ai	C4i	C6i	C16
-	-	C6ai	C5ai	C4i	C15
-	-	C6ai	C5ai	C5ai	C16
-	-	C6ai	C5ai	C5i	C16
-	-	C6ai	C5ai	C6ai	C17
-	-	C6ai	C5ai	C6i	C17
-	-	C6ai	C5i	C4i	C15
-	-	C6ai	C5i	C5ai	C16
-	-	C6ai	C5i	C5i	C16
-	-	C6ai	C5i	C6ai	C17
-	-	C6ai	C5i	C6i	C17
-	-	C6ai	C6ai	C4i	C16
-	-	C6ai	C6ai	C5ai	C17
-	-	C6ai	C6ai	C5i	C17
-	-	C6ai	C6ai	C6ai	C18
-	-	C6ai	C6ai	C6i	C18
-	-	C6ai	C6i	C4i	C16
-	-	C6ai	C6i	C5ai	C17
-	-	C6ai	C6i	C5i	C17
-	-	C6ai	C6i	C6ai	C18
-	-	C6ai	C6i	C6i	C18
C2	-	C6ai	C4i	C4i	C14C2
C2	-	C6ai	C4i	C5ai	C15C2
C2	-	C6ai	C4i	C5i	C15C2
C2	-	C6ai	C4i	C6ai	C16C2
C2	-	C6ai	C4i	C6i	C16C2
C2	-	C6ai	C5ai	C4i	C15C2
C2	-	C6ai	C5ai	C5ai	C16C2
C2	-	C6ai	C5ai	C5i	C16C2
C2	-	C6ai	C5ai	C6ai	C17C2
C2	-	C6ai	C5ai	C6i	C17C2
C2	-	C6ai	C5i	C4i	C15C2
C2	-	C6ai	C5i	C5ai	C16C2
C2	-	C6ai	C5i	C5i	C16C2
C2	-	C6ai	C5i	C6ai	C17C2
C2	-	C6ai	C5i	C6i	C17C2
C2	-	C6ai	C6ai	C4i	C16C2
C2	-	C6ai	C6ai	C5ai	C17C2
C2	-	C6ai	C6ai	C5i	C17C2
C2	-	C6ai	C6ai	C6ai	C18C2
C2	-	C6ai	C6ai	C6i	C18C2
C2	-	C6ai	C6i	C4i	C16C2
C2	-	C6ai	C6i	C5ai	C17C2
C2	-	C6ai	C6i	C5i	C17C2
C2	-	C6ai	C6i	C6ai	C18C2
C2	-	C6ai	C6i	C6i	C18C2
C2	C2	C6ai	C4i	C4i	C2C14C2
C2	C2	C6ai	C4i	C5ai	C2C15C2
C2	C2	C6ai	C4i	C5i	C2C15C2
C2	C2	C6ai	C4i	C6ai	C2C16C2
C2	C2	C6ai	C4i	C6i	C2C16C2
C2	C2	C6ai	C5ai	C4i	C2C15C2
C2	C2	C6ai	C5ai	C5ai	C2C16C2
C2	C2	C6ai	C5ai	C5i	C2C16C2
C2	C2	C6ai	C5ai	C6ai	C2C17C2
C2	C2	C6ai	C5ai	C6i	C2C17C2
C2	C2	C6ai	C5i	C4i	C2C15C2
C2	C2	C6ai	C5i	C5ai	C2C16C2
C2	C2	C6ai	C5i	C5i	C2C16C2
C2	C2	C6ai	C5i	C6ai	C2C17C2
C2	C2	C6ai	C5i	C6i	C2C17C2

C2	C2	C6ai	C6ai	C4i	C2C16C2
C2	C2	C6ai	C6ai	C5ai	C2C17C2
C2	C2	C6ai	C6ai	C5i	C2C17C2
C2	C2	C6ai	C6ai	C6ai	C2C18C2
C2	C2	C6ai	C6ai	C6i	C2C18C2
C2	C2	C6ai	C6i	C4i	C2C16C2
C2	C2	C6ai	C6i	C5ai	C2C17C2
C2	C2	C6ai	C6i	C5i	C2C17C2
C2	C2	C6ai	C6i	C6ai	C2C18C2
C2	C2	C6ai	C6i	C6i	C2C18C2
-	C2	C6i	C4i	C4i	C2C14
-	C2	C6i	C4i	C5ai	C2C15
-	C2	C6i	C4i	C5i	C2C15
-	C2	C6i	C4i	C6ai	C2C16
-	C2	C6i	C4i	C6i	C2C16
-	C2	C6i	C5ai	C4i	C2C15
-	C2	C6i	C5ai	C5ai	C2C16
-	C2	C6i	C5ai	C5i	C2C16
-	C2	C6i	C5ai	C6ai	C2C17
-	C2	C6i	C5ai	C6i	C2C17
-	C2	C6i	C5i	C4i	C2C15
-	C2	C6i	C5i	C5ai	C2C16
-	C2	C6i	C5i	C5i	C2C16
-	C2	C6i	C5i	C6ai	C2C17
-	C2	C6i	C5i	C6i	C2C17
-	C2	C6i	C6ai	C4i	C2C16
-	C2	C6i	C6ai	C5ai	C2C17
-	C2	C6i	C6ai	C5i	C2C17
-	C2	C6i	C6ai	C6ai	C2C18
-	C2	C6i	C6ai	C6i	C2C18
-	C2	C6i	C6i	C4i	C2C16
-	C2	C6i	C6i	C5ai	C2C17
-	C2	C6i	C6i	C5i	C2C17
-	C2	C6i	C6i	C6ai	C2C18
-	C2	C6i	C6i	C6i	C2C18
-	-	C6i	C4i	C4i	C14
-	-	C6i	C4i	C5ai	C15
-	-	C6i	C4i	C5i	C15
-	-	C6i	C4i	C6ai	C16
-	-	C6i	C4i	C6i	C16
-	-	C6i	C5ai	C4i	C15
-	-	C6i	C5ai	C5ai	C16
-	-	C6i	C5ai	C5i	C16
-	-	C6i	C5ai	C6ai	C17
-	-	C6i	C5ai	C6i	C17
-	-	C6i	C5i	C4i	C15
-	-	C6i	C5i	C5ai	C16
-	-	C6i	C5i	C5i	C16
-	-	C6i	C5i	C6ai	C17
-	-	C6i	C5i	C6i	C17
-	-	C6i	C6ai	C4i	C16
-	-	C6i	C6ai	C5ai	C17
-	-	C6i	C6ai	C5i	C17
-	-	C6i	C6ai	C6ai	C18
-	-	C6i	C6ai	C6i	C18
-	-	C6i	C6i	C4i	C16
-	-	C6i	C6i	C5ai	C17
-	-	C6i	C6i	C5i	C17
-	-	C6i	C6i	C6ai	C18
-	-	C6i	C6i	C6i	C18
C2	-	C6i	C4i	C4i	C14C2
C2	-	C6i	C4i	C5ai	C15C2
C2	-	C6i	C4i	C5i	C15C2
C2	-	C6i	C4i	C6ai	C16C2
C2	-	C6i	C4i	C6i	C16C2
C2	-	C6i	C5ai	C4i	C15C2

C2	-	C6i	C5ai	C5ai	C16C2
C2	-	C6i	C5ai	C5i	C16C2
C2	-	C6i	C5ai	C6ai	C17C2
C2	-	C6i	C5ai	C6i	C17C2
C2	-	C6i	C5i	C4i	C15C2
C2	-	C6i	C5i	C5ai	C16C2
C2	-	C6i	C5i	C5i	C16C2
C2	-	C6i	C5i	C6ai	C17C2
C2	-	C6i	C5i	C6i	C17C2
C2	-	C6i	C6ai	C4i	C16C2
C2	-	C6i	C6ai	C5ai	C17C2
C2	-	C6i	C6ai	C5i	C17C2
C2	-	C6i	C6ai	C6ai	C18C2
C2	-	C6i	C6ai	C6i	C18C2
C2	-	C6i	C6i	C4i	C16C2
C2	-	C6i	C6i	C5ai	C17C2
C2	-	C6i	C6i	C5i	C17C2
C2	-	C6i	C6i	C6ai	C18C2
C2	-	C6i	C6i	C6i	C18C2
C2	C2	C6i	C4i	C4i	C2C14C2
C2	C2	C6i	C4i	C5ai	C2C15C2
C2	C2	C6i	C4i	C5i	C2C15C2
C2	C2	C6i	C4i	C6ai	C2C16C2
C2	C2	C6i	C4i	C6i	C2C16C2
C2	C2	C6i	C5ai	C4i	C2C15C2
C2	C2	C6i	C5ai	C5ai	C2C16C2
C2	C2	C6i	C5ai	C5i	C2C16C2
C2	C2	C6i	C5ai	C6ai	C2C17C2
C2	C2	C6i	C5ai	C6i	C2C17C2
C2	C2	C6i	C5i	C4i	C2C15C2
C2	C2	C6i	C5i	C5ai	C2C16C2
C2	C2	C6i	C5i	C5i	C2C16C2
C2	C2	C6i	C5i	C6ai	C2C17C2
C2	C2	C6i	C5i	C6i	C2C17C2
C2	C2	C6i	C6ai	C4i	C2C16C2
C2	C2	C6i	C6ai	C5ai	C2C17C2
C2	C2	C6i	C6ai	C5i	C2C17C2
C2	C2	C6i	C6ai	C6ai	C2C18C2
C2	C2	C6i	C6ai	C6i	C2C18C2
C2	C2	C6i	C6i	C4i	C2C16C2
C2	C2	C6i	C6i	C5ai	C2C17C2
C2	C2	C6i	C6i	C5i	C2C17C2
C2	C2	C6i	C6i	C6ai	C2C18C2
C2	C2	C6i	C6i	C6i	C2C18C2

C2 indica acetilo; C3 indica butirilo; C4 indica propionilo; C4i indica isobutirilo; C5 indica valerilo (pentanoilo); C5ai indica 2-metil-butirilo; C5i indica isovalerilo; C5:1i indica isopentenoilo; C5:1 indica pentenoilo; C6 indica hexanoilo; C6(2) indica 2-metilvalerilo; C6ai indica beta-metilvalerilo; C6i indica 4-metilvalerilo; - es típicamente hidrógeno.

REIVINDICACIONES

1. Una célula vegetal de tabaco transgénico que comprende un constructo recombinante que comprende:
(a) un polinucleótido que codifica una isopropilmalato sintasa, unida operativamente a un promotor específico de tricoma o (b) un polinucleótido que reduce o inhibe la expresión de un gen de isopropilmalato sintasa, unido operativamente a un promotor específico de tricoma; en donde
(i) el polinucleótido que codifica una isopropilmalato sintasa tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO:10 o la SEQ ID NO: 12 o la SEQ ID NO:14; o
(ii) la isopropilmalato sintasa comprende un polipéptido que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:2 o la SEQ ID NO:11 o la SEQ ID NO:13 o la SEQ ID NO:15; opcionalmente, en donde dicho promotor comprende o consiste en la secuencia expuesta en la SEQ ID NO:8 o en una variante de esta con al menos aproximadamente 60 % de identidad con la misma.

2. Una planta de tabaco transgénica que comprende la célula vegetal de conformidad con la reivindicación 1.

3. Un método para modular la cantidad o el tipo de ésteres de sacarosa en al menos una parte de una planta de tabaco, que comprende las etapas de:
(i) modular la expresión o la actividad de la isopropilmalato sintasa en la planta, al transformar la planta con un constructo recombinante (a) que comprende un polinucleótido que codifica isopropilmalato sintasa, unido operativamente a un promotor específico para el tricoma o (b) que contiene un polinucleótido que reduce o inhibe la expresión de un gen de isopropilmalato sintasa, unido operativamente a un promotor específico de tricoma; en donde el polinucleótido que codifica una isopropilmalato sintasa tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO:10 o la SEQ ID NO: 12 o la SEC ID NO:14; o en donde la isopropilmalato sintasa se codifica por un polipéptido que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:2 o la SEQ ID NO:11 o la SEQ ID NO:13 o la SEQ ID NO:15;
(ii) medir opcionalmente la cantidad o determinar el tipo de uno o más ésteres de sacarosa en al menos una parte de la planta transgénica obtenida en la etapa (i); e
(iii) identificar una planta transgénica en la cual la cantidad o el tipo de uno o más ésteres de sacarosa en la misma ha cambiado en comparación con una planta control en la cual la expresión o la actividad de la isopropilmalato sintasa no se ha modulado y en donde la apariencia visual de dicha planta transgénica es sustancialmente la misma que la de la planta control.

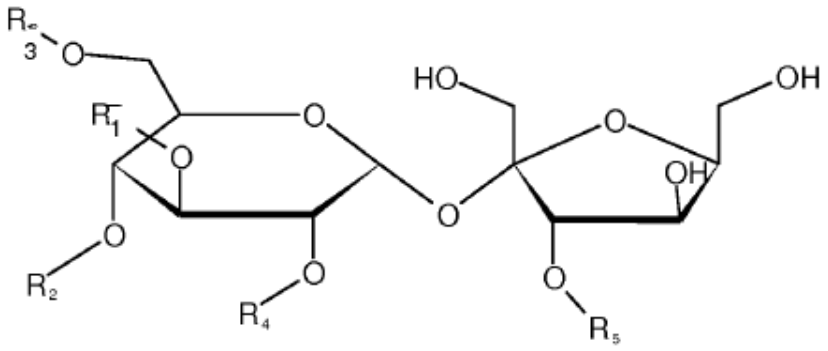
4. Un método de conformidad con la reivindicación 3, en donde dicho promotor comprende o consiste en la secuencia expuesta en la SEQ ID NO:8 o en una variante de esta con al menos aproximadamente un 60 % de identidad con la misma.

5. Material vegetal que incluye biomasa, semillas u hojas que comprenden células 1 de conformidad con la reivindicación 1.

6. Un producto de tabaco que comprende célula vegetal de tabaco de conformidad con la reivindicación 1 o material vegetal de conformidad con la reivindicación 5.

7. Un método para producir una composición que comprende uno o más ésteres de sacarosa que comprende las etapas de:
(a) proporcionar al menos parte de una planta de tabaco transgénica de conformidad con la reivindicación 2, material vegetal de conformidad con la reivindicación 5 o el producto de tabaco de conformidad con la reivindicación 6;
(ii) extraer el(los) éster(es) de sacarosa de los mismos; y
(iii) opcionalmente, aislar o purificar el(los) éster(es) de sacarosa extraído(s).

8. El método de conformidad con la reivindicación 3 o la reivindicación 7 o la planta transgénica de conformidad con la reivindicación 2, en donde uno o más de los ésteres de sacarosa tienen la estructura como se muestra a continuación:



en donde R3 es acetilo o hidrógeno, preferentemente, acetilo; uno o más de R1, R2 y R4 comprende una cadena de acilo con 6 carbonos, preferentemente, beta-metilvalerilo; y R5 es un acetilo o hidrógeno, preferentemente, hidrógeno.

9. Un método para modular el sabor del tabaco o un producto de tabaco que comprende: (i) añadir al tabaco o un producto de tabaco, una parte de una planta, preferentemente, hojas, de una planta transgénica de conformidad con la reivindicación 2 o material vegetal de conformidad con la reivindicación 5.

10. Un método para producir beta-metilvalerilo que comprende las etapas de:
(a) proporcionar al menos parte de una planta transgénica de conformidad con la reivindicación 2, el material vegetal de conformidad con la reivindicación 5 o el producto de tabaco de conformidad con la reivindicación 6;
(ii) hidrolizar el material o un extracto de este proporcionado en la etapa (i); y
(iii) opcionalmente, aislar o purificar el ácido beta-metilvalérico.

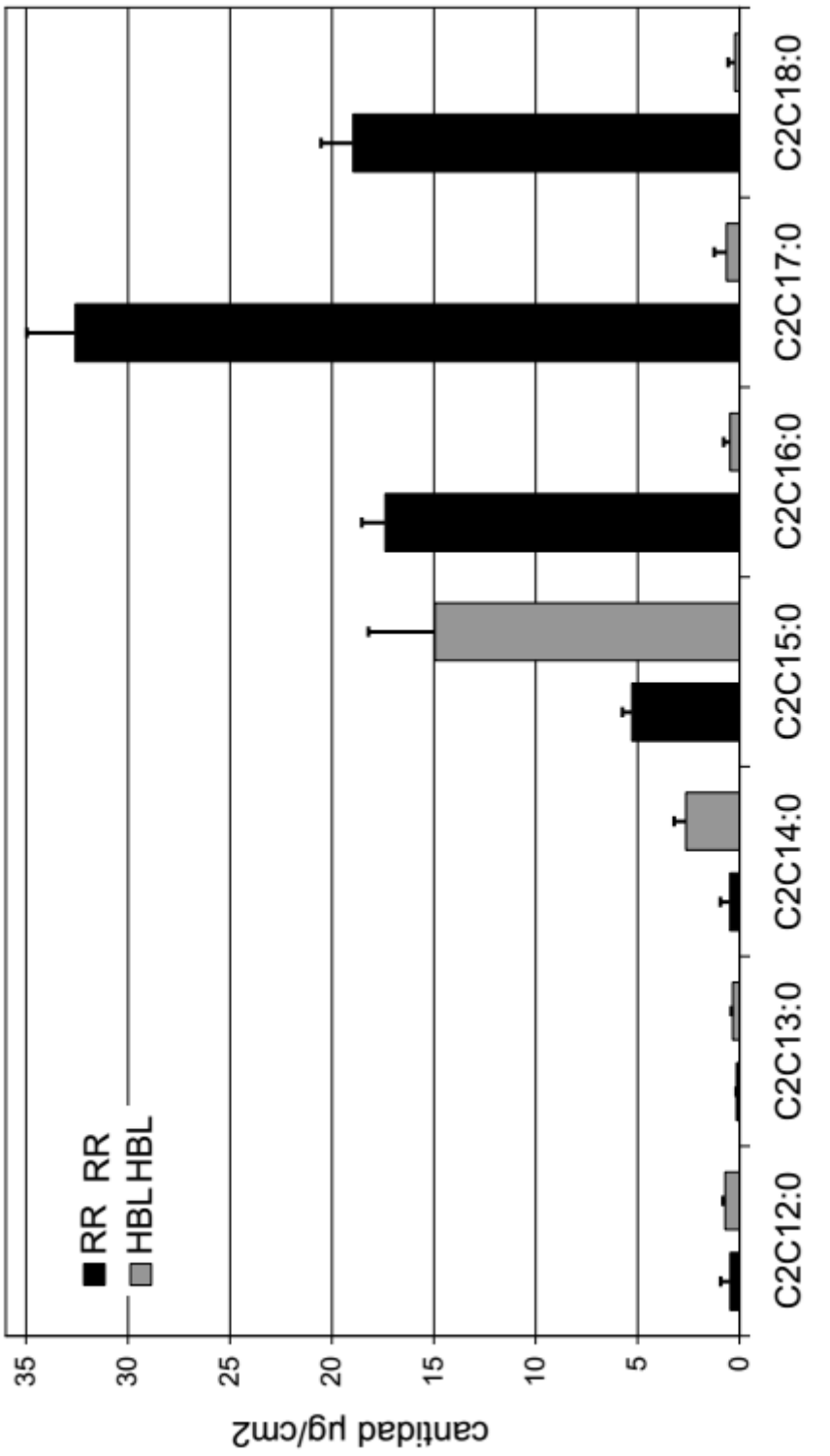

cantidad µg/cm2
0
5
10
15
20
25
30
35
RR RR
HBL HBL
C2C12:0
C2C13:0
C2C14:0
C2C15:0
C2C16:0
C2C17:0
C2C18:0

Figura 1

M	PM (Da)	Descripción	Composición de acilo	Presencia en variedades de tabaco *bmvse*	Presencia en variedades de tabaco BMVSE
594		C15:0	C5C5C5	+	+
			C6C5C4		+
		C2C12:0	C2C3C4C5	+	+
			C2C2C5C5	+	+
608		C16:0	C6C5C5		+
		C2C13:0	C2C4C4C5	+	+
			C2C3C4C6		+
			C2C3C5C5	+	+
622		C17:0	C6C6C5		+
		C2C14:0	C2C4C4C6		+
			C2C4C5C5	+	+
			C2C3C5C6		+
636		C18:0	C6C6C6		+
		C2C15:0	C2C4C5C6		+
			C2C5C5C5	+	+
			C2C3C6C6		+
650		C2C16:0	C2C5C5C6		+
			C2C4C6C6		+
664		C2C17:0	C2C5C6C6		+
678		C2C18:0	C2C6C6C6		+
692		C2C19:0	C2C6C6C7		+

Figura 2

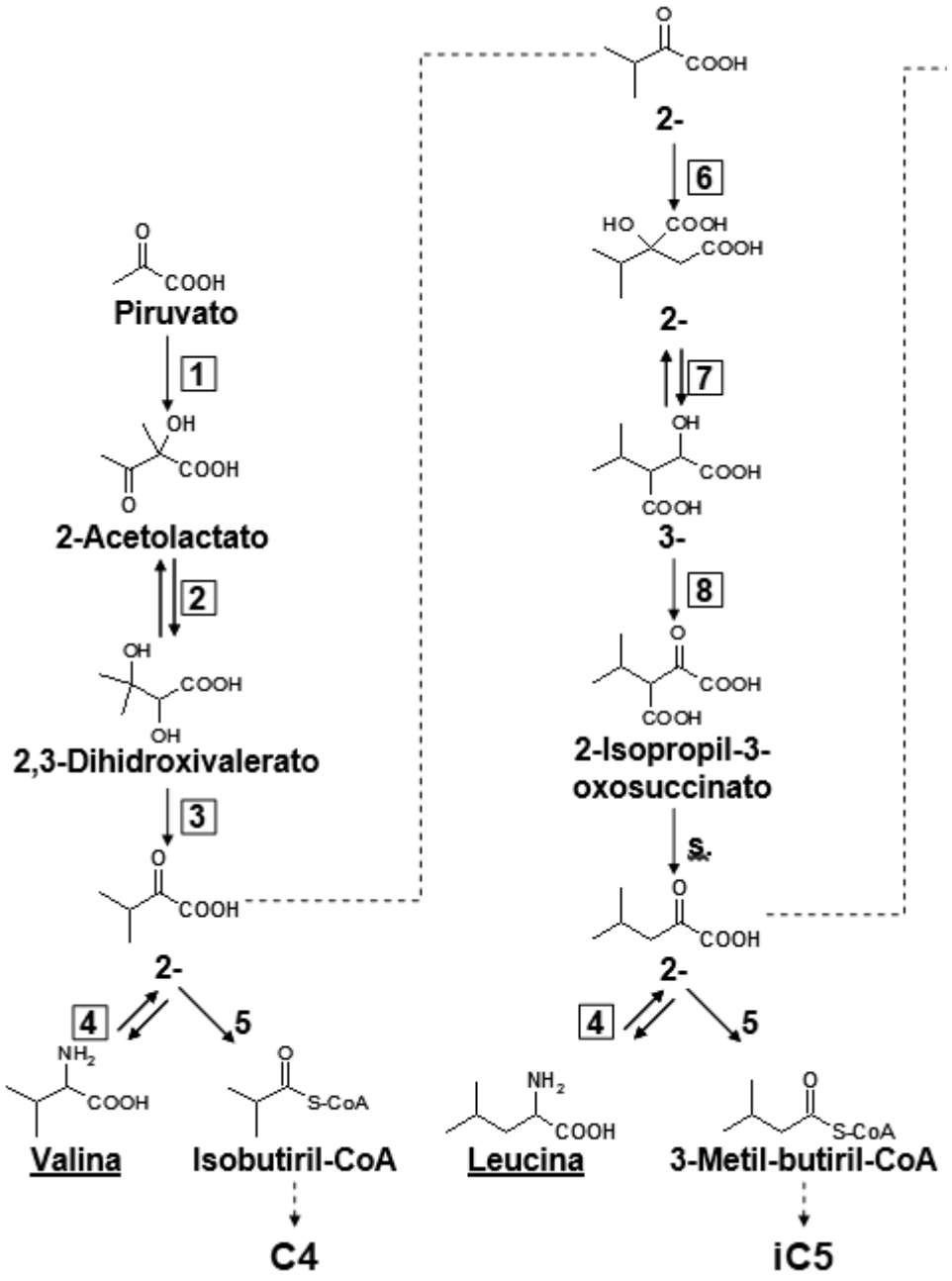

Piruvato
1
2-Acetolactato
2
2,3-Dihidroxivalerato
3
2-
4
5
Valina
Isobutiril-CoA
C4
2-
6
2-
7
3-
8
2-Isopropil-3-oxosuccinato
2-
4
5
Leucina
3-Metil-butiril-CoA
iC5

Figura 3

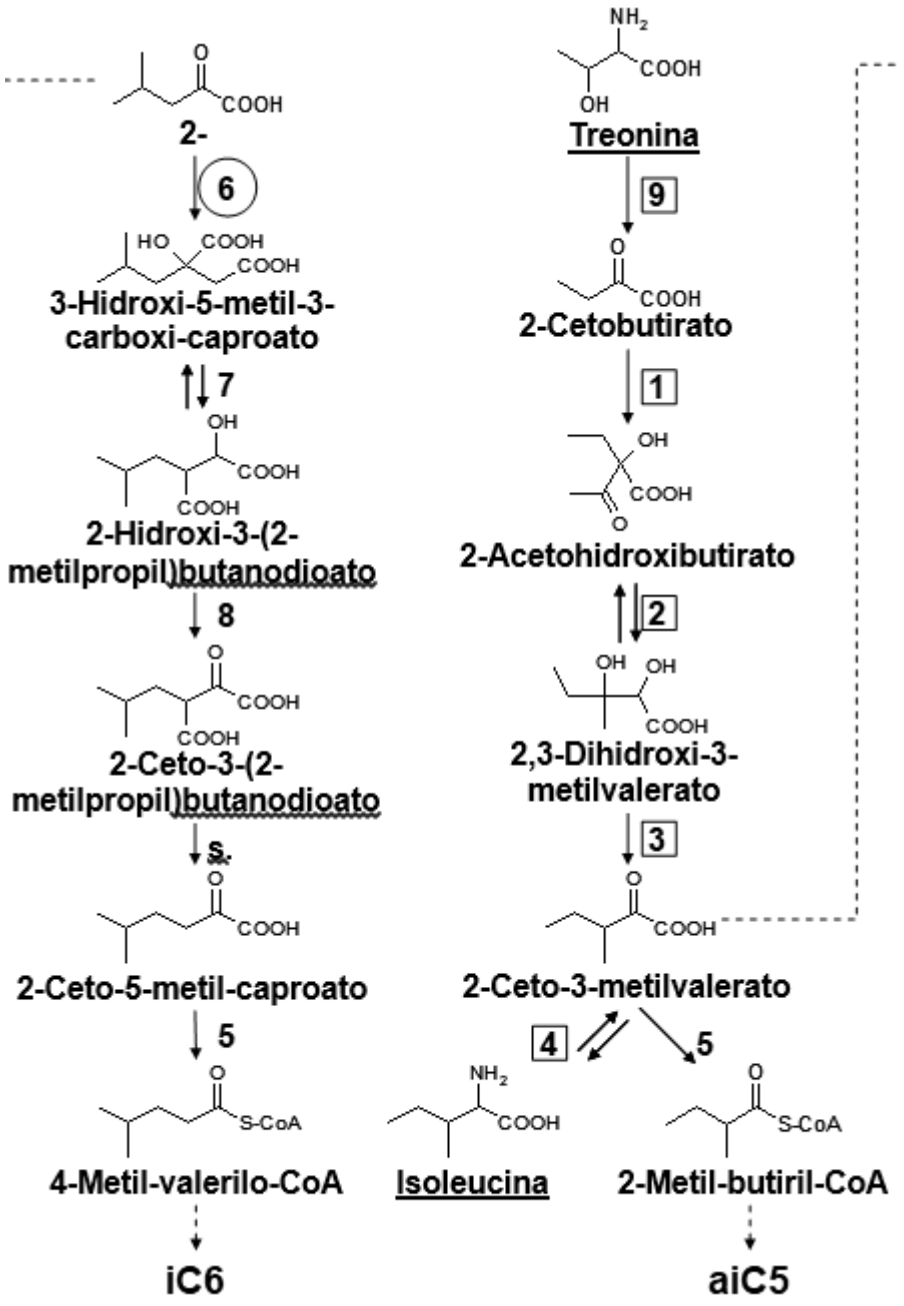


Figura 3 (cont.)

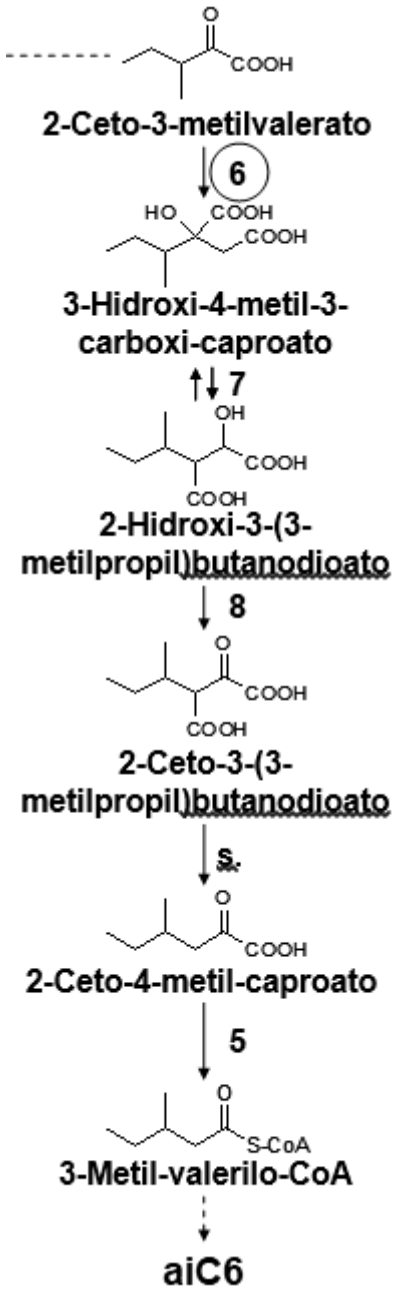


Figura 3 (cont.)

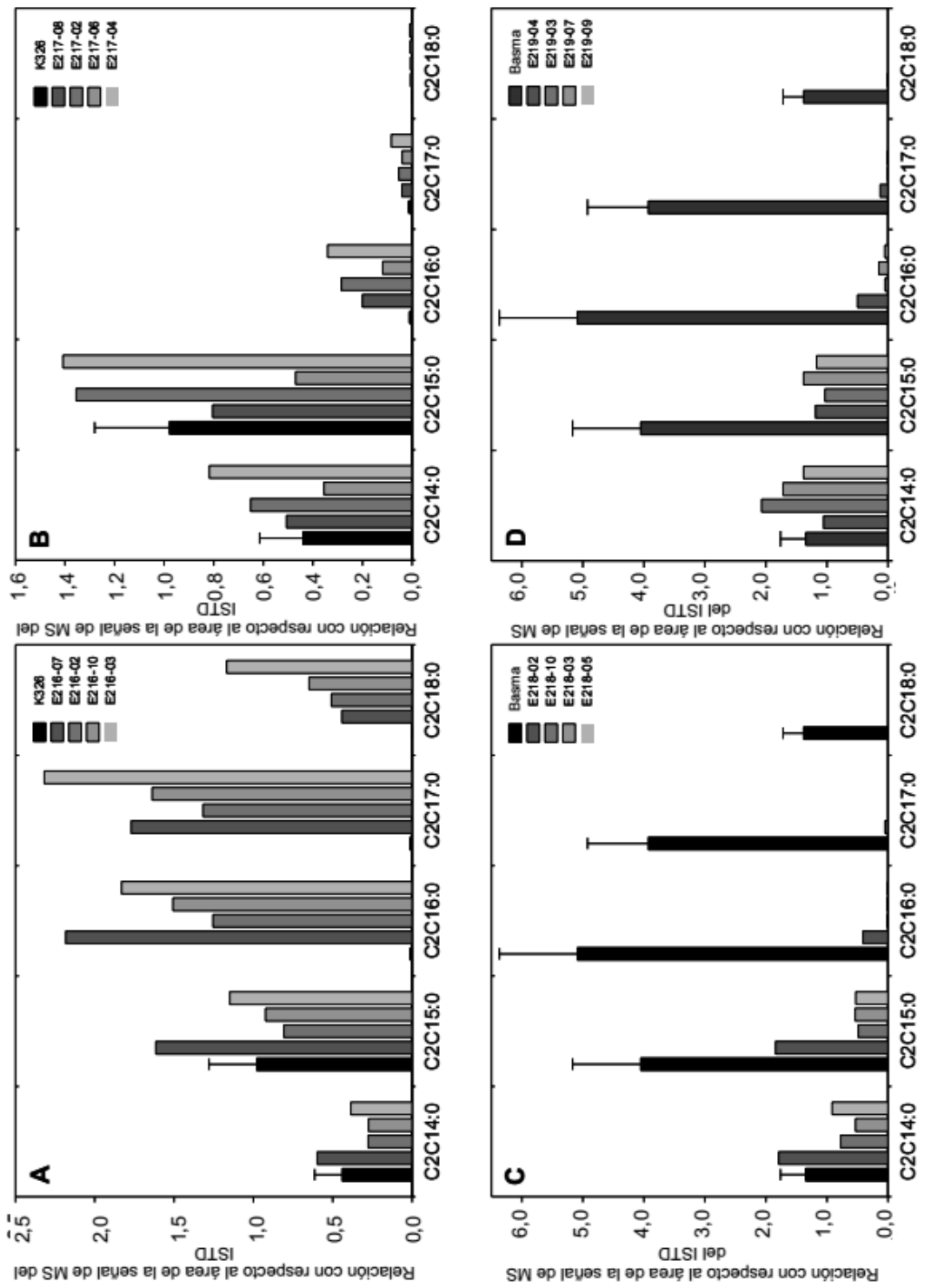

A
B
C
D
Relación con respecto al área de la señal de MS del ISTD
Relación con respecto al área de la señal de MS del ISTD
Relación con respecto al área de la señal de MS del ISTD
Relación con respecto al área de la señal de MS del ISTD
K326
E216-07
E216-02
E216-10
E216-03
K326
E217-08
E217-02
E217-06
E217-04
Basma
E218-02
E218-10
E218-03
E218-05
Basma
E219-04
E219-03
E219-07
E219-09
C2C14:0
C2C15:0
C2C16:0
C2C17:0
C2C18:0

Figura 4

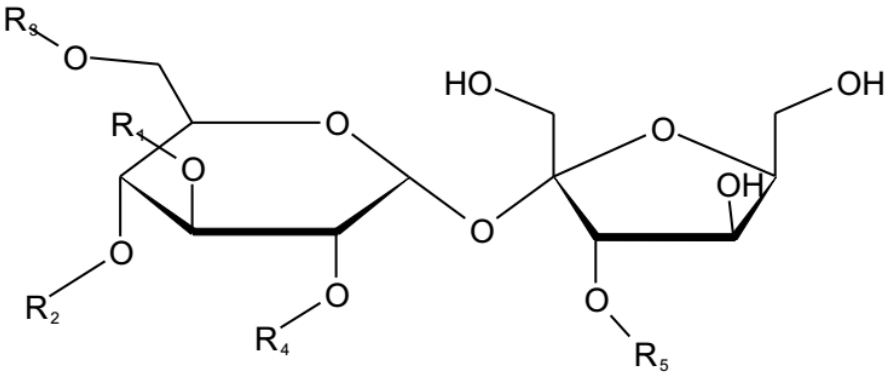


Figura 5

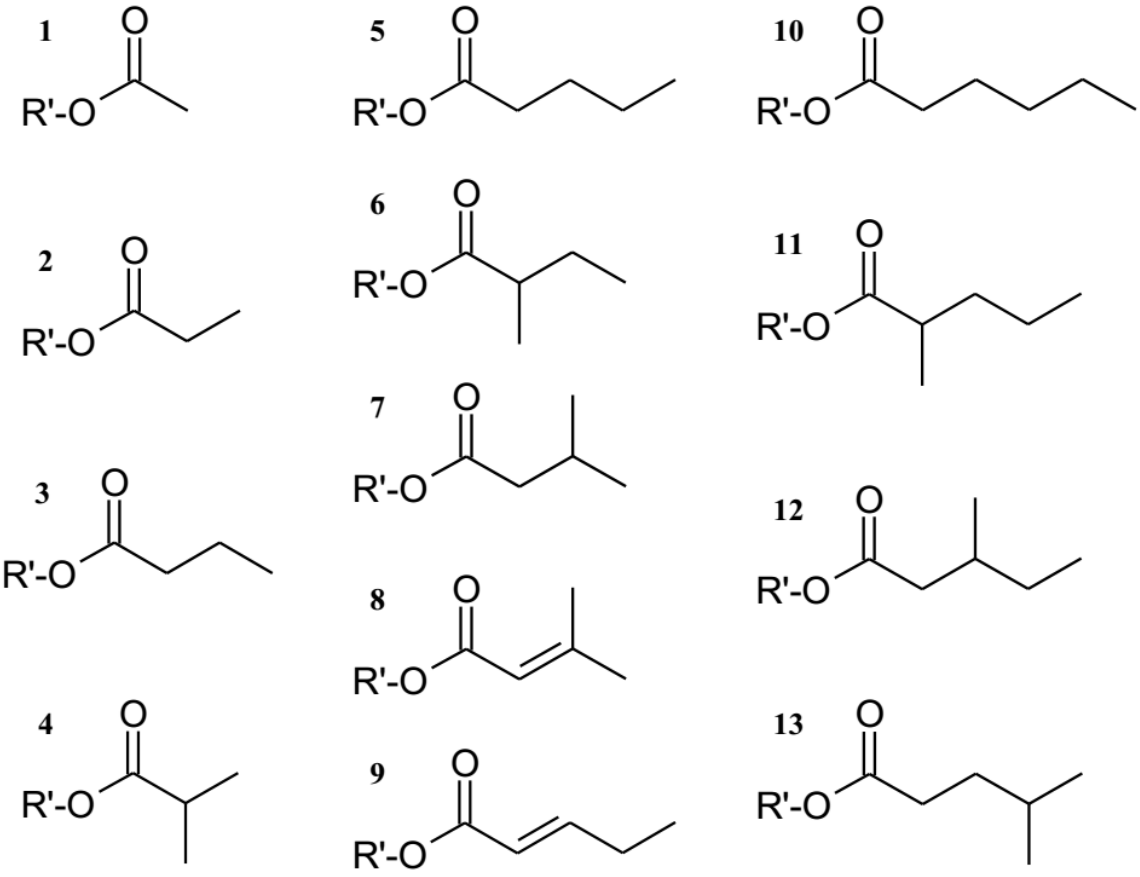


Figura 6