

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 398 705**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.05.2006 E 06765647 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2012 EP 1893761**

54 Título: **Modulación del crecimiento de plantas alterando la captación de aminoácidos**

30 Prioridad:

27.05.2005 GB 0510928

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

21.03.2013

73 Titular/es:

**SWETREE TECHNOLOGIES AB (100.0%)
P.O. BOX 4095
904 03 UMEA, SE**

72 Inventor/es:

**NASHOLM, TORGNY;
SVENNERSTAM, HENRIK;
FORSUM, OSKAR;
GANENTEG, ULRIKA y
ZETHERSTROM, MARGARETA**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 398 705 T3

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

DESCRIPCIÓN

Modulación del crecimiento de plantas alterando la captación de aminoácidos

- 5 **[0001]** La presente invención se refiere a la modulación de la captación de aminoácidos del entorno por plantas mediante alteraciones en la expresión de transportadores de aminoácidos con el fin de influir en el crecimiento de plantas.
- 10 **[0002]** El nitrógeno es un nutriente mineral que es necesitado en grandes cantidades por las plantas. Fuentes de nitrógeno para el crecimiento de plantas incluyen compuestos de nitrógeno inorgánico tales como amonio y nitrato y compuestos de nitrógeno orgánico que incluyen aminoácidos.
- 15 **[0003]** El mejorar la adquisición de nitrógeno por las plantas es un objetivo importante en el aumento de los rendimientos del cultivo (Britto y col. (2004) BioEssays 26:683-692). Sin embargo, los intentos por potenciar la adquisición de nitrógeno por las plantas por el aumento de la expresión de proteínas transportadoras de nitrógeno se han dificultado por diversos factores.
- 20 **[0004]** En muchas especies de plantas, la entrada de nitrógeno del entorno está inversamente relacionada con el contenido de nitrógeno de la planta, es decir, cuanto mayor sea el contenido de nitrógeno de la planta, menor será la captación de nitrógeno. La captación de nitrógeno puede regularse por disminución por las fuentes de nitrógeno originariamente transportadas, que pueden acumularse en concentraciones sustanciales dentro de células vegetales, o los productos de la asimilación metabólica de estos iones. Esta inhibición de la retroalimentación dificulta aumentar la capacidad de las plantas para extraer nitrógeno de la tierra.
- 25 **[0005]** Además, las raíces de las plantas muestran frecuentemente capacidad de entrada de nitrógeno en exceso e incluso bajo condiciones de limitación de nitrógeno frecuentemente se observa una salida considerable de nitrógeno de las células de las raíces de nuevo al entorno externo. Esta capacidad de entrada de nitrógeno en exceso indica que las plantas absorben más nitrógeno del entorno que el que asimilan o guardan, y entonces este exceso es expulsado de nuevo al entorno. Por tanto, la expresión en exceso de transportadores de entrada de nitrógeno produce un aumento de la salida de nitrógeno, sin ventaja neta para el cultivo.
- 30 **[0006]** El documento WO 03/066879 desvela moléculas de ácidos nucleicos que codifican transportadores de aminoácidos en una planta, y que alteran la actividad de tales transportadores de aminoácidos.
- 35 **[0007]** El documento WO 94/01559 desvela secuencias de ADN que contienen la región codificante de transportadores de aminoácidos. La introducción de estas secuencias en el genoma modifica la transferencia de metabolitos en plantas transgénicas, plásmidos, bacterias, levaduras y plantas.
- 40 **[0008]** La patente de EE.UU. número 6165792 desvela un fragmento de ácido nucleico aislado que codifica un transportador de aminoácidos. La patente de EE.UU. número 6165792 también describe la construcción de un gen quimérico que codifica toda o una parte del transportador de aminoácidos, en orientación sentido o antisentido. La alteración de la expresión del gen quimérico produce la producción de niveles alterados del transportador de aminoácidos en una célula huésped transformada.
- 45 **[0009]** El documento WO 03/060133 desvela plantas y células vegetales que expresan enzimas metabolizadoras de D-aminoácidos heterólogos y, por tanto, pueden emplear D-aminoácidos como fuente de nitrógeno.
- 50 **[0010]** Los aminoácidos que se producen en la tierra son generalmente absorbidos por las plantas por la raíz y, tras la absorción, son metabolizados de manera que el nitrógeno llevado por el aminoácido absorbido es distribuido en una gama de compuestos de nitrógeno.
- 55 **[0011]** La presente invención se refiere a encontrar que el crecimiento de plantas puede afectarse directamente por la expresión alterada de transportadores de aminoácidos que median en la captación de aminoácidos del entorno. Esto puede ser útil en la alteración de las características de crecimiento de plantas.
- [0012]** Como se explica en las reivindicaciones, la invención proporciona un procedimiento de aumentar el crecimiento de una planta que comprende:
- 60 aumentar la expresión de un ácido nucleico que codifica un transportador de aminoácidos en la planta, siendo aumentado el crecimiento de dicha planta tras dicha expresión.
- [0013]** La expresión de un ácido nucleico que codifica un transportador de aminoácidos puede aumentarse en una planta por medios recombinantes (es decir, por técnicas de ingeniería genética), por ejemplo, expresando un ácido nucleico recombinante que codifica el transportador de aminoácidos en la planta o aumentando o activando la expresión de un ácido nucleico endógeno que codifica el transportador de aminoácidos en la planta usando una
- 65

construcción recombinante de ácidos nucleicos, por ejemplo, ligando operablemente el ácido nucleico con un promotor heterólogo (es decir, un promotor con el que el ácido nucleico no se expresa naturalmente).

5 **[0014]** El ácido nucleico puede ser un ácido nucleico heterólogo. Un procedimiento de aumentar el crecimiento de una planta puede comprender, por ejemplo;

expresar un ácido nucleico heterólogo que codifica un transportador de aminoácidos en la planta, siendo aumentado el crecimiento de dicha planta tras dicha expresión.

10 **[0015]** La planta puede exponerse a un sustrato de crecimiento que comprende uno o más aminoácidos, de forma que el transportador de aminoácidos expresado media en la captación de aminoácidos del sustrato en la planta. Sustratos de crecimiento adecuados son muy conocidos en la técnica e incluyen medios de crecimiento de plantas naturales tales como tierra, turba o compost, o medios de crecimiento de plantas sintéticos tales como medio de Murashige & Skoog, B5 de Gamborg y N6 de Chu (Qbiogene, Irvine CA). El uno o más aminoácidos puede estar
15 naturalmente presente en el medio de crecimiento o puede añadirse al medio de crecimiento. En algunas realizaciones, el uno o más aminoácidos puede ser la única fuente de nitrógeno en el medio de crecimiento.

20 **[0016]** Aminoácidos adecuados incluyen L- y/o D-enantiómeros de aminoácidos tales como His, Glu, Gln, Ala, Lys, Arg, Asp y Ser y el aminoácido no quiral Gly.

[0017] En realizaciones preferidas, los aminoácidos absorbidos por la planta mediante el transportador de aminoácidos son metabolizados mediante las rutas de metabolismo de nitrógeno de la planta y no son guardados o acumulados en semillas u otros tejidos.

25 **[0018]** Preferentemente, el ácido nucleico que codifica el transportador de aminoácidos se expresa preferencialmente o específicamente en tejidos de la planta que se ponen en contacto con el medio de crecimiento que comprende el uno o más aminoácidos. Por ejemplo, el ácido nucleico puede expresarse específicamente en tejido de raíz de la planta, en particular en pelos de la raíz de la planta. La expresión específica para tejido del ácido nucleico puede lograrse ligando operablemente el ácido nucleico con uno o más elementos reguladores específicos
30 para tejido, como se describe más adelante.

[0019] El ácido nucleico expresado puede codificar cualquier transportador de aminoácidos que pueda mediar en la captación de un aminoácido en la planta desde fuera de la planta (por ejemplo, del medio de crecimiento). Por ejemplo, el transportador de aminoácidos puede mediar en la captación de cualquier aminoácido que esté
35 naturalmente presente en el medio de crecimiento o que se añade al medio de crecimiento, L- y/o D-enantiómeros de aminoácidos tales como His, Glu, Gln, Ala, Lys, Arg, Asp y Ser y el aminoácido no quiral Gly. El transportador de aminoácidos puede ser un transportador de aminoácidos que se expresa naturalmente en la planta (es decir, un transportador de aminoácidos endógeno) o un transportador de aminoácidos que no se expresa naturalmente en la planta (es decir, un transportador de aminoácidos extraño o exógeno).

40 **[0020]** Transportadores de aminoácidos adecuados incluyen proteínas de planta y de no planta que incluyen proteínas bacterianas tales como *cycA* de *E. coli*, o variantes o fragmentos de las mismas.

[0021] Transportadores de aminoácidos adecuados pueden mediar en la captación de tanto D- como L-
45 enantiómeros de aminoácidos (Montamat y col. 1999, Plant Mol Biol 41:259-268).

[0022] Pueden usarse transportadores de lisina/histidina en procedimientos de la invención. Los transportadores de lisina/histidina incluyen los transportadores de aminoácidos LHT1. Un transportador de aminoácidos LHT1 adecuado puede tener la secuencia del transportador de aminoácidos LHT1 de *Arabidopsis thaliana* (entrada de la base de datos de proteínas: AAC49885.1 GI: 2576361; entrada de la base de datos de ácidos nucleicos (U39782.1 GI:2576360) o puede ser una variante o fragmento del mismo. Variantes o fragmentos adecuados de un transportador de aminoácidos LHT1 retienen la actividad de la secuencia natural para mediar en la captación de aminoácidos.

55 **[0023]** Los polipéptidos de permeasa de aminoácido (AAP) pueden usarse en procedimientos de la invención. Las permeasas de aminoácido incluyen los transportadores de aminoácidos AAP1, AAP3, AAP6 y AAP8. Polipéptidos de AAP adecuados pueden tener la secuencia del transportador AAP1, AAP3, AAP6 o AAP8 de *Arabidopsis thaliana* (como se cita en la Tabla 2) o pueden ser una variante o fragmento del mismo. Variantes o fragmentos adecuados de un transportador de AAP retienen la actividad de la secuencia natural para mediar en la
60 captación de aminoácidos.

[0024] Otros transportadores de aminoácidos adecuados incluyen, pero no se limitan, un polipéptido enumerado en la Tabla 2 o variantes o fragmentos del mismo.

65 **[0025]** Una variante de una secuencia de polipéptidos para su uso según cualquier aspecto de la invención puede tener una o más de adición, inserción, delección o sustitución de uno o más aminoácidos en la secuencia de

- polipéptidos natural. Por ejemplo, pueden alterarse hasta aproximadamente 5, 10, 15 ó 20 aminoácidos. Tales alteraciones pueden producirse por una o más de adición, inserción, delección o sustitución de uno o más nucleótidos en el ácido nucleico codificante. Una variante de secuencia de aminoácidos de una secuencia de polipéptidos natural puede comprender una secuencia de aminoácidos que comparte más del 20% de identidad de secuencias con la secuencia natural, más del 30%, más del 35%, más del 40%, más del 45%, más del 55%, más del 65%, más del 70%, más de aproximadamente el 80%, más del 90% o más del 95%. La secuencia puede compartir más del 20% de similitud con la secuencia natural, más del 30% de similitud, más del 40% de similitud, más del 50% de similitud, más del 60% de similitud, más del 70% de similitud, más del 80% de similitud o más del 90% de similitud.
- 10 **[0026]** Similitud e identidad de secuencias se definen comúnmente con referencia al algoritmo GAP (Wisconsin GCG package, Accelrys Inc, San Diego USA). GAP usa el algoritmo de Needleman y Wunsch para alinear dos secuencias completas que maximiza el número de coincidencias y minimiza el número de huecos. Generalmente se usan parámetros por defecto, con una penalización por creación de hueco = 12 y penalización por extensión de hueco = 4. El uso de GAP puede preferirse, pero pueden usarse otros algoritmos, por ejemplo, BLAST
- 15 (que usa el procedimiento de Altschul y col. (1990) J. Mol. Biol. 215: 405-410), FASTA (que usa el procedimiento de Pearson y Lipman (1988) PNAS USA 85: 2444-2448) o el algoritmo de Smith-Waterman (Smith y Waterman (1981) J. Mol Biol. 147: 195-197), o el programa TBLASTN, de Altschul y col. (1990), arriba, generalmente empleando parámetros por defecto. En particular puede usarse el algoritmo de psi-Blast (Nucl. Acids Res. (1997) 25 3389-3402). La identidad y similitud de secuencias también puede determinarse usando el software Genomequest™ (Gene-IT, Worcester MA, EE.UU.).
- 20 **[0027]** Las comparaciones de secuencias se hacen preferentemente sobre la longitud completa de la secuencia relevante descrita en el presente documento.
- 25 **[0028]** La similitud permite “variación conservativa”, es decir, sustitución de un residuo hidrófobo tal como isoleucina, valina, leucina o metionina con otro, o la sustitución de un residuo polar con otro tal como arginina con lisina, ácido glutámico con ácido aspártico, o glutamina con asparagina.
- [0029]** El término “heterólogo” indica un elemento que no se produce naturalmente en un contexto particular.
- 30 Por ejemplo, un nucleótido o secuencia de polipéptidos que es heterólogo a una célula de planta puede no producirse naturalmente en células de ese tipo, variedad o especie. Similarmente, un elemento regulador heterólogo o promotor puede no estar naturalmente asociado a una secuencia codificante de ácidos nucleicos en la naturaleza. Los elementos heterólogos pueden combinarse o asociarse por medios de ingeniería genética o recombinantes. En algunas realizaciones, un ácido nucleico heterólogo o elemento regulador puede ser un ácido nucleico recombinante
- 35 o elemento regulador.
- [0030]** El ácido nucleico que codifica un transportador de aminoácidos puede estar contenido en una construcción de ácidos nucleicos o vector. La construcción o vector es preferentemente adecuada para la transformación en y/o expresión dentro de una célula de planta. En algunas realizaciones, la construcción o vector que comprende el ácido nucleico no incluye un promotor u otra secuencia reguladora, por ejemplo, si el vector va a usarse para introducir el ácido nucleico en células para la recombinación en el genoma. En otras realizaciones, el ácido nucleico que codifica el transportador de aminoácidos está operativamente ligado a un elemento regulador. El elemento regulador es preferentemente heterólogo o extraño al ácido nucleico que codifica el transportador de aminoácidos.
- 40
- 45 **[0031]** Preferentemente, el elemento regulador es específico para planta. Una secuencia reguladora específica para planta o elemento es una secuencia que dirige preferencialmente la expresión de un ácido nucleico dentro de una célula de planta con respecto a otros tipos de células. Por ejemplo, la expresión de una secuencia tal puede reducirse o abolirse en células no vegetales tales como células bacterianas o de mamífero. Tales secuencias reguladoras pueden proporcionar la eficiente expresión dentro de una célula de planta. En la técnica se conocen muchas secuencias reguladoras adecuadas y pueden usarse según la invención. Ejemplos de secuencias reguladoras adecuadas pueden derivarse de un virus de planta, por ejemplo, el promotor del gen 35S del virus del mosaico de la coliflor (35S de CaMV) que se expresa a un alto nivel en prácticamente todos los tejidos de planta (Benfey y col., (1990) EMBO J 9: 1677-1684). También pueden usarse promotores específicos para hojas (véase, por ejemplo, Lagrange y col., Plant Cell. 1997 9 (8): 1469-1479). Otros elementos reguladores constitutivos adecuados incluyen el promotor 19S 35S del virus del mosaico de la coliflor; el promotor del virus del mosaico de la escrofularia; y el promotor del gen nopalina sintasa (nos) (Singer y col., Plant Mol. Biol. 14:433 (1990); An, Plant Physiol. 81:86 (1986)).
- 60 **[0032]** En algunas realizaciones preferidas puede emplearse un elemento regulador específico para tejido, en particular un elemento regulador específico para raíz, por ejemplo, un elemento que acciona específicamente la expresión del transportador de aminoácidos en pelo de raíz.
- [0033]** Elementos reguladores específicos para raíz adecuados incluyen el promotor LeExtI (Bucher y col. Plant Physiology, marzo de 2002, vol. 128, pág. 911-923) y el promotor ROP2 (Xu y col. The Plant Cell, vol. 17, 525-536).
- 65

[0034] En algunas realizaciones, una secuencia reguladora operativamente ligada a la secuencia de ácidos nucleicos puede ser inducible. Los promotores inducibles son muy conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, el promotor HSP (Severin K. y Schöffl F. 1990. *Plant Mol. Biol.* 15: 827-833). En esencia, la expresión bajo el control de un promotor inducible se “enciende” o aumenta en respuesta a un estímulo aplicado (que puede generarse dentro de una célula o proporcionarse exógenamente). La naturaleza del estímulo varía entre promotores. Cualquiera que sea el nivel de expresión en ausencia del estímulo, la expresión de cualquier promotor inducible aumenta en presencia del estímulo correcto. La situación preferible es en la que el nivel de expresión del transportador de aminoácidos aumenta en presencia del estímulo relevante por una cantidad que es eficaz para alterar la captación de aminoácidos y así modular el crecimiento.

[0035] Construcciones y vectores pueden comprender además marcadores genéticos de selección que consisten en genes que confieren fenotipos de selección tales como resistencia a antibióticos tales como kanamicina, higromicina, fosfotricina, clorsulfuron, metrotrexato, gentamicina, espectinomina, imidazolinonas, glifosato y D-aminoácidos.

[0036] Aquellos expertos en la materia pueden construir vectores y diseñar protocolos para la expresión génica recombinante, por ejemplo, en una célula microbiana o de planta. Pueden elegirse o construirse vectores adecuados que contienen secuencias reguladoras apropiadas, que incluyen secuencias promotoras, fragmentos terminadores, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, genes marcadores y otras secuencias según convenga. Para más detalles véase, por ejemplo, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*: 3ª edición, Sambrook y col., 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press and *Protocols in Molecular Biology*, segunda edición, Ausubel y col. eds. John Wiley & Sons, 1992. Procedimientos y vectores específicos previamente usados con amplio éxito en las plantas se describen por Bevan, *Nucl. Acids Res.* (1984) 12, 8711-8721), y Guerineau y Mullineaux, (1993) *Plant Transformation and expression vectors*. En: *Plant Molecular Biology Labfax* (Croy RRD ed) Oxford, BIOS Scientific Publishers, pág. 121-148.

[0037] Cuando se introduce una construcción de gen elegida en una célula deben tenerse en cuenta ciertas consideraciones, muy conocidas para aquellos expertos en la materia. El ácido nucleico a insertar debe ensamblarse dentro de una construcción que contiene elementos reguladores eficaces que accionarán la transcripción. Debe estar disponible un procedimiento de transporte de la construcción en la célula. Una vez la construcción está dentro de la membrana celular, la integración del material cromosómico endógeno o bien se producirá o bien no se producirá. Finalmente, el tipo de célula diana está preferentemente de forma que las células pueden regenerarse en plantas completas.

[0038] Pueden usarse técnicas muy conocidas para aquellos expertos en la materia para introducir construcciones de ácidos nucleicos y vectores en células vegetales para producir plantas transgénicas con las propiedades descritas en el presente documento.

[0039] Una planta que comprende un ácido nucleico que codifica un transportador de aminoácidos, por ejemplo, un ácido nucleico heterólogo, puede producirse transformando una célula de planta con el ácido nucleico y regenerando la planta a partir de la célula.

[0040] La transformación con *Agrobacterium* es un procedimiento ampliamente usado por aquellos expertos en la materia para transformar especies de plantas. La producción de plantas transgénicas fértiles estables es ahora rutina en la materia: (Toriyama y col. (1988) *Bio/Technology* 6; 1072-1074; Zhang y col. (1988) *Plant Cell Rep.* 7, 379-384; Zhang y col. (1988) *Theor Appl Genet* 76, 835-840; Shimamoto y col. (1989) *Nature* 338, 274-276; Datta y col. (1990) *Bio/Technology* 8, 736-740; Christou y col. (1991) *Bio/Technology* 9, 957-962; Peng y col. (1991) International Rice Research Institute, Manila, Filipinas, 563-574; Cao y col. (1992) *Plant Cell Rep.* 11, 585-591; Li y col. (1993) *Plant Cell Rep.* 12, 250-255; Rathore y col. (1993) *Plant Molecular Biology* 21, 871-884; Fromm y col. (1990) *Bio/Technology* 8, 833-839; Gordon-Kamm y col. (1990) *Plant Cell* 2, 603-618; D'Halluin y col. (1992) *Plant Cell* 4, 1495-1505; Walters y col. (1992) *Plant Molecular Biology* 18, 189-200; Koziel y col. (1993) *Biotechnology* 11, 194-200; Vasil, I. K. (1994) *Plant Molecular Biology* 25, 925-937; Weeks y col. (1993) *Plant Physiology* 102, 1077-1084; Somers y col. (1992) *Bio/Technology* 10, 1589-1594; WO92/14828; Nilsson, O. y col. (1992) *Transgenic Research* 1, 209-220).

[0041] Otros procedimientos, tales como bombardeo de microproyectiles o partículas (documentos US 5100792, EP-A-444882, EP-A-434616), electroporación (documentos EP 290395, WO 8706614), microinyección (documentos WO 92/09696, WO 94/00583, EP 331083, EP 175966, Green y col. (1987) *Plant Tissue and Cell Culture*, Academic Press), captación de ADN directo (documentos DE 4005152, WO 9012096, US 4684611), captación de ADN mediado por liposomas (por ejemplo, Freeman y col. *Plant Cell Physiol.* 29: 1353 (1984)), o el procedimiento de agitación con vórtex (por ejemplo, Kindle, *PNAS U.S.A.* 87: 1228 (1990d)) pueden preferirse cuando la transformación con *Agrobacterium* sea ineficiente o ineficaz, por ejemplo, en algunas especies de gimnospermas.

[0042] Procedimientos físicos para la transformación de células vegetales se revisan en Oard, 1991, *Biotech. Adv.* 9:1-11.

[0043] Alternativamente puede emplearse una combinación de técnicas diferentes para potenciar la eficiencia del procedimiento de transformación, por ejemplo, bombardeo con micropartículas recubiertas de *Agrobacterium* (documento EP-A-486234) o bombardeo de microproyectiles para inducir lesión seguido de co-cultivo con *Agrobacterium* (documento EP-A-486233).

[0044] Tras la transformación, una planta puede regenerarse, por ejemplo, a partir de células individuales, tejido de callo o discos de hojas, como es convencional en la materia. Casi cualquier planta puede regenerarse totalmente a partir de células, tejidos y órganos de la planta. Técnicas disponibles se revisan en Vasil y col., Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, vol I, II y III, Laboratory Procedures and Their Applications, Academic Press, 1984, y Weissbach y Weissbach, Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, 1989.

[0045] La elección particular de una tecnología de transformación se determinará por su eficiencia para transformar ciertas especies de plantas, además de la experiencia y preferencia de la persona que pone en práctica la invención con una metodología de elección particular. Será evidente para el experto que la elección particular de un sistema de transformación para introducir ácido nucleico en células vegetales no es esencial para o una limitación de la invención, ni es la elección de técnica para la regeneración de plantas.

[0046] En el presente documento se desvela un procedimiento de cultivar selectivamente una planta que comprende;

proporcionar una planta con niveles reducidos o actividad de un transportador de aminoácidos que media en la captación de un D-aminoácido y tratar la planta con el D-aminoácido, proporcionando dicho tratamiento crecimiento selectivo de la planta.

[0047] D-aminoácidos adecuados son tóxicos para la planta e incluyen un D-aminoácido seleccionado del grupo que consiste en D-arg, D-glu, D-ala, D-asp, D-cys, D-gln, D-his, D-ile, D-leu, D-lys, D-met, D-asn, D-phe, D-pro, D-ser, D-thr, D-trp, D-tyr o D-val. Por ejemplo, el D-aminoácido puede ser D-ala, D-ser, D-arg, D-glu, en particular D-ala o D-Ser.

[0048] El nivel o actividad de un transportador de aminoácidos puede reducirse por cualquier procedimiento conveniente. Por ejemplo, los niveles pueden reducirse por expresión de un ácido nucleico supresor, por ejemplo, un ácido nucleico antisentido, sentido o de ARNi, por mutación de un ácido nucleico que codifica el transportador de aminoácidos, en células de la planta o un ancestro de las mismas o por silenciamiento de genes inducido por virus (VIGS).

[0049] El nivel o actividad de un transportador de aminoácidos que media en la captación de aminoácidos del entorno externo puede reducirse en las raíces de la planta, preferentemente específicamente en las raíces de la planta y no en otros tejidos. La planta puede entonces tratarse con un D-aminoácido cultivando la planta en un medio que comprende el D-aminoácido.

[0050] El nivel o actividad de un transportador de aminoácidos que media en la captación de aminoácidos del entorno externo puede reducirse en la porción por encima de la tierra de la planta, preferentemente específicamente en la porción por encima de la tierra de la planta y no en las raíces de la planta o en otros tejidos. La planta puede entonces tratarse con un D-aminoácido poniendo en contacto la porción por encima de la tierra de la planta con una composición que comprende el D-aminoácido.

[0051] Transportadores de aminoácidos adecuados cuyo nivel o actividad puede reducirse según los presentes procedimientos se describen en más detalle anteriormente.

[0052] Una planta que tiene un nivel o actividad reducida de un transportador de aminoácidos que media en la captación de aminoácidos del entorno externo puede producirse mutando la secuencia de ácidos nucleicos que codifica un transportador de aminoácidos, o un elemento regulador de la misma, en una célula de planta o tejido de planta tal como una semilla, y regenerando una planta a partir de la célula o tejido. El ácido nucleico puede mutarse por cualquier procedimiento conveniente, que incluye procedimientos de mutación que eligen diana tales como inserción de T-ADN y procedimientos que promueven alteraciones de secuencias aleatorias en el genoma tales como tratamiento con EMS. Procedimientos adecuados son muy conocidos en la técnica. Una planta que tiene un nivel o actividad reducido de un transportador de aminoácidos que media en la captación de aminoácidos del entorno externo puede producirse expresando una construcción de ácidos nucleicos de supresión tal como un ácido nucleico sentido, antisentido o de ARNi que comprende o que consiste en toda o parte de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el transportador. Los procedimientos para suprimir la expresión de ácidos nucleicos usando técnicas sentido, antisentido o de ARNi son muy conocidos en la técnica.

[0053] Un procedimiento puede comprender reducir el nivel o actividad del transportador de aminoácidos que media en la captación de aminoácidos del entorno externo en la planta expresando una construcción de ácidos nucleicos de supresor.

[0054] En el presente documento se desvela un procedimiento de aumentar la sensibilidad de una planta a un D-aminoácido tóxico que comprende;

5 expresar en la planta un ácido nucleico heterólogo que codifica un transportador de aminoácidos que media en la captación del D-aminoácido tóxico, aumentando dicha expresión la sensibilidad de la planta a D-aminoácido tóxico.

[0055] Un procedimiento de inhibir selectivamente el crecimiento de una planta puede comprender;

10 expresar en la planta un ácido nucleico heterólogo que codifica un transportador de aminoácidos que media en la captación de un D-aminoácido tóxico, y; tratar dicha planta con una composición que comprende el D-aminoácido, aumentando dicha expresión la captación del D-aminoácido tóxico.

[0056] D-aminoácidos tóxicos adecuados incluyen un D-aminoácido seleccionado del grupo que consiste en D-arg, D-glu, D-ala, D-asp, D-cys, D-gln, D-his, D-ile, D-leu, D-lys, D-met, D-asn, D-phe, D-pro, D-ser, D-thr, D-trp, D-tyr o D-val. Por ejemplo, el D-aminoácido puede ser D-ala, D-ser, D-arg o D-glu, en particular D-ala o D-ser (Erikson y col. 2004, Nature Biotech 22: 455-458).

[0057] Procedimientos y medios para expresar transportadores de aminoácidos en plantas se describen anteriormente.

[0058] El transportador de aminoácidos que media en la captación de aminoácidos del entorno externo puede expresarse en las raíces de la planta, preferentemente específicamente en las raíces de la planta y no en otros tejidos. La planta puede entonces tratarse con un D-aminoácido cultivando la planta en un medio que comprende el D-aminoácido.

[0059] El transportador de aminoácidos que media en la captación de aminoácidos del entorno externo puede expresarse en la porción por encima de la tierra de la planta, preferentemente específicamente en la porción por encima de la tierra de la planta y no en las raíces de la planta o en otros tejidos. La planta puede entonces tratarse con un D-aminoácido poniendo en contacto la porción por encima de la tierra de la planta con una composición que comprende el D-aminoácido.

[0060] Transportadores de aminoácidos adecuados que pueden expresarse según los presentes procedimientos se describen en más detalle anteriormente.

[0061] En el presente documento se desvelan plantas que pueden metabolizar uno o más D-aminoácidos. Plantas adecuadas pueden manipularse, por ejemplo, para expresar un polipéptido heterólogo que tiene una actividad enzimática que convierte el uno o más D-aminoácidos en un sustrato metabolizable por la planta.

[0062] Un procedimiento de cultivar selectivamente una planta que metaboliza un D-aminoácido puede comprender;

45 expresar en la planta un ácido nucleico heterólogo que codifica un transportador de aminoácidos que media en la captación del D-aminoácido, y; tratar dicha planta con una composición que comprende el D-aminoácido, proporcionando dicha expresión crecimiento selectivo de dicha planta.

50 **[0063]** El D-aminoácido puede ser D-arg, D-glu, D-ala, D-asp, D-cys, D-gln, D-his, D-ile, D-leu, D-lys, D-met, D-asn, D-phe, D-pro, D-ser, D-thr, D-trp, D-tyr o D-val; preferentemente D-ser, D-asn, D-ala, D-ile, D-glu, D-arg, D-lys, D-his o D-asp; más preferentemente D-ala, D-ile o D-ser.

[0064] Otros D-aminoácidos pueden incluir aminoácidos dextrógiros de no proteína, precursores de aminoácidos dextrógiros tales como D-ornitina y D-citrulina, y derivados de aminoácidos dextrógiros. Tales pueden usarse como fuente de nitrógeno para plantas sólo después de la conversión en una forma metabolizable adecuada por una enzima metabolizadora de D-aminoácido.

[0065] El transportador de aminoácidos puede expresarse específicamente en las raíces de la planta. La planta puede luego tratarse con un D-aminoácido cultivando la planta en un medio que comprende el D-aminoácido.

[0066] El transportador de aminoácidos puede expresarse específicamente en la porción por encima de la tierra de la planta. La planta puede luego tratarse con un D-aminoácido poniendo en contacto la porción por encima de la tierra de la planta con una composición que comprende el D-aminoácido, por ejemplo, pulverizando.

[0067] Una planta que metaboliza un D-aminoácido puede producirse según procedimientos conocidos

transformando una célula de planta con un ácido nucleico que codifica un polipéptido con actividad metabolizadora de D-aminoácido y regenerando la planta a partir de la célula.

5 **[0068]** Un polipéptido con actividad metabolizadora de D-aminoácidos es un polipéptido que convierte un sustrato de D-aminoácido en productos que son sustratos para enzimas de plantas endógenas (es decir, pueden metabolizarse por plantas), en particular compuestos no dextrógiros, es decir, compuestos no quirales o L. Por tanto, el polipéptido metabolizador de D-aminoácidos cataliza la conversión bioquímica del sustrato de D-aminoácido en productos, por ejemplo, productos no dextrógiros, que pueden ser usados por las plantas como fuentes de nutrientes, en particular como fuentes de nitrógeno.

10 **[0069]** Polipéptidos metabolizadores de D-aminoácidos adecuados incluyen, por ejemplo, oxidasas, racemasas, descarboxilasas, transaminasas o deshidratasas (también llamadas amoniaco liasas). Las oxidasas catalizan la conversión de un D-aminoácido en NH_4^+ , un cetoácido (dependiendo del sustrato de D-aminoácido) y H_2O_2 (véase la Figura 2). Las racemasas convierten un D-aminoácido en la forma de L-aminoácido correspondiente.
15 Los L-aminoácidos son útiles como fuente de nitrógeno para plantas. Las descarboxilasas convierten un D-aminoácido en un Y-aminoácido que puede ser metabolizado por las plantas. Las transaminasas convierten un D-aminoácido en una forma de L- o D-aminoácido diferente. Entonces, los L-aminoácidos pueden metabolizarse directamente mientras que los D-aminoácidos pueden someterse adicionalmente a conversión en formas metabolizables. Las deshidratasas catalizan la conversión de un hidrox-D-aminoácido tal como D-ser o D-thr en
20 NH_4^+ , un cetoácido (dependiendo del sustrato de D-aminoácido) y H_2O . Las deshidrogenasas catalizan la conversión de un D-aminoácido en NH_4^+ , un cetoácido (dependiendo del sustrato de D-aminoácido) y H_2O .

[0070] Un polipéptido metabolizador de D-aminoácidos adecuado puede ser una enzima eucariota, por ejemplo, de una levadura (por ejemplo, *Rhodotorula gracilis*), hongo o animal o puede ser una enzima procariota, por
25 ejemplo, de una bacteria tal como *Escherichia coli*. Ejemplos de polipéptidos adecuados que metabolizan D-aminoácidos se muestran en la Tabla 1.

[0071] El polipéptido metabolizador de D-aminoácidos es una deshidratasa, por ejemplo, D-ser amoniaco liasa (anteriormente conocida como D-ser deshidratasa) o una oxidasa, por ejemplo, D-aminoácido oxidasa.
30

[0072] Otros polipéptidos metabolizadores de D-aminoácidos adecuados pueden ser variantes o fragmentos de polipéptidos ejemplificados en la Tabla 1. Las variantes o fragmentos de secuencias de polipéptidos naturales se describen en cualquier parte en el presente documento.

35 **[0073]** Un experto habitual puede determinar fácilmente usando técnicas rutinarias si un polipéptido posee una actividad metabolizadora de D-aminoácidos (es decir, es una enzima metabolizadora de D-aminoácidos), como se ha descrito anteriormente.

[0074] La identidad del D-aminoácido en el medio se determina por la especificidad del polipéptido
40 metabolizador de D-amino heterólogo que es expresado por la planta o célula de planta, es decir, el medio contiene el sustrato de D-aminoácido del polipéptido metabolizador de D-amino heterólogo. Por ejemplo, si la D-serina deshidratasa heteróloga es expresada por una planta, la D-serina está presente en el medio de crecimiento.

[0075] La expresión del transportador de aminoácidos en una planta que metaboliza D-aminoácidos puede
45 mostrar aumento del crecimiento en medios que comprenden D-aminoácidos con respecto a plantas similares que no expresan el transportador de aminoácidos, en particular cuando el D-aminoácido representa la única fuente de nitrógeno.

[0076] El transportador de aminoácidos media en la captación del D-aminoácido del medio en la planta para
50 permitir la reacción con el polipéptido metabolizador de D-amino. Por tanto, la identidad del transportador de aminoácidos expresada por la planta se determina por el D-aminoácido en el medio que, a su vez, está determinada por la especificidad del polipéptido metabolizador de D-amino.

[0077] Transportadores de aminoácidos adecuados se describen en más detalle anteriormente e incluyen
55 transportadores de aminoácidos de planta y de no planta, por ejemplo, transportadores de aminoácidos bacterianos tales como el transportador de aminoácidos *cycA* de *E. coli* que media en el transporte de glicina, D-alanina y D-serina.

[0078] La acumulación de productos del metabolismo de D-aminoácidos que incluyen, por ejemplo, diversos
60 ceto-ácidos y la producción de H_2O_2 por D-aminoácido oxidasas puede ser perjudicial para las plantas transgénicas. Por tanto, los procedimientos descritos en el presente documento pueden ser útiles en eliminar selectivamente plantas transgénicas de poblaciones mixtas o eliminar híbridos entre plantas transgénicas y plantas naturales de poblaciones naturales.

65 **[0079]** Un procedimiento para inhibir el crecimiento de una planta que metaboliza un D-aminoácido puede comprender;

expresar en la planta un transportador de aminoácidos que media en la captación del D-aminoácido, y; tratar la planta con el D-aminoácido, inhibiendo dicho tratamiento el crecimiento de la planta.

- 5 **[0080]** Un D-aminoácido adecuado puede ser no tóxico para la planta, pero puede ser metabolizado por la planta en un producto tóxico. Los D-aminoácidos que presentan baja toxicidad para plantas naturales, por ejemplo, D-ile, D-val, D-asn o D-gln, pero que, tras el metabolismo en plantas transgénicas que contienen D-aminoácido oxidasas exógenas, conducen a la producción de cetoácidos tóxicos y/o H₂O₂ tóxico, son particularmente adecuados para su uso en tales procedimientos.
- 10 **[0081]** Una planta que metaboliza un D-aminoácido puede producirse transformando una célula de planta con un ácido nucleico que codifica un polipéptido que metaboliza un D-aminoácido y regenerando la planta a partir de la célula.
- 15 **[0082]** Un transportador de aminoácidos puede expresarse usando cualquier técnica conveniente, como se ha descrito anteriormente. Un transportador de aminoácidos adecuado media en la captación del D-aminoácido del medio. Transportadores de aminoácidos adecuados se describen en más detalle anteriormente e incluyen transportadores de planta y de no planta tales como el polipéptido *cycA* de *E. coli*.
- 20 **[0083]** La planta puede oxidar un D-aminoácido, por ejemplo, por expresión de una D-aminoácido oxidasa. D-aminoácidos tales como D-ile y D-val tienen baja toxicidad para plantas naturales, pero son metabolizados en los cetoácidos tóxicos 3-metil-2-oxopentanoato y 3-metil-2-oxobutanoato, respectivamente, por plantas que expresan una D-aminoácido oxidasa. Por tanto, la exposición de plantas que expresan una D-aminoácido oxidasa en compuestos tales como D-ile o D-val, derivados de estos u otros compuestos que tras la actividad de la D-
- 25 aminoácido oxidasa producen productos tóxicos puede usarse para inhibir selectivamente el crecimiento de tales plantas.
- [0084]** Por tanto, la adición de un D-aminoácido puede usarse para inhibir o reducir el crecimiento o viabilidad de una planta transgénica que tiene una actividad de D-aminoácido oxidasa.
- 30 **[0085]** En el presente documento se desvelan procedimientos de producción de plantas transgénicas que son útiles en los presentes procedimientos. Una planta adecuada para su uso en los procedimientos descritos en el presente documento puede producirse:
- 35 proporcionando una célula de planta que comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido que metaboliza un D-aminoácido, transformando la célula de planta con un ácido nucleico que codifica un transportador de aminoácidos que media en la captación del D-aminoácido; y, regenerando dicha planta a partir de dicha célula.
- 40 **[0086]** La planta puede regenerarse sobre un sustrato que comprende un D-aminoácido que puede ser, por ejemplo, la única fuente de nitrógeno en el medio.
- [0087]** En el presente documento también se desvela una célula de planta que comprende un primer ácido
- 45 nucleico heterólogo que codifica un polipéptido que metaboliza un D-aminoácido,
- en la que la célula de planta comprende además un segundo ácido nucleico heterólogo que codifica un transportador de aminoácidos que media en la captación del D-aminoácido.
- 50 **[0088]** El primer y el segundo ácido nucleico pueden estar contenidos en construcciones o vectores de ácidos nucleicos. El primer y el segundo ácido nucleico pueden estar contenidos en el mismo vector de expresión o diferentes vectores de expresión en dicha célula.
- [0089]** El primer y el segundo ácido nucleico ácido nucleico pueden ser extra-cromosómicos o pueden estar
- 55 integrados en el cromosoma de la célula.
- [0090]** Puede haber más de una secuencia de nucleótidos heteróloga por genoma haploide. Esto permite, por ejemplo, aumentar la expresión del producto génico en comparación con niveles endógenos.
- 60 **[0091]** Los ácidos nucleicos pueden estar operativamente ligados a elementos reguladores para la expresión. Elementos adecuados se describen anteriormente e incluyen promotores de genes externamente inducibles, por ejemplo, para poner la expresión bajo el control del usuario.
- [0092]** Una célula de planta puede contener la primera y segunda secuencias de ácidos nucleicos como
- 65 resultado de la introducción de las secuencias de ácidos nucleicos en la célula o una célula primitiva.

- [0093]** Como se describe en el presente documento, la expresión del transportador de aminoácidos y el polipéptido metabolizador de D-aminoácidos del ácido nucleico codificante puede usarse para seleccionar transformantes que contienen el primer y el segundo ácido nucleico como se describe en el presente documento. Un vector puede comprender adicionalmente un marcador genético de selección que consiste en un gen quimérico que confiere un fenotipo de selección tal como resistencia a un antibiótico tal como kanamicina, higromicina, fosfotricina, clorsulfuron, metotrexato, gentamicina, espectinomicina, imidazolinonas y glifosato. Esto permite un segundo nivel de selección, si se desea, además de selección usando el transportador de aminoácidos y polipéptido metabolizador de D-aminoácidos.
- 10 **[0094]** Una célula de planta como se describe en el presente documento puede estar comprendida en una planta, una parte de planta o una propágula de planta, o un extracto o derivado de una planta como se describe más adelante. Una planta puede regenerarse a partir de una o más células como se ha descrito anteriormente. La descendencia o descendientes de la planta regenerada pueden luego propagarse o cultivarse sexualmente o asexualmente.
- 15 **[0095]** Una planta que comprende una célula como se describe en el presente documento puede expresar el polipéptido metabolizador de D-aminoácidos codificado y transportador de aminoácidos y así puede tener tolerancia a D-aminoácidos potenciada y puede seleccionarse usando tratamiento con D-aminoácidos.
- 20 **[0096]** También se proporcionan plantas que incluyen una célula de planta como se describe en el presente documento, junto con cualquier parte o propágula de la misma, semilla, progenie autofecundada o híbrida y descendientes. Particularmente se proporcionan monocotiledóneas, dicotiledóneas, gimnospermas, angiospermas y algas transgénicas, helechos y musgos. Son de particular interés plantas superiores transgénicas, especialmente cultivos agrícolas y forestales, por ejemplo, cereales, árboles y flores ornamentales, que han sido manipuladas para llevar una construcción de ácidos nucleicos como se ha descrito anteriormente.
- 25 **[0097]** Ejemplos de plantas adecuadas incluyen tabaco, cucurbitáceas, zanahoria, verduras crucíferas, melones, pimientos, vides, lechuga, fresa, plantas de cultivo tales como crucíferas oleaginosas, remolacha azucarera, trigo, cebada, maíz y arroz, soja, guisantes, sorgo, girasol, tomate, patata, pimienta, crisantemo, clavel, álamo, eucalipto, algodón, goma, linaza, bambú, goma arábica, plantas que llevan fruto tales como manzana, ciruela, pera, banana, naranja, kiwi, limón, cereza, uva e higo, cáñamo, píceas, abedul, cacahuete, centeno y pino.
- [0098]** Además de una planta, en el presente documento se desvela cualquier clon de una planta tal, semilla, progenie autofecundada o híbrida y descendientes, y cualquier parte o propágula de cualquiera de éstos, tal como esquejes y semilla, que pueden usarse en reproducción o propagación, sexual o asexual. En el presente documento también se desvela una planta que es una cría, clon o descendiente sexualmente o asexualmente propagado de una planta tal, o cualquier parte o propágula de dicha planta, cría, clon o descendiente.
- 35 **[0099]** Pueden realizarse experimentos de control según convenga en los procedimientos descritos en el presente documento. El rendimiento de controles adecuados está perfectamente dentro de la competencia y capacidad de una persona experta en el campo.
- 40 **[0100]** Varios otros aspectos y realizaciones de la presente invención serán evidentes para aquellos expertos en la materia en vista de la presente divulgación.
- 45 **[0101]** Ciertos aspectos y realizaciones de la invención se ilustrarán ahora a modo de ejemplo y con referencia a las figuras descritas anteriormente y tablas descritas más adelante.
- 50 La Figura 1 muestra el crecimiento de plantas de *A. thaliana* en medio de MS a ½ de concentración en el que todos los compuestos de nitrógeno han sido intercambiados por D-serina 3 mM. El crecimiento de plantas que llevan el gen *dsdA* que codifica D-serina amoniacio liasa de *E. coli* se comparó con el de plantas que llevan tanto el gen *dsdA* como *cycA* de *E. coli* y que codifica el transportador de D-serina/D-alanina.
- 55 La Figura 2 muestra velocidades de captación de aminoácidos por *A. thaliana* medidas como tasas de agotamiento de una disolución externa. Plantas naturales del ecotipo Col-0 se comparan con plantas que llevan una inserción de T-ADN en el gen LHT1 que codifica el transportador de aminoácidos nol de lisina-histidina.
- 60 La Figura 3 muestra la contribución de L-alanina N y L-glutamina N (Ala y Gln, respectivamente) a la nutrición de N de plantas de *Arabidopsis thaliana* naturales cultivadas estériles (*wt*) y plantas que carecen de la expresión del transportador 1 de lisina-histidina (T27). El eje x es la fracción de N que se origina a partir de aminoácidos.
- 65 La Figura 4 muestra el crecimiento de *A. thaliana* natural (*wt*) y transgénica que expresa el transportador de *cycA* bacteriano sobre diferentes concentraciones de glicina. Las plantas se cultivaron en medio de agar estéril basado en medio de MS a ½ de concentración en el que el nitrógeno se suministró como glicina sola. *Cyc4:2*, *cyc7:2* y *cyc8:2* se refiere a tres líneas transgénicas diferentes.

Experimentos

Materiales y procedimientos

5

Transformación de Arabidopsis con cycA

[0102] Se realizaron manipulaciones de ADN por técnicas convencionales (Sambrook y Russell, 2001). El gen de *E. coli cycA* se clonó por PCR usando los cebadores de PCR 5-

10 GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCATGGTAGATCAGGTAAGTCGTT y 5'-
GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGGTTATTTCCGCAGTTCAGC, los fragmentos de PCR se recombinaron en pDONR y posteriormente se recombinaron en el casete de expresión de 35S de CaMV del vector binario pH7WG2D. El vector se analizó por secuenciación y restricción enzimática.

15 **[0103]** Plantas de *A. thaliana* transgénicas que llevan el gen *dsdA* de *E. coli* (Erikson y col. 2005, Plant Mol Biol 57, 425-433) se transformaron con la cepa GV3101::pMP90 RK de *Agrobacterium tumefaciens* mediante infiltración a vacío *in planta* como se describe por Clough y Bent (1998). Se seleccionaron semillas T₁ sobre higromicina. Todas las líneas individuales aisladas se cribaron con PCR, amplificando el gen *cycA* para confirmar la integración del transgén.

20

Crecimiento de plantas sobre placas de Petri

[0104] Se usó MS a mitad de concentración libre de nitrógeno con 0,5% en peso/volumen de agar y 0,5% en peso/volumen de sacarosa y tamponado a pH 5,8 con tampón MES (ácido 2N-morfolinoetanosulfónico) en todos los
25 cribados y experimentos. Este medio se modificó con diferentes fuentes de N como se describe más adelante.

Selección de mutantes de EMS y T-ADN

[0105] Excepto *Arabidopsis thaliana* natural (Col-0), se usaron dos tipos de *Arabidopsis* en los experimentos;
30 mutantes por inserción de T-ADN y mutantes por sulfonato de etilmetano (EMS).

[0106] Semillas de 77 líneas mutantes por T-ADN que representan mutaciones en 46 genes individuales que codifican o que codifican putativamente transportadores de aminoácidos se obtuvieron de Nottingham seed stock center (NASC). Aproximadamente 1 gramo de semillas con EMS se obtuvieron de Lehle seed.

35

[0107] El cribado de mutaciones en absorción de raíz de aminoácidos se realizó extendiendo semillas sobre placas que contenían niveles tóxicos de D-aminoácidos.

[0108] Las placas para cribar líneas mutantes contuvieron los medios convencionales descritos anteriormente
40 modificados tanto con D-alanina 3 mM como D-serina 3 mM. Los D-aminoácidos se esterilizaron por filtración y se añadieron después de esterilizarse en autoclave. Las semillas se esterilizaron superficialmente y se sembraron en placas de Petri que se taparon con cinta permeable al gas. Todas las semillas se trataron en frío durante dos días a 4°C después de sembrar hasta germinación uniforme.

45 **[0109]** Varias plantas con EMS y una línea de inserción de T-ADN se identificaron como resistentes a D-alanina, mientras que no se encontró que ninguna de las líneas fuera resistente a D-serina. Las plantas con EMS se trasladaron a la tierra y se autopropearon. Sólo se encontró una línea con EMS que fuera resistente a D-alanina.

[0110] La línea de genes inactivados superviviente a D-alanina se correspondió con una inserción de T-ADN
50 en el exón del transportador 1 de lisina-histidina (LHT1). Después de la primera selección, el mutante de LHT1 se sometió a análisis genéticos. Se usó PCR para comprobar si la mutación por inserción era recesiva o dominante. El análisis por PCR mostró homocigosidad por inserción en las plantas que sobrevivieron a selección con D-alanina, además, la cría de plantas parentales heterocigóticas segregó 3 sensibles con respecto a 1 resistente sobre D-alanina, que indica que la mutación fue recesiva.

55

[0111] Para investigar si el mutante por EMS y los mutantes por inserción de T-ADN fueron alélicos se cruzaron las dos líneas mutantes diferentes. Se encontró que la progenie (T1) de este cruce era resistente a D-alanina. Las plantas supervivientes también se sometieron a análisis por PCR, que mostró que las inserciones de T-ADN fueron heterocigóticas, corroborando que los mutantes fueron de hecho alélicos.

60

[0112] La secuenciación del gen LHT1 del mutante por EMS identificado como resistente a D-alanina mostró una única sustitución del nucleótido g/a que, basándose en el modelo génico de TAIR At5 g40780.1, produjo un cambio del codón trp66 nativo con un codón de terminación, aboliéndose así la producción de LHT1 también en esta planta.

65

Experimentos de ¹⁵N con líneas mutantes de LHT1

[0113] Semillas naturales y semillas de líneas de T-ADN y EMS se sembraron sobre placas de agar que contenían medio de MS a ½ de concentración con N suministrado como una mezcla de NO₃⁻ 3 mM y tanto L-¹⁵N-glutamina 30 μM, L-¹⁵N-alanina 30 μM como L-¹⁵N lisina 30 μM. Cada placa contuvo 100 ml de medio. La concentración de ¹⁵N de los aminoácidos suministrados fue >98% para L-alanina y > 49% para L-glutamina y L-lisina. Se prepararon ocho placas por duplicado con tres semillas cada una para cada tipo de planta y tratamiento. Se incubaron placas de agar en una sala fría durante dos días y luego se transfirieron a una cámara climática; periodo de luz de 16 h, temp 24°C.

10 **[0114]** Después de 14 días se recogieron cinco placas aleatoriamente seleccionadas. Las raíces se aclararon y se limpiaron minuciosamente tres veces en CaCl₂ 0,5 mM para eliminar el ¹⁵N de las superficies. Las plantas se secaron a 60°C durante la noche, se pesaron y se homogeneizaron. Finalmente, las muestras se analizaron para contenido de N total y la abundancia de ¹⁵N en un espectrómetro de masas de relaciones isotópicas de Europa Scientific.

15

*Experimentos de crecimiento**Crecimiento de plantas dsdA y cycAxdsdA*

20 **[0115]** Se cultivaron plantas en medio de MS sin N a ½ de concentración descrito anteriormente y se modificó con D-serina 3 mM como única fuente de N. Las plantas se cultivaron durante 20 días en una sala de crecimiento bajo las condiciones convencionales descritas anteriormente.

Crecimiento de líneas mutantes de LHT1

25

[0116] Semillas naturales y semillas de líneas de T-ADN y EMS se sembraron sobre medio de MS a ½ de concentración sin N descrito anteriormente y se modificó con tanto NO₃⁻ 3 mM; L-glutamina 1,5 mM + NO₃⁻ 3 mM como L-alanina 3 mM + NO₃⁻ 3 mM. Se prepararon ocho placas por duplicado, conteniendo cada una 25 ml de medio con tres semillas cada una para cada línea de semilla y tratamiento. Después de la siembra, las placas de agar se incubaron en una sala fría durante dos días y luego se transfirieron a una cámara climática, periodo de luz de 16 h y 24°C. Después de 20 días, las plantas se recogieron, se secaron a 60°C y se pesaron.

30

Experimento de captación con líneas mutantes de LHT1

35 **[0117]** Semillas naturales y semillas de líneas de T-ADN y EMS se sembraron en tubos Eppendorf de 1,5 ml rellenos de agar. Se cortaron la tapa y el fondo de vial, y el vial se dispuso en portaviales Eppendorf puestos en cajas de crecimiento con disolución de nutriente. El fin con este sistema era permitir el contacto entre el agar en los tubos y la disolución en la caja, de manera que las raíces pudieran cultivarse en la disolución. Las cajas de crecimiento se llenaron con una disolución de nutriente que contenía: L-Gly 1 mM, NH₄NO₃ 1 mM, K₂HPO₄ 0,6 mM, CaSO₄ 0,3 mM, MgSO₄ 0,55 mM, KCl 35 μM, FeNa-EDTA 50 μM, H₃BO₃ 35 μM, MnSO₄ 7 μM, ZnSO₄ 1,5 μM, CuSO₄ 1 μM, (NH₄)₆Mo₇O₂₄ 0,05 μM y tamponada a pH 5,8 con MES.

40

[0118] Después de sembrar, las cajas se incubaron en una sala fría durante dos días y luego se transfirieron a una cámara climática; periodo de luz de 8 h, temp 24/18 grados (día/noche).

45

[0119] Después de 18 días, las plantas más sanas se seleccionaron y las plantas identificadas se transfirieron a cajas individuales. Durante los 18 primeros días, la aireación de las cajas se llevó a cabo mediante difusión mediante un filtro en la tapa, pero el resto (después de 18 días) del hidrocultivo las cajas se airearon bombeando aire esterilizado por filtración a través de una jeringuilla que se inyectó a través de la tapa y en contacto con la disolución de nutriente. Durante todo el experimento se desecharon las unidades de crecimiento que mostraron signos de infección. Después de 39 días de crecimiento, las plantas más grandes se seleccionaron para el experimento de captación. Se usaron tres plantas de cada línea en los experimentos de captación.

50

[0120] El experimento de captación se llevó a cabo en placas preparadas por encargo, cada una con un orificio perforado que se ajustó a un cilindro de plástico que se diseñó para fijar un vial Eppendorf. Este sistema permitió un experimento en el que se minimizó la evaporación. El cilindro de plástico con tubos de Eppendorf (que contiene una planta) se ajustó a la placa de manera que la raíz, pero no el brote, estuviera en contacto con la disolución de captación. Además, se puso cuidado en garantizar que el tubo Eppendorf no estuviera en contacto con la disolución. La disolución de captación fue idéntica a la disolución de nutriente usada durante el cultivo de plantas, pero todas las fuentes de nitrógeno se sustituyeron con una mezcla de aminoácidos compuesta por 25 μM de cada uno de los siguientes aminoácidos D-ala, L-ala, D-ser, L-ser, L-lys, L-his, L-gln, L-glu y gly. Cada placa se llenó con 10 ml de esta disolución.

60

[0121] El experimento de captación tuvo una duración de 5 h con muestreo cada hora y se llevó a cabo en una cámara climática sobre una mesa agitadora. En cada muestreo se extrajeron 120 μl de disolución, se

65

transfirieron a un vial Eppendorf y se congelaron inmediatamente.

[0122] Después de 5 h, la disolución restante se pesó para determinar la pérdida evapotranspiracional de agua. Las raíces de las plantas se secaron y se pesaron. Las velocidad de captación ($\mu\text{mol/g}$ de raíz en peso seco/h) se calcularon como el promedio de las diferencias de concentración entre cada muestreo (con concentración original como la primera referencia). En los cálculos, la pérdida evapotranspiracional se compensó asumiendo que la evapotranspiración fue lineal con el tiempo.

Análisis

[0123] Se analizaron D- y L- aminoácidos por RP-HPLC de sus derivados de orto-ftaldialdehído según Brückner y col. 1991 (Chromatographia, 32: 383-388).

Resultados

Crecimiento alterado de plantas mediante expresión alterada de transportadores de aminoácidos

[0124] La expresión de enzimas metabolizadoras de D-aminoácidos en plantas abole el efecto negativo de D-aminoácidos y permite que las plantas usen estos compuestos como fuentes de nitrógeno para el crecimiento (Erikson, O y col. 2004 Nature Biotechnology, 22: 455-458).

[0125] Se cultivaron plantas sobre D-serina como única fuente de nitrógeno. El crecimiento mediado por D-serina de plantas *dsdA* que llevan el gen de *E. coli cycA*, que codifica el transportador de D-serina/D-alanina, se comparó con plantas que sólo llevan el gen *dsdA* (Fig. 1). Se mostró que el crecimiento mediado por D-serina aumentó drásticamente mediante la expresión del gen *cycA*. Esto muestra que el crecimiento de plantas sobre aminoácidos puede aumentarse por la expresión de un gen heterólogo que codifica un transportador de aminoácidos.

[0126] En un segundo experimento se mostró la importancia de la expresión de transportadores de aminoácidos para crecimiento mediado por aminoácidos. En primer lugar, la caracterización funcional de mutantes de genes inactivados de LHT1 con respecto a la tasa de captación por las raíces de L-aminoácidos mostró que varios L-aminoácidos fueron absorbidos a menores velocidades en comparación con las plantas naturales (Fig. 2).

[0127] En segundo lugar, el crecimiento de plantas defectuoso en el gen LHT1 tanto producido por una inserción de T-ADN (línea T27) como producido por mutagénesis aleatoria tras el tratamiento con EMS y selección sobre D-alanina (línea EMS-A) fue significativamente menor sobre mezclas de nitrato y aminoácidos en comparación con el de plantas naturales. Sin embargo, el crecimiento de plantas defectuosas en LHT1 sobre nitrato como única fuente de nitrógeno no fue diferente de plantas naturales.

[0128] La contribución de L-alanina N y L-glutamina N (Ala y Gln, respectivamente) a la nutrición de N se determinó en plantas de *Arabidopsis thaliana* naturales (wt) cultivadas estériles y plantas que carecían de la expresión del transportador 1 de lisina-histidina (T27). Las plantas se cultivaron sobre medio de MS a $\frac{1}{2}$ de concentración en el que todo el N se intercambió por NO_3^- 3 mM y tanto L-alanina como L-glutamina 30 μM . Los aminoácidos suministrados se marcaron (98%) con ^{15}N de manera que la captación de N de estas fuentes pudiera distinguirse de la captación de nitrato. Los resultados se muestran en la Figura 3. Se observaron que N de L-alanina y L-glutamina hicieron una contribución reducida al crecimiento en plantas que carecían de expresión del transportador 1 de lisina-histidina.

[0129] Las plantas de *A. thaliana* naturales y transgénicas que llevan el gen de *E. coli cycA* se cultivaron en medio de agar estéril basado en medio de MS a $\frac{1}{2}$ de concentración en el que se suministró nitrógeno como glicina. Se comparó el crecimiento mediado por glicina de las plantas naturales y transgénicas (Fig. 4).

[0130] Se observó que las plantas transgénicas mostraron un aumento del crecimiento mediado por glicina con respecto a controles naturales.

Tabla 1

Enzima	Número de acceso (base de datos de proteínas Brenda)	Organismo fuente	Sustrato
Deshidratasa			
D-Serina deshidratasa	Número EC 4.2.1.14	- <i>E. intermedia</i> - <i>E. coli</i> - <i>Klebsiella pneumoniae</i> - Pollo	- D-Ser - D-Thr - D-alotreonina
Oxidasas			

ES 2 398 705 T3

Enzima	Número de acceso (base de datos de proteínas Brenda)	Organismo fuente	Sustrato
D-Aminoácido oxidasa	Número EC 1.4.3.3	- Cerdo - Ser humano - Rata - <i>Candida tropicalis</i> - <i>Trigonopsis variabilis</i> - <i>Neuspora crassa</i> - <i>Chlorella vulgaris</i> - <i>Rhodotorula gracilis</i>	- La mayoría de los D-aminoácidos
D-Glutamato oxidasa	Número EC 1.4.3.7	- <i>Octopus vulgaris</i> - <i>Orconectes limosus</i>	-D-Asp -D-Glu
D-Aspartato oxidasa	Número EC 1.4.3.1	- Conejo - Ser humano - Cerdo - Bovino - Bos taurus	-D-Asp -D-Glu -N-metil-D-Asp -Meso-2,3-diaminosuccinato (relevancia desconocida) -cis-Tiazolidin-2,4-dicarboxilato (relevancia desconocida)
Racemasas			
D-Glutamato racemasa	Número EC 5.1.1.3	- <i>Lactobacillus sp</i> - <i>Pediococcus pentosaceus</i> - <i>E. coli</i>	- D/L-Glu
<u>Transaminasas</u>			
D-Metionina transaminasa	Número EC 2.6.1.21	- <i>Brassica sp mitochondria</i>	- D-Metionina
D-Alanina transaminasa	Número EC 2.6.1.21	- <i>Bacillus sp.</i> - <i>Listeria monocytogenes</i> - Bacteria termófila	- D-Arg - D-Ala - D-Asp - D-Glu - D-Lue - D-Lys - D-Met - D-Phe - D-Norvalina

Tabla 2

Gen	Especie	Entrada de Genbank	Nº de referencia	Nº de referencia
Aux-1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	CAA67308.1 GI:1531758	Q96247	2.A.18.1.1
AAP1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	CAA47603.1 GI:22641	Q42400	2.A.18.2.1
LHT1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AAC49885.1 GI:2576361	024405	2.A.18.2.2
AAP3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	CAA54630.1 GI:3970652	Q39134	2.A.18.2.3
AAP6	<i>Arabidopsis thaliana</i>	CAA65051.1 GI:1769887	P92934	2.A.18.2.4
AAP8	<i>Arabidopsis thaliana</i>		080592	2.A.18.2.5
Prt1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	CAA65052.1 GI:1769901	P92961	2.A.18.3.1
ProT1	<i>Lycopersicon esculentum</i>		Q9XE48	2.A.18.3.2
MTR aka AAP1	<i>Neurospora crassa</i>	P38680 GI:2507070	P38680	2.A.18.4.1
GAP1	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	NP_110007.1 GI:13508058	ID de gen: 876937	
Bap2p	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NP_009624.1 GI:6319542	ID de gen: 852360	
cycA	<i>Escherichia coli</i>	NP_418629.1 GI:16132030	ID de gen: 948725	

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de aumentar el crecimiento de una planta que comprende:
 - 5 aumentar en la planta la expresión de un ácido nucleico que codifica un transportador de aminoácidos que media en la captación de aminoácidos del entorno en dicha planta, y;
exponer la planta a un medio de crecimiento que comprende uno o más aminoácidos cuya captación está mediada por el transportador de aminoácidos,
siendo aumentado el crecimiento de dicha planta tras dicha expresión.
- 10 2. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que el ácido nucleico está operativamente ligado a un elemento regulador heterólogo.
3. Un procedimiento según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el ácido nucleico es un
15 ácido nucleico heterólogo.
4. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el transportador de aminoácidos se expresa específicamente en el tejido de raíz de la planta.
- 20 5. Un procedimiento según la reivindicación 4, en el que dicho transportador de aminoácidos se expresa específicamente en el pelo de raíz de la planta.
6. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende exponer las raíces de la planta al medio de crecimiento.
- 25 7. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende añadir al medio de crecimiento uno o más aminoácidos cuya captación está mediada por el transportador de aminoácidos.
8. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el uno o más
30 aminoácidos son la única fuente de nitrógeno en el medio de crecimiento.
9. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el transportador de aminoácidos es un transportador de aminoácidos de planta.
- 35 10. Un procedimiento según la reivindicación 9, en el que el transportador de aminoácidos es un transportador de aminoácidos AAP.
11. Un procedimiento según la reivindicación 10, en el que el transportador de aminoácidos es un transportador de aminoácidos AAP1, AAP3, AAP6 o AAP8.
- 40 12. Un procedimiento según la reivindicación 9, en el que el transportador de aminoácidos es un transportador de aminoácidos LHT.
13. Un procedimiento según la reivindicación 12, en el que el transportador de aminoácidos es un
45 transportador de aminoácidos LHT1.
14. Un procedimiento según la reivindicación 13, en el que el transportador de aminoácidos LHT1 es LHT1 de *Arabidopsis*.
- 50 15. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el transportador de aminoácidos es un transportador de aminoácidos bacteriano.

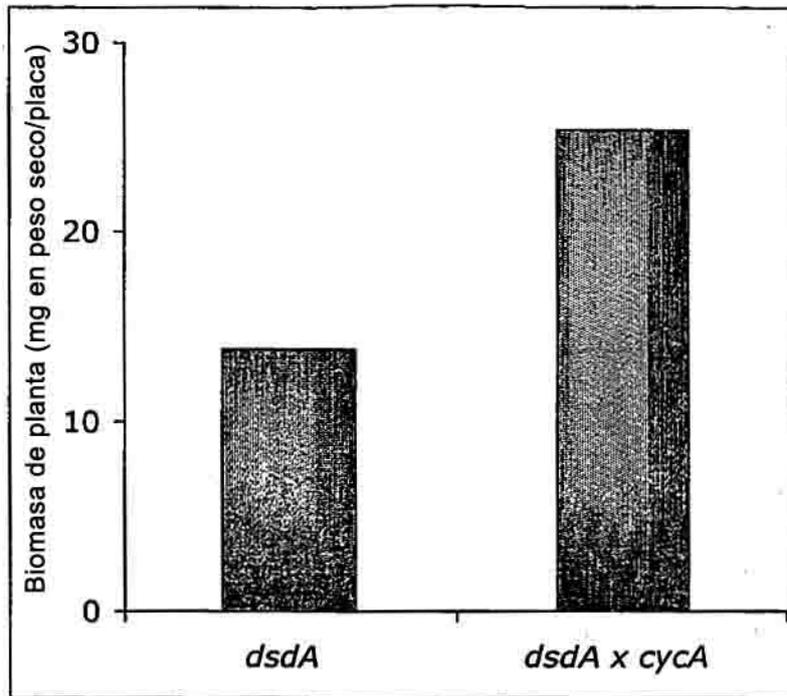


Figura 1

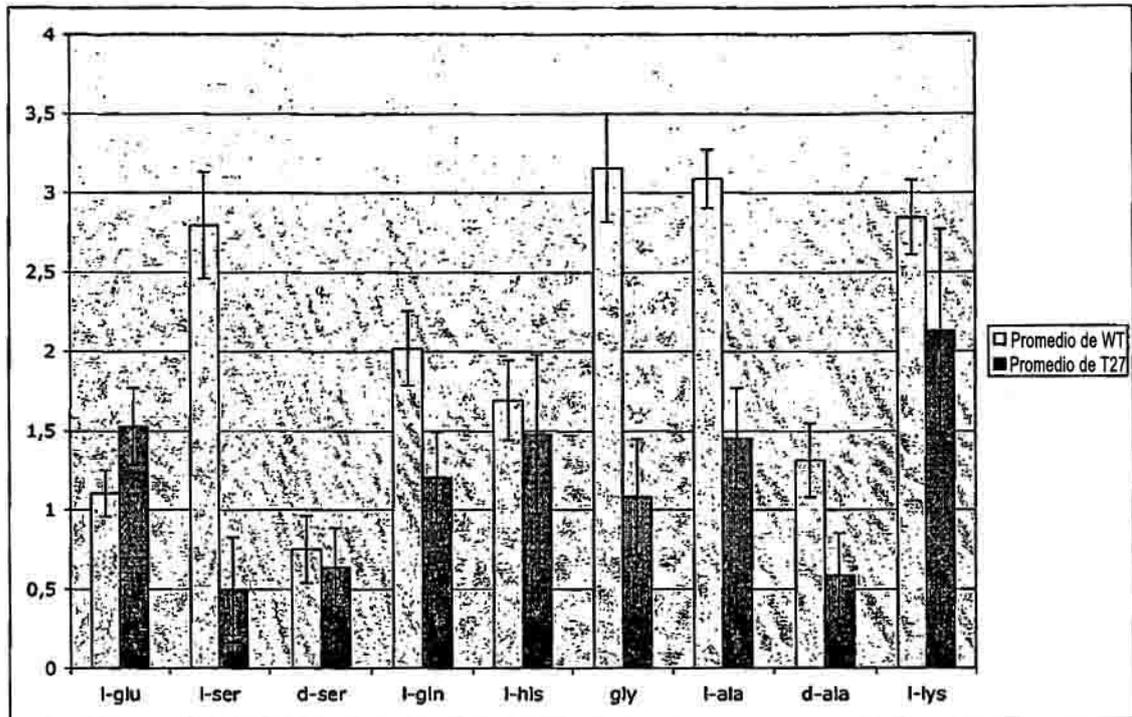


Figura 2

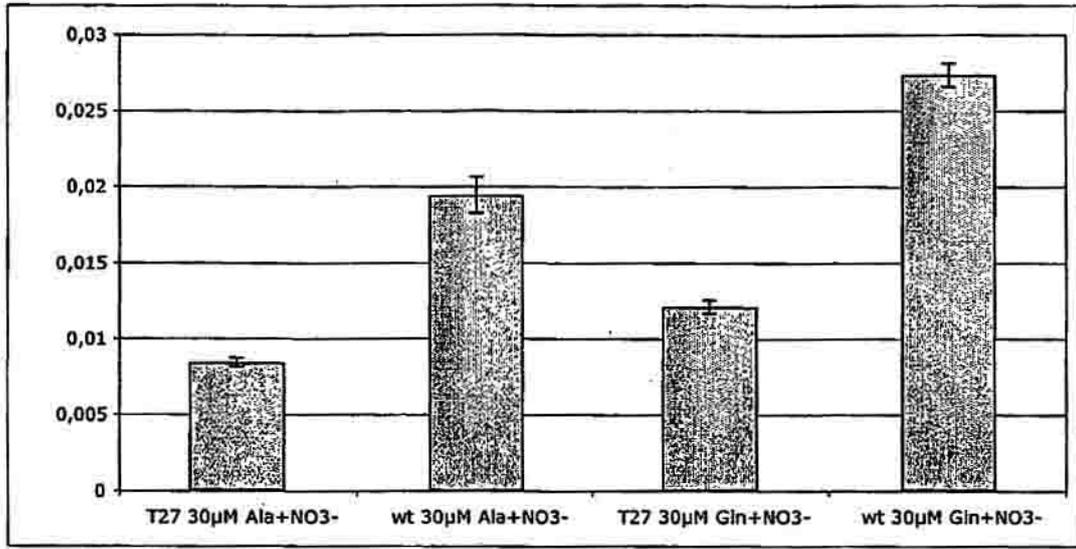


Figura 3

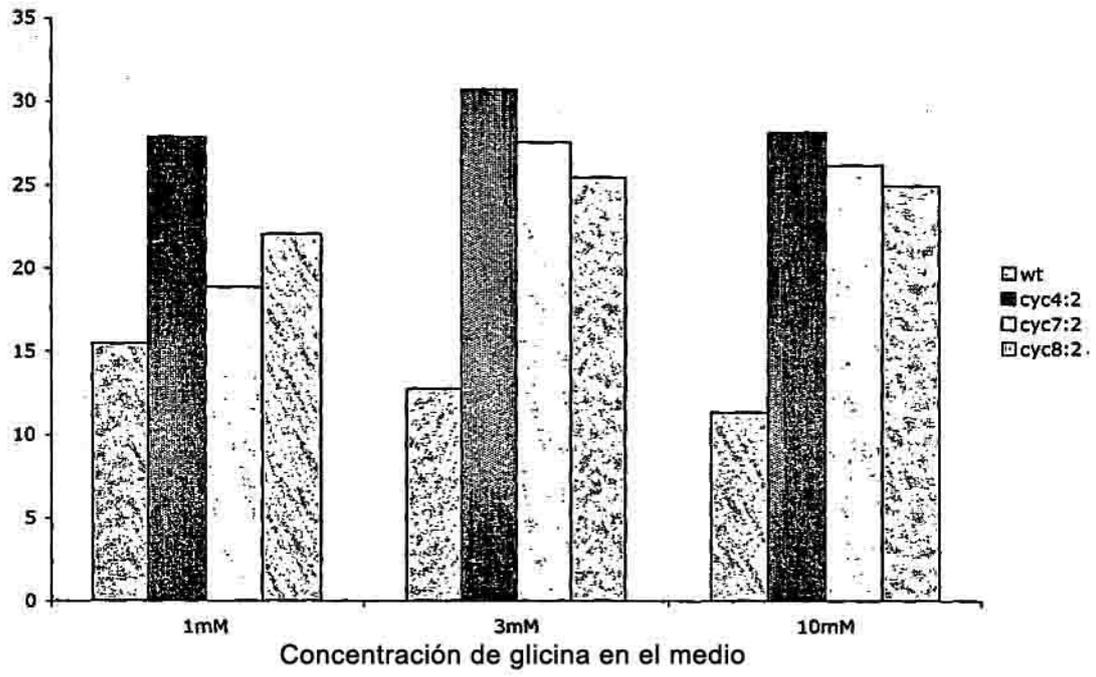


Figura 4