

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 619 002**

51 Int. Cl.:

C12N 9/00 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.11.2012 PCT/IL2012/050433**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.05.2013 WO2013065048**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.11.2012 E 12795622 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.12.2016 EP 2773752**

54 Título: **Plantas transgénicas resistentes a aminoácidos no proteicos**

30 Prioridad:

03.11.2011 US 201161554993 P

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

22.06.2017

73 Titular/es:

**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD.
(100.0%)
At the Weizmann Institute of Science, P.O. Box 95
76100 Rehovot, IL**

72 Inventor/es:

**SAFRO, MARK;
KLIPCAN, LIRON;
MAYMON, INBAR y
FINAROV, IGAL**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 619 002 T3

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

DESCRIPCIÓN

Plantas transgénicas resistentes a aminoácidos no proteicos

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere a plantas transgénicas resistentes a bio-herbicidas, en particular a fitotóxicos ácidos no aminoácidos de proteínas que incluyen análogo de aminoácido de meta-tirosina y sales de los mismos y métodos para producir las plantas transgénicas.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] "Alelopatía" es un término que se refiere a un efecto (inhibidor o estimulador) de una planta de la especie que rodean por productos químicos (aleloquímicos) liberado por la planta en el medio ambiente. Los aleloquímicos son habitualmente metabolitos secundarios que pueden ser sintetizados en cualquiera de las partes de la planta, y pueden tener efectos beneficiosos (alelopatía positiva) o perjudiciales (alelopatía negativa) sobre los organismos diana. Los productos alleloquímicos no son necesarios para el metabolismo (crecimiento, desarrollo y reproducción) de la planta alelopática (resistente), pero interfieren con vías metabólicas vitales de especies no resistentes que proporcionan una ventaja relativa a la planta resistente. El efecto alelopático se realizó ya en la época griega. Se conoce y se utiliza la ventaja del efecto alelopático de varias plantas de cultivo ampliamente utilizadas, tales como trigo, arroz y pepino. Últimamente ha aumentado la conciencia del potencial para implementar este fenómeno en el manejo de malezas. Entre otros productos aleloquímicos observados, la meta-tirosina, que muestra una actividad fitotóxica prometedor, se propuso como posible supresor de malezas amigable con el medio ambiente (Bertin C. et al., 2007. Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A 104, 16964-16969).

25

[0003] Meta-tirosina (m-Tyr) es un aminoácido no proteico de origen natural. Puede ser producida por dos posibles rutas de síntesis: a través de la vía de síntesis de dopamina o por oxidación de fenilalanina por especies reactivas de oxígeno. El m-Tyr, un isómero de tirosina de aminoácido de proteína común (p-tirosina), se ha encontrado en *Euphorbia myrsinites* (tártago de cola de burro) y algunas especies de festuca. Con origen en las plantas, se encontró que el m-Tyr era tóxico para un amplio espectro de especies. En una concentración tan baja como 2 μ M añadida a un medio de agar m-Tyr inhibe el crecimiento de raíces de *Arabidopsis thaliana* por 50%, y completamente impide la germinación de semillas a una concentración de 50 μ M (Bertin C. et al. 2007, *ibid*).

30

[0004] La aparición de m-tirosina (m-Tyr), junto con o-tirosina (o-Tyr) y L-dopa dentro de las proteínas ha sido ampliamente utilizada como un índice para el grado de daño oxidativo causado a las proteínas. Se ha demostrado que en células eucariotas, ciertos aminoácidos oxidados exógenamente suministrados, incluyendo m-Tyr, pueden ser incorporados a proteínas por las vías biosintéticas de células en lugar de a través de reacciones químicas. Por tanto, es probable que en muchos casos, los aminoácidos dañados *in vivo* están disponibles para la síntesis de novo de proteínas. Esta teoría es apoyada por el hallazgo de que la exposición a m-Tyr resulta en la inhibición del crecimiento de una amplia gama de especies vegetales incluyendo plantas de cosecha de monocotiledóneas y dicotiledóneas comercialmente importantes. Se ha sugerido además que la fitotoxicidad de m-Tyr es causada por su incorporación en proteínas en lugar de fenilalanina durante la síntesis de proteínas.

35

40

[0005] Sintetasa de fenilalanilo-ARNt (PheRS) pertenece a la familia de sintetetas de aminoacilo-ARNt (aaRS), que desempeñan un papel fundamental en la traducción del código genético. Los aaRSs aseguran la fidelidad de la traducción del código genético, uniendo covalentemente aminoácidos apropiados a las correspondientes moléculas adaptadoras de ácido nucleico - ARNt. El aaRSs son una familia notoriamente diversa de enzimas, que varía considerablemente en la secuencia primaria, el tamaño y la organización de la subunidad oligomérica. Los análisis filogenéticos y estructurales revelan tres formas principales de PheRS: a) PheRS heterotetraméricas ($\alpha\beta$)₂ bacterianas; b) PheRS heterotetraméricas ($\alpha\beta$)₂ archaea/eucariotas-citoplasmáticas; y c) PheRS mitocondriales monoméricas.

45

50

[0006] La precisión de la reacción de aminoacilación promovida por aaRSs, y PheRS en particular, se basa en el reconocimiento preciso del sustrato de aminoácido. Sin embargo, debido a la similitud estereoquímica compartida por varios aminoácidos, se producen errores en el reconocimiento. La fenilalanina (Phe) y la tirosina (Tyr) se distinguen por un solo grupo hidroxilo en el anillo aromático y, por lo tanto, la diferenciación entre Phe y Tyr no siempre se cumple. PheRS diferencia con éxito entre estos aminoácidos con una tasa de errores de 1:1000. Un nivel más alto de exactitud total de la biosíntesis de proteínas está garantizado por una actividad de edición de PheRS junto con otros aaRSs. La actividad de edición está asociada con el sitio específico, donde los ARNts misacilados son hidrolizados.

55

60

[0007] Algunos de los inventores de la presente invención y colaboradores investigaron la capacidad de PheRSs de varias fuentes, incluyendo la bacteriana (*Thermus thermophilus* (Tt) y *Escherichia coli* (Ec)) y humana (citoplasmática (HSCT) y mitocondrial (hsmt)) para activar la fuente m-Tyr y adjuntarlo a ARNt^{Phe} (Klipcan, L., et al., 2009. Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A 106, 11045-11048). El aminoácido dañado por los radicales es activado por estas enzimas como se ensaya mediante hidrólisis de ATP. Mediciones cinéticas de estado

65

estacionario de aminoacilación (ensayada por medio de electroforesis en gel de ácido) no revelaron cobro indebido de ARNt^{Phe} con m-Tyr por PheRS bacterianas (Fig. 1). Esta observación sirve como indicación de la eficiencia del mecanismo de edición. Por otra parte, cuando se incuban las PheRS bacterianas con m-Tyr-ARNt^{Phe} precargado, el m-Tyr se desaciló de la ARNt proporcionando evidencia de la denominada actividad de edición de trans (Ling, J. et al., 2007. Proceedings of the National Academy of Sciences EE.UU. 104, 72-77). Por el contrario, la enzima mitocondrial podría de forma estable sintetizar m-Tyr-ARNt^{Phe}. Las PheRS *hsmt* no contiene el dominio de edición y por lo tanto no puede desacilar los aminoácidos no afines del ARNt (Roy, H. et al., 2005. The Journal of biological chemistry 280, 38186-38192; Kotik-Kogan, O. et al., 2005. Structure 13, 1799-1807), proporcionando la ruta para que estos residuos se incorporen en las cadenas polipeptídicas de la proteína. El análisis de los parámetros cinéticos de aminoacilación ARNt^{Phe} muestra que la eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m) de montaje m-Tyr por *Hsmt*PheRS es sólo cinco veces menor que la del aminoácido correcto, debido principalmente a un valor más alto K_m . Actividad catalítica relativamente alta de PheRS mitocondrial hacia m-Tyr y la falta de edición de la actividad puede explicar el efecto tóxico profundo que m-Tyr tiene en las plantas. En las plantas, más de 150 proteínas se expresan en las mitocondrias y los cloroplastos, y la sintetasa monomérica de fenilalanilo-ARNt (PheRS), presente en los organelos vegetales se asemeja mucho a la PheRS humana mitocondrial. Por lo tanto, la incorporación de m-Tyr en lugar de Phe en proteínas organelas produce un gran número de proteínas dañadas, reduciendo por tanto la viabilidad celular. La toxicidad moderada de m-Tyr a las células de mamífero puede explicarse por el hecho de que en estas células un mitocondrio codifica sólo 13 proteínas.

[0008] La reducción del uso de herbicidas se ha convertido en un objetivo importante en el mantenimiento de la agricultura sostenible y gestión del paisaje. Existe un esfuerzo continuo en el desarrollo de enfoques biológicos y orgánicos para el control de malezas que pueden reemplazar efectivamente el uso de productos químicos peligrosos. Al mismo tiempo, se hacen esfuerzos por disponer de medios y métodos para proteger las plantas de cultivo de los compuestos fitotóxicos que adoptan el enfoque de la genética molecular y/o emplean productos naturales.

[0009] Por ejemplo, el nº de Publicación de Solicitud Internacional PCT WO/2005/077171 da a conocer métodos para proteger las plantas de la lesión herbicida y el daño por revestimiento o semillas de cebado con uno o más aminoácidos para conferir tolerancia a los herbicidas que interrumpen la producción de los aminoácidos por una planta tratada con el herbicida.

[0010] La toxicidad significativa de m-Tyr a las plantas, pero el efecto reducido sobre los hongos, bacterias o mamíferos ha llevado a su desarrollo como un bio-herbicida. La publicación de solicitud de patente de EE.UU. nº 20080261815 describe métodos para usar compuestos de m-tirosina a partir de especies de *Festuca* para inhibir el crecimiento de malezas y aumentar el crecimiento de plantas de cultivo y describe además métodos para identificar plantas que tienen propiedades herbicidas. La escasez del uso de m-tirosina como bioherbicida es que es tóxica no sólo para las malezas, sino también para las plantas de cultivo.

[0011] Existe una necesidad reconocida de que sería muy eficaz para disponer de medios para la producción de plantas transgénicas, en particular de los cultivos o plantas ornamentales que son resistentes a fitotóxicos aleloquímicos, por ejemplo para los aminoácidos no proteicos incluyendo m-tirosina.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0012] La presente invención proporciona medios y métodos para conferir resistencia a las plantas transgénicas a la presencia de aminoácidos no proteicos fitotóxicos en el medio de crecimiento de la planta. La presente invención proporciona además plantas transgénicas resistentes a aminoácidos no proteicos fitotóxicos, particularmente a meta-tirosina (m-Tyr) y sales de los mismos.

[0013] La presente invención se basa en parte en el descubrimiento inesperado de que la expresión de sintetasa bacteriana de fenilalanilo-ARNt (PheRS) dentro de una célula vegetal, particularmente cuando las PheRS se expresan dentro de las mitocondrias y/o cloroplasto, confiere resistencia de la planta a meta-tirosina. Esta resistencia se debe a la capacidad de PheRS bacterianas introducidas para hidrolizar m-Tyr-ARNt^{Phe} misacilado y para evitar la incorporación del aminoácido no proteico en proteínas.

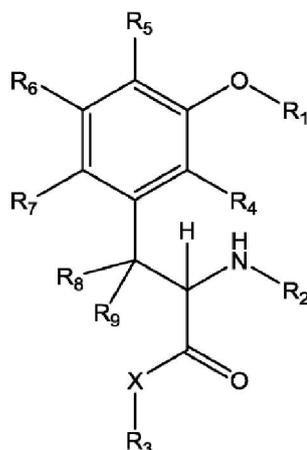
[0014] Así, según un aspecto, la presente invención proporciona una planta transgénica que comprende al menos una célula que comprende al menos un polinucleótido exógeno que codifica una sintetasa de ARNt de aminoácido (aaRs) o un fragmento de la misma, los AARS o un fragmento del mismo que comprende un montaje capaz de hidrolizar ARNt misacilado con análogo de aminoácido no proteico, en el que la planta es resistente al análogo de aminoácido no proteico y sus sales, en donde el análogo de aminoácido no proteico es un compuesto de meta-tirosina (m-Tyr) y el aaRS es sintetasa de fenilalanilo-ARNt (PheRS).

[0015] En el contexto de la presente invención, el término "resistente análogo de aminoácido no proteico" se refiere a la capacidad de la planta transgénica de crecer en un medio de crecimiento que comprende el análogo de aminoácido no proteico en una concentración que de manera significativa inhibe el crecimiento de una planta no transgénica correspondiente. La inhibición del crecimiento puede demostrarse por al menos una reducción de la

longitud de la raíz, reducción del radical de raíz, masa reducida de raíces, altura reducida de la planta, cambios aberrantes en la morfología de tejidos vegetales o color, masa de raíz vegetal reducida y/o número y cualquier combinación de los mismos. El análogo de aminoácido no proteico aislado o una composición que lo comprende se añade preferentemente al medio de crecimiento. Alternativamente, el análogo de aminoácido no proteico es secretado al medio de crecimiento a partir de una planta que lo produce.

[0016] De acuerdo con ciertas realizaciones, el compuesto m-Tyr tiene una fórmula de Fórmula I o una sal del mismo:

Fórmula I



donde

R¹ y R² se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, sulfonato, sulfonamida, fosfonato, alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, alcoxycarbonilo, sacárido, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo, en el que cada uno de los fosfonato, alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, alcoxycarbonilo, sacárido, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo está sustituido o no sustituido;

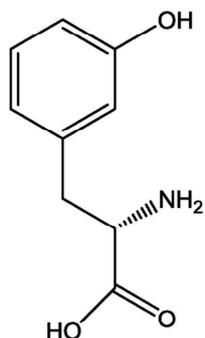
R³ se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, alcoxycarbonilo, sacárido, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, y heteroarilo, en el que cada uno de los grupos alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, alcoxycarbonilo, sacárido, cicloalquilo, Heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo está sustituido o no sustituido;

X se selecciona del grupo que consiste en O y NY, donde Y se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, alcoxycarbonilo, sacárido, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo, en donde cada uno de los grupos alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, alcoxycarbonilo, sacárido, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo está sustituido o no sustituido;

R⁴, R⁵, R⁶ y R⁷ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, hidroxilo, halógeno, amino, y nitro; y

R⁸ y R⁹ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, hidroxilo, halógeno, amino, metilo y metilo halogenado.

[0017] De acuerdo con ciertas realizaciones típicas, el compuesto de m-Tyr tiene la fórmula de la Fórmula II:



- 5
- 10
- 15 **[0018]** De acuerdo con ciertas formas de realización actualmente típicas, el PheRS es PheRS bacteriana. Se sabe que PheRS bacterianas son heterotetraméricas, que comprende dos subunidades α y dos β . De acuerdo con ciertas realizaciones, las subunidades α y β están codificadas por un único polinucleótido. Cada una de las subunidades α y β pueden ser codificadas por un polinucleótido separado. Las PheRS bacterianas pueden comprender al menos una subunidad β o un fragmento de la misma que comprende el módulo de edición.
- 20 **[0019]** De acuerdo con algunas realizaciones, las PheRS bacterianas es una PheRS bacteriana heterotetramérica seleccionada del grupo que consiste en PheRS (*E. coli*) *Escherichia coli* y PheRS *Thermus thermophilus*.
- 25 **[0020]** De acuerdo con ciertas realizaciones, la subunidad *E. Coli* PheRS- α está codificada por un polinucleótido que tiene la secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 1 y la subunidad *E. Coli* PheRS- β está codificada por un polinucleótido que tiene la secuencia de ácido nucleico establecida en la SEQ ID NO: 2.
- 30 **[0021]** Según otras realizaciones, la subunidad *E. Coli* PheRS- α comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 3 y la subunidad *E. Coli* PheRS- β comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO 4.
- 35 **[0022]** De acuerdo con otras realizaciones, la unidad *T. thermophilus* PheRS- α comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 5 y la subunidad *T. thermophilus* PheRS- β comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 6.
- 40 **[0023]** De acuerdo con ciertas realizaciones, el polinucleótido que codifica los AARS o un fragmento de los mismos que comprende el módulo de edición comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido dirigido seleccionado del grupo que consiste en un péptido de direccionamiento mitocondrial y un péptido de orientación del cloroplasto. Los péptidos de orientación mitocondrial y de cloroplasto pueden ser iguales o diferentes. Típicamente, el polinucleótido está diseñado de tal manera que el péptido de direccionamiento codificado se fusiona en el extremo amino (extremo N) del polipéptido aaRS codificado.
- 45 **[0024]** De acuerdo con ciertas formas de realización, la planta transgénica comprende una combinación de polinucleótido exógeno codifica la sintetasa de ARNt de aminoácido (aaRs) o un fragmento del mismo que comprende además la secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido de direccionamiento mitocondrial y el polinucleótido exógeno que codifica los aaRs o un fragmento del mismo que comprende además la secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido dirigido al cloroplasto. El péptido dirigido al cloroplasto y el péptido de direccionamiento mitocondrial pueden ser iguales o diferentes.
- 50 **[0025]** De acuerdo con ciertas realizaciones, la mitocondria y los cloroplastos de orientación péptidos son codificados por la secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 7 y tienen la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 8.
- 55 **[0026]** Los polinucleótidos de la presente invención se pueden incorporar en un constructo de ADN que permite su expresión en la célula vegetal. La construcción de ADN puede comprender al menos un elemento regulador de expresión seleccionado del grupo que consiste en un promotor, un potenciador, un origen de replicación, una secuencia de terminación de la transcripción, una señal de poliadenilación y similares.
- 60 **[0027]** La construcción de ADN también puede comprender un promotor. El promotor puede ser promotor constitutivo, inducido o específico de tejido, como se conoce en la técnica. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención. El promotor puede ser un promotor constitutivo operable en una célula vegetal. El promotor puede ser un promotor específico de la raíz. La construcción de ADN puede comprender además la terminación de la transcripción y las señales de secuencia de poliadenilación.
- 65 **[0028]** Opcionalmente, el constructo de ADN comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica un marcador de detección que permite una selección conveniente de la planta transgénica. El marcador de detección

puede seleccionarse del grupo que consiste en un polinucleótido que codifica una proteína que confiere resistencia al antibiótico; Un polinucleótido que codifica una proteína que confiere resistencia al herbicida y una combinación de los mismos.

5 **[0029]** La presente invención también abarca semillas de la planta transgénica, en las que las plantas cultivadas a partir de dichas semillas son resistentes a fitotóxicos no proteicos análogos de aminoácido, en particular para *m*-Tyr. La presente invención comprende además frutos, hojas o cualquier parte de la planta transgénica, así como cultivos de tejidos derivados de la misma y plantas regeneradas a partir de la misma.

10 **[0030]** De acuerdo con otro aspecto más, la presente invención proporciona un método para la producción de una planta transgénica resistente al análogo de aminoácido no proteico fitotóxico o una sal de la misma, que comprende (a) transformar una célula vegetal con al menos un polinucleótido exógeno que codifica una sintetasa de ARNt de aminoácido (aaRS) o un fragmento del mismo que comprende un módulo de edición, el módulo de edición capaz de hidrolizar el ARNt aminoacilado no proteico; y (b) regenerar la célula transformada en una planta transgénica
15 resistente al análogo de aminoácido no proteico fitotóxico o una sal del mismo, en el que el análogo de aminoácido no proteico es un compuesto de meta-tirosina (*m*-Tyr) y el aaRS es sintetasa de fenilalanilo-ARNt (PheRS).

[0031] El polinucleótido exógeno que codifica la sintetasa de ARNt de aminoácido (aaRS) o un fragmento del mismo que comprende el módulo de edición, capaz de hidrolizar ARNt aminoacilado no proteico de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención puede ser introducido en un constructo ADN para incluir todos los elementos necesarios para la transcripción y traducción como se ha descrito anteriormente, de manera que los polipéptidos se expresan dentro de la célula vegetal.

25 **[0032]** La transformación de plantas con un polinucleótido o una construcción de ADN se puede realizar por diversos medios, como se conoce para un experto en la técnica. Los métodos comunes se ejemplifican por, pero no se limitan a, transformación mediada por *Agrobacterium*, bombardeo con microproyectiles, transferencia mediada por polen, virus de ARN de planta de transformación mediada, transformación mediada por liposoma, transferencia directa de genes (por ejemplo, mediante microinyección) y la electroporación de callos embriogénicos compactos. Las plantas transgénicas de la presente invención pueden producirse usando la transformación mediada por *Agrobacterium*.

30 **[0033]** Las plantas transgénicas que comprenden los polinucleótidos exógenos que codifican aaRS o un fragmento del mismo que comprende el módulo de edición de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención se puede seleccionar empleando métodos estándar de genética molecular, como son conocidos para una persona de experiencia ordinaria en la técnica. Las plantas transgénicas pueden seleccionarse de acuerdo con su resistencia a un antibiótico o herbicida. El antibiótico que sirve como marcador seleccionable puede ser uno del grupo que consiste en cefotaxima, vancomicina y kanamicina. El herbicida que sirve como marcador seleccionable puede ser el glufosinato-amonio de herbicida no selectivo (BASTA®).

40 **[0034]** Las plantas transgénicas de la invención pueden ser seleccionadas en base a su resistencia al análogo de aminoácido no proteico fitotóxico o sales de los mismos.

45 **[0035]** Cualquier planta puede transformarse con los polinucleótidos descritos en este documento para producir las plantas transgénicas resistentes a la presencia de análogo de aminoácido no proteico fitotóxico, especialmente *m*-Tyr o una sal del mismo en el medio de crecimiento de las plantas. La planta puede ser una planta de cultivo o una planta ornamental.

[0036] Otros objetos, características y ventajas de la presente invención quedarán claras a partir de la siguiente descripción y los dibujos.

50 **Breve descripción de las figuras**

[0037]

55 **FIG. 1** muestra la aminoacilación de ARNt^{Phe} con aminoácidos nativos y no proteicos y desacilación específica de producto no cargado. Fig. 1A: Aminoacilación de transcripción *E. coli* ARNt^{Phe} (1,2 μM) con Phe o *m*-Tyr por mitocondrial humano (*Hsmt*)PheRS (210 nM) o *Thermus thermophilus* (*Tt*) PheRS (24 nM) analizado por electroforesis en un 8% de gel de desnaturalización en condiciones ácidas (0,1 M Na-acetato, pH 5). Fig. 1B: desacilación específica de *m*-Tyr-ARNt^{Phe}. La transcripción *E. coli* ARNt^{Phe} (1,2 μM) se aminoaciló con Phe (25 μM), *m*-Tyr (125 μM) o Tyr (1 mM) por *hsmt*-PheRS (250 nM en experimentos con Phe y *m*-Tyr, o 500 nM en experimentos con Tyr) durante 5 min; a continuación, la reacción se continuó después de la adición (que se muestra por las flechas) de *Tt*PheRS (16 nM), *E. coli* (*Ec*)PheRS (48 nM) o *Hsct*PheRS (32 nM) (recuperado de Klipcan L. et al. 2009, *ibid*).

65 **FIG. 2** muestra los fenotipos de tipo salvaje y las líneas transgénicas de *A. Taliana*. El crecimiento de raíz de Wt (tipo silvestre), Cyt (planta transgénica que contiene PheRS bacteriana de citosol localizada) y Dual (planta transgénica que contiene PheRS bacteriana de plastidios localizados). Paneles superiores: muestras cultivadas

en medios que contienen 20 μ M m-tirosina. Paneles inferiores: muestras no tratadas.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

5 **[0038]** La presente invención proporciona plantas transgénicas que son resistentes a la presencia de un aminoácido no proteico fitotóxico en el medio de crecimiento de tal manera que el crecimiento de la planta resistente esencialmente no se ve afectado por el aminoácido fitotóxico. La presente invención proporciona además medios y método para producir las plantas transgénicas de la invención. El aminoácido no proteico fitotóxico es un compuesto de meta-tirosina (m-Tyr) o una sal del mismo.

10

Definiciones

15 **[0039]** Los términos "sintetasa de ARNt de aminoacilo" o "aaRS" se usan en el presente documento como es común en la técnica ant. aaRS es una enzima que cataliza la esterificación de un aminoácido específico o su precursor a uno de todos sus ARNt afines compatibles para formar un aminoacilo-ARNt. El módulo de edición de aaRS ha evolucionado para corregir la misacilación de aminoácidos no cognatos al ARNt, lo que resulta en una mala traducción del código genético. El módulo de edición es capaz de hidrolizar el enlace éster entre el aminoácido no cognato y el ARNt. El término "fragmento del mismo" cuando se usa con referencia a la enzima aaRS se refiere a un fragmento de la enzima que conserva su actividad catalítica y comprende además el módulo de edición de enzimas que es capaz de hidrolizar un aminoácido no proteico miscilado al ARNt.

20

[0040] Los términos "aminoácido no proteico" y "análogo de aminoácido no proteico" se usan aquí de forma intercambiable y se refieren a los aminoácidos que no se incluyen en el conjunto de los 22 aminoácidos canónicos como es común en la técnica.

25

[0041] El término "planta" se utiliza aquí en su sentido más amplio. incluye, pero no se limita a, cualquier especie de planta leñosa, herbácea, perenne o anual. También se refiere a una pluralidad de células vegetales que se diferencian en gran parte en una estructura que está presente en cualquier etapa del desarrollo de una planta, incluyendo, pero sin limitación, una raíz, tallo, brote, hoja, flor, pétalo, fruta, etc.

30

[0042] Tal como se utiliza aquí, el término "medio de crecimiento" se refiere a cualquier medio que puede ser utilizado para soportar el crecimiento de una planta, y puede incluir, sin limitación, varios tipos de suelos o medios nutrientes de las plantas. Ejemplos adecuados de suelos incluyen, sin limitación, suelos naturales y suelos artificiales.

35

[0043] Los términos "polinucleótido", "secuencia de polinucleótido", "secuencia de ácido nucleico" y "polinucleótido aislado" se usan indistintamente en este documento. Estos términos abarcan secuencias de nucleótidos y similares. Un polinucleótido puede ser un polímero de ARN o ADN o híbrido de los mismos, que es monocatenario o bicatenario, lineal o ramificado, y que opcionalmente contiene bases nucleotídicas sintéticas, no naturales o alteradas. Los términos también abarcan híbridos de ARN/ADN.

40

[0044] El término "constructo", como se usa aquí se refiere a una molécula de ácido nucleico ensamblado artificialmente o aislado que incluye el gen de interés. En general, una construcción puede incluir el gen o genes de interés, un gen marcador que en algunos casos puede ser también el gen de interés y las secuencias reguladoras apropiadas. Debe apreciarse que la inclusión de secuencias reguladoras en una construcción es opcional, por ejemplo, tales secuencias pueden no ser necesarias en situaciones en las que se van a usar las secuencias reguladoras de una célula huésped. El término constructo incluye vectores, pero no debe considerarse limitado a ellos.

45

[0045] El término "unido operativamente" se refiere a la asociación de secuencias de ácido nucleico en un solo fragmento de ácido nucleico de modo que la función de uno está regulada por el otro. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente con una secuencia codificadora cuando es capaz de regular la expresión de dicha secuencia codificante (es decir, que la secuencia codificadora está bajo el control transcripcional del promotor). Las secuencias de codificación pueden estar enlazadas operativamente a secuencias reguladoras en una orientación de sentido o antisentido.

50

[0046] Los términos "elemento promotor", "promotor" o "secuencia promotora" como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de ADN que se encuentra en el extremo 5' (es decir, precede) la región codificadora de proteína de un polímero de ADN. La localización de la mayoría de los promotores conocidos en la naturaleza precede a la región transcrita. El promotor funciona como un interruptor, activando la expresión de un gen. Si el gen está activado, se dice que se transcribe o participa en la transcripción. La transcripción implica la síntesis de ARNm del gen. El promotor, por tanto, sirve como un elemento regulador de la transcripción y también proporciona un sitio para la iniciación de la transcripción del gen en ARNm. Los promotores pueden derivarse en su totalidad de un gen nativo, o estar compuestos de diferentes elementos derivados de diferentes promotores encontrados en la naturaleza, o incluso comprender segmentos de ADN sintéticos. Los expertos en la técnica entenderán que diferentes promotores pueden dirigir la expresión de un gen en diferentes tejidos o tipos de células,

60

65

o en diferentes etapas de desarrollo, o en respuesta a diferentes condiciones ambientales. Se reconoce además que puesto que en la mayoría de los casos los límites exactos de las secuencias reguladoras no han sido completamente definidos, los fragmentos de ADN de cierta variación pueden tener actividad promotora idéntica. Los promotores que hacen que un gen se exprese en la mayoría de los tipos de células en la mayoría de los casos se denominan comúnmente "promotores constitutivos". Se están descubriendo constantemente nuevos promotores de diversos tipos útiles en células vegetales; Se pueden encontrar numerosos ejemplos en Okamoto JK y Goldberg RB (1989) *Biochemistry of Plants* 15: 1-82.

[0047] Tal como se utiliza aquí, el término "potenciador" se refiere a una secuencia de ADN que puede estimular la actividad promotora, y puede ser un elemento innato del promotor o un elemento heterólogo insertado para mejorar el nivel o especificidad tisular de un promotor.

[0048] El término "expresión", como se usa en el presente documento, se refiere a la producción de un ejemplo del producto final funcional, un ARNm o una proteína.

[0049] El término "transgénico" cuando se utiliza en referencia a una planta o semilla (es decir, una "planta transgénica" o un "semillas transgénicas") se refiere a una planta o semilla que contiene al menos un polinucleótido transcribible exógeno en una o más de sus células. El término "material vegetal transgénico" se refiere ampliamente a una planta, una estructura vegetal, un tejido vegetal, una semilla de planta o una célula vegetal que contiene al menos un polinucleótido exógeno en al menos una de sus células. El polinucleótido exógeno puede ser un polinucleótido endógeno de planta situado en un sitio diferente o bajo una regulación diferente en comparación con la situación de tipo salvaje, o un polinucleótido heterólogo aislado de un organismo diferente. Una "planta transgénica" y una "planta no transgénica correspondiente" como se usa en la presente memoria se refieren a una planta que comprende al menos una célula que comprende un polinucleótido transcribible exógeno y una planta del mismo tipo que carece de dicho polinucleótido transcribible exógeno.

[0050] Los términos "transformantes" o "células transformadas" incluyen la célula transformada primaria y los cultivos derivados de esa celda independientemente del número de transferencias. Toda progenie puede no ser exactamente idéntica en el contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas. La progenie mutante que tiene la misma funcionalidad que se cribó en la célula transformada originalmente se incluyen en la definición de transformantes.

[0051] La transformación de una célula puede ser estable o transitoria. El término "transformación transitoria" o "transitoriamente transformado" se refiere a la introducción de uno o más polinucleótidos exógenos en una célula en ausencia de integración del polinucleótido exógeno en el genoma de la célula huésped. La transformación transitoria se puede detectar mediante, por ejemplo, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), que detecta la presencia de un polipéptido codificado por una o más de los polinucleótidos exógenos. Alternativamente, la transformación transitoria se puede detectar mediante la detección de la actividad de la proteína (por ejemplo, β -glucuronidasa) codificada por el polinucleótido exógeno.

[0052] El término "transformante transitorio" se refiere a una célula que ha transitoriamente incorporado uno o más polinucleótidos exógenos. Por el contrario, el término "transformación estable" o "transformado establemente" se refiere a la introducción e integración de uno o más polinucleótidos exógenos en el genoma de una célula. La transformación estable de una célula puede detectarse mediante hibridación Southern blot de ADN genómico de la célula con secuencias de ácido nucleico que son capaces de unirse a uno o más de los polinucleótidos exógenos. Alternativamente, la transformación estable de una célula también puede ser detectada por la actividad enzimática de un gen integrado en tejido en crecimiento o por la reacción en cadena de polimerasa del ADN genómico de la célula para amplificar secuencias de polinucleótidos exógenos. El término "transformante estable" se refiere a una célula que ha integrado de forma estable uno o más polinucleótidos exógenos en el ADN genómico o organelar. Debe entenderse que una planta o una célula de planta transformada con los ácidos nucleicos, constructos y/o vectores utilizados en el contexto de la presente invención puede transformarse transitoriamente así como transformarse establemente. Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente aquí para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos son un análogo químico artificial de un aminoácido natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos naturales.

[0053] Entre miles de aminoácidos no proteicos conocidos, aproximadamente 300 se encuentran en las plantas. Muchos de ellos son estructuralmente similares a los considerados como sustratos regulares de aminoácidos de sintetasa de ARNt de aminoácidos (aaRSs). Modificaciones de la cadena lateral de aminoácidos pueden generarse *in vivo* por las especies reactivas de oxígeno (ROS) tales como los radicales de hidroxilo y aniones superóxidos. Muy a menudo, las modificaciones están asociadas con la producción de uno o más grupos hidroxilo en posiciones para, meta o orto sobre el anillo aromático de fenilalanina y tirosina. Sin embargo, las vías de incorporación de aminoácidos dañados por ROS en cadenas de polipéptidos siguen sin estar claro, teniendo en cuenta la actividad de edición de aaRSs.

[0054] La presente invención muestra ahora que (i) sintetisas de fenilalanilo-ARNt mitocondriales y citoplasmáticas

(definidas *HsmtPheRS* y *HsctPheRS*, respectivamente) catalizan la unión directa de *m-Tyr* a ARNt^{Phe}, abriendo así el camino para la entrega de la ARNt misacilada al ribosoma y la incorporación de *m-Tyr* en proteínas eucariotas; y (ii) la presencia de PheRS bacterianas en las mitocondrias y/o cloroplasto induce resistencia de la planta a *m-Tyr*. Estos hallazgos forman la base para los sistemas de aminoácidos herbicidas no proteicos y plantas resistentes a estos herbicidas en desarrollo.

[0055] Según un aspecto, la presente invención proporciona una planta transgénica que comprende al menos una célula que comprende al menos un polinucleótido exógeno que codifica una sintetasa de aminoácido de ARNt (aaRS) o un fragmento de la misma, los AARS o un fragmento del mismo que comprende un módulo de edición capaz de hidrolizar ARNt misacilada con un análogo de aminoácido no proteico, en donde la planta es resistente al análogo de aminoácido no proteico y sales de los mismos, en el que el análogo de aminoácidos no proteicos es compuesto de meta-tirosina (*m-Tyr*) y los AARS es sintetasa de fenilalanilo-ARNt (PheRS).

[0056] Las enseñanzas de la presente invención se ejemplifican por la producción de plantas transgénicas que expresan una sintetasa de fenilalanilo-ARNt bacteriana (PheRS), que son resistentes al efecto fitotóxico de los compuestos de *m-Tyr* y sales de los mismos. Sin embargo, ha de entenderse expresamente que el alcance de la presente invención abarca cualquier combinación de un aminoácido fitotóxico no proteico y sintetasa de aminoácido ARNt (aaRS) o un fragmento del mismo, siempre y cuando los AARS o su fragmento comprende un módulo de edición capaz de hidrolizar el aminoácido no proteico de la ARNt.

[0057] Los aaRS pueden ser una enzima nativa que tiene una actividad de edición eficiente como se ejemplifica en este documento para PheRS *E. coli*. Como alternativa, los aaRS pueden ser modificados genéticamente como para inducir o aumentar la actividad de edición. La plasticidad significativa de los sitios de síntesis y de edición de aaRSs, particularmente PheRS y cambios menores en su organización estéreo-química, se puede utilizar para el diseño de la arquitectura de estos sitios para cambiar la afinidad de unión hacia los pequeños ligandos o para controlar la actividad hidrolítica hacia tRNAs misaciladas (Kotik-Kogan, O., Moor et al., 2005. Structured 13, 1799-1807; Fishman, R. et al 2001. Acta crystallographica 57, 1534-1544). Los AARS exógenos, que se encuentra preferiblemente dentro de la mitocondria y los cloroplastos orgánulos celulares pueden reparar los errores incorporados en proteínas por enzimas de aaRS de tipo salvaje utilizando la actividad de edición extra, y/o quelar el análogo de aminoácido perjudicial y evitar su incorporación en las proteínas.

[0058] La clonación de un polinucleótido que codifica los aaRS puede realizarse por cualquier método tal como es conocido para un experto en la técnica. Varias construcciones de ADN se pueden utilizar para expresar los aaRS en una planta deseada.

[0059] En este documento se describe un constructo de ADN o un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica aaRS, que puede comprender además elementos reguladores, incluyendo, pero no limitado a, una señal de terminación de un promotor, y un potenciador.

[0060] Entre los promotores más comúnmente utilizados son el promotor de sintasa de nopalina (NOS) (Ebert et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 84: 5.745-5.749), promotor de sintasa de octapina (OCS), promotores de caulimovirus tales como el virus del mosaico de coliflor (CaMV) 19S promotor (Lawton et al., 1987 Plant Mol Biol. 9: 315-324), el promotor 35S de CaMV (Odell et al., 1985 Nature 313: 810-812), y el promotor 35S del virus del mosaico de la escrofularia, el promotor de luz inducible de la subunidad pequeña de rubisco, el promotor de Adh (Walker et al., 1987 Proc Natl Aca Sci EE.UU. 84: 6624-66280, el promotor de la sintasa de sacarosa (Yang et al., 1990 Proc Natl Acad Sci EE.UU. 87: 4.144-4148), el promotor de complejo de genes R (Chandler et al., 1989. Plant Cell 1: 1175-1183), el promotor del gen de a/b de la clorofila de unión a proteínas, etc. Otros promotores comúnmente usados son los promotores para los genes ADPGPP del tubérculo de la patata, el promotor de la sintasa de sacarosa, el promotor unido a gránulo de sintasa de almidón, el promotor del gen de glutelina, el promotor de maíz ceroso, promotor del gen Brittle, y promotor 2 Shrunken y, el promotor de gen de quitinasa ácida, y los promotores de genes de zeína (15 kD, 16 kD, 19 kD, 22 kD y 27 kD; Perderson et al. 1982 Cell 29: 1015-1026). Una gran cantidad de promotores se describe en la Solicitud de Patente Internacional N° WO 00/18963. La construcción utilizada en el contexto de la presente invención puede comprender el promotor CaMV 35S constitutivo.

[0061] Las "secuencias no codificantes 3'" se refieren a secuencias de ADN localizadas aguas abajo de una secuencia codificante e incluyen secuencias de reconocimiento de poliadenilación y otras secuencias que codifican señales reguladoras capaces de afectar el procesamiento del ARNm o la expresión génica. La señal de poliadenilación se caracteriza normalmente por afectar a la adición de tramos de ácido poliadenílico al extremo 3' del precursor de ARNm. El uso de diferentes secuencias 3' no codificantes se ejemplifican por Ingelbrecht I L et al. (1989 Plant Cell 1: 671-680).

[0062] En realizaciones particulares de la presente invención, cuatro clones de subunidades PheRS *E. coli*: *EcPheRS*⟨, *mtp-EcPheRS*⟨, *EcPheRS*®, y *mtp-EcPheRS*β se prepararon bajo la regulación del promotor constitutivo 35S y lleva a la resistencia al herbicida no selectivo glufosinato de amonio (BASTA®) (*EcPheRS*⟨ y *mtp-EcPheRS*⟨) o kanamicina (*EcPheRS*®, y *Mtp-EcPheRS*β). Los *Mtp-EcPheRS*α y *Mtp-EcPheRS*β incluyeron además péptido diana dual (mitocondrial y cloroplasto). Los clones se transformaron en plantas *Arabidopsis thaliana* (Columbia (Col-

0) ecotipo) a través de *Agrobacterium tumefaciens*.

[0063] Los expertos en la técnica apreciarán que los diversos componentes de las secuencias de ácidos nucleicos y los vectores de transformación descritos en el contexto de la presente invención están ligados operativamente, con el fin de resultar en la expresión de dicho ácido nucleico o fragmento de ácido nucleico. Las técnicas para unir operativamente los componentes de los constructos y vectores son bien conocidos para los expertos en la técnica. Tales técnicas incluyen el uso de ligadores, tales como ligadores sintéticos, por ejemplo incluyendo uno o más sitios de enzimas de restricción.

[0064] De acuerdo con otro aspecto más, la presente invención proporciona un método para producir una planta transgénica resistente a análogo de aminoácido fitotóxico no proteico o una sal del mismo, que comprende (a) la transformación de una célula vegetal con por lo menos un polinucleótido exógeno que codifica una sintetasa de ARNt de aminoácido (aaRs) o un fragmento del mismo que comprende un módulo de edición capaz de hidrolizar ARNt aminoacilada con aminoácido no proteico; y (b) la regeneración de la célula transformada en una planta transgénica resistente al análogo de aminoácido no proteico fitotóxico o una sal del mismo, en el que el análogo de aminoácidos no proteico es el compuesto de meta-tirosina (m-Tyr) y la aaRS es sintetasa de fenilalanilo-ARNt (PheRS).

[0065] Los métodos para transformar una célula vegetal con secuencias de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención son conocidos en la técnica. Tal como se utiliza aquí, el término "transformación" o "transformar" describe un proceso por el cual un ADN extraño, tal como una construcción de ADN, entra y cambia una célula receptora en una célula transformada, genéticamente modificada o transgénica. La transformación puede ser estable, en la que la secuencia de ácido nucleico se integra en el genoma de la planta y, como tal, representa un rasgo estable y heredado, o transitorio, en el que la secuencia de ácido nucleico se expresa por la célula transformada, pero no está integrado en el genoma, y como tal, representa un rasgo transitorio. La secuencia de ácido nucleico de la presente invención es preferiblemente transformada de manera estable en una célula vegetal.

[0066] Hay varios métodos para introducir genes extraños en plantas tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas (por ejemplo, Potrykus I. 1991. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 42: 205-225; Shimamoto K. et al., 1989. *Nature* 338: 274-276).

[0067] Los métodos principales de la integración estable del ADN exógeno en el ADN genómico de la planta incluye dos enfoques principales:

Transferencia génica *mediada por agrobacterium*: El sistema mediado por *agrobacterium* incluye el uso de vectores plasmídicos que contienen segmentos de ADN definidos que se integran en el ADN genómico de la planta. Los métodos de inoculación del tejido vegetal varían dependiendo de las especies de plantas y el sistema de suministro de *agrobacterium*. Un enfoque ampliamente utilizado es el procedimiento de hoja-disco, que puede realizarse con cualquier explante de tejido que proporcione una buena fuente para la iniciación de la diferenciación de toda la planta (Horsch et al., 1988. *Plant Molecular Biology Manual* A5, 1-9, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht). Un enfoque complementario emplea el sistema de suministro *agrobacterium* en combinación con infiltración al vacío. El sistema *agrobacterium* es especialmente útil en la generación de plantas dicotiledóneas transgénicas.

[0068] Captación de ADN directa: Hay varios métodos de transferencia directa de ADN en células de plantas. En la electroporación, los protoplastos se exponen brevemente a un fuerte campo eléctrico, abriéndose mini-poros para permitir que el ADN entre. En la microinyección, el ADN se inyecta mecánicamente directamente en las células usando micropipetas. En bombardeo de micropartículas, el ADN se adsorbe en microproyectiles, tales como cristales de sulfato de magnesio o partículas de wolframio, y los microproyectiles se aceleran físicamente en células o tejidos de la planta.

[0069] Transformación de las construcciones de ADN descritas en este documento en una célula vegetal se puede realizar usando el sistema de *agrobacterium*.

[0070] La planta transgénica se cultivan bajo condiciones adecuadas para la expresión de la construcción de ADN recombinante o constructos. La expresión de la construcción de ADN recombinante o construcciones reduce la susceptibilidad de las plantas a análogos de aminoácidos no proteicos, en particular para m-tirosina.

[0071] La regeneración, el desarrollo y el cultivo de plantas a partir de transformantes de protoplastos de planta única o de diversos explantes transformados se conoce en la técnica (Weissbach y Weissbach, In.: *Methods for Plant Molecular Biology*, (Eds.), 1988 Academic Press, Inc., San Diego, CA). Este proceso de regeneración y crecimiento incluye típicamente las etapas de selección de células transformadas, cultivando esas células individualizadas o tejidos a través de las etapas habituales del desarrollo embrionario a través de la etapa de plántula enraizada. Embriones y semillas transgénicas se regeneran de manera similar. Los brotes de raíz transgénicos resultantes se plantan después en un medio de crecimiento de plantas adecuado tal como tierra.

[0072] La selección de plantas transgénicas transformadas con una secuencia de ácido nucleico descrita en este documento para proporcionar plantas transgénicas que comprenden los aaRS exógenos se lleva a cabo empleando métodos estándar de genética molecular, conocidos para una persona de experiencia ordinaria en la técnica. La secuencia de ácido nucleico puede comprender además una secuencia de ácido nucleico que codifica un producto que confiere resistencia a los antibióticos, y por lo tanto plantas transgénicas se seleccionan según su resistencia al antibiótico. El antibiótico que actúa como un marcador seleccionable puede ser uno del grupo de aminoglucósido que consiste en paromomicina y kanamicina. La secuencia de ácido nucleico también puede comprender además una secuencia de ácido nucleico que codifica un producto que confiere resistencia a un herbicida, incluyendo, pero no limitado a, resistente al glufosinato-amonio herbicida no selectivo (BASTA®). Los métodos para detectar la presencia y/o expresión del polinucleótido exógeno dentro de las plantas transgénicas también se conocen por expertos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, PCR, hibridación Northern y Southern. Como se ejemplifica en este documento, la confirmación final para obtener una planta transgénica de la presente invención se obtiene mediante el cultivo de las plantas transgénicas que comprenden el polinucleótido exógeno en un medio que comprende concentración fitotóxica del aminoácido no proteico. Sólo las plantas que expresan un aaRS activo o un fragmento del mismo que tiene el módulo de edición normalmente puede crecer en estas condiciones.

[0073] También dentro del alcance de esta invención están las semillas o partes de plantas obtenidas a partir de las plantas transgénicas que mantienen la resistencia a la concentración fitotóxica del aminoácido no proteico. Partes de la planta incluyen tejidos diferenciados y no diferenciados, incluyendo pero no limitado a, raíces, tallos, brotes, hojas, polen, semillas, tejido tumoral y diversas formas de células y cultivo tales como células individuales, protoplastos, embriones y tejido de callo. El tejido de la planta puede estar en la planta o en órgano, tejido o cultivo celular.

[0074] Los siguientes ejemplos se presentan con el fin de ilustrar más completamente algunas realizaciones de la invención. No deben interpretarse de ninguna manera, sin embargo, como limitantes del amplio alcance de la invención. Un experto en la técnica puede idear fácilmente muchas variaciones y modificaciones de los principios descritos en este documento sin apartarse del alcance de la invención.

EJEMPLOS

30 Material y métodos

[0075] Cuatro clones de subunidades PheRS *E. coli*: *EcPheRS α* , *mtp-EcPheRS α* , *EcPheRS β* , y *mtp-EcPheRS β* se prepararon bajo la regulación del promotor constitutivo 35S y llevan a la resistencia a BASTA (*EcPheRS α* y *mtp-EcPheRS α*) o kanamicina (*EcPheRS β* , y *mtp-EcPheRS β*). Los *mtp-EcPheRS α* y *mtp-EcPheRS β* contenía péptido diana doble (mitocondrial y cloroplastos). Los clones se transformaron en plantas *Arabidopsis thaliana* (Columbia (Col-0) ecotipo) a través de *Agrobacterium tumefaciens*.

[0076] Para la transformación, las plantas se cultivaron en una cámara de crecimiento bajo condiciones controladas (temperatura 22°C, 8 horas de luz) durante 30 días y después se transformaron como se describe en lo siguiente. Semillas de tipo salvaje y transformadas se esterilizaron, se trataron en frío, y se germinaron en medios MS estériles con o sin antibiótico. Después de la germinación se sembraron las plantas en macetas y se transfirieron a la cámara de crecimiento (22°C 16 horas de luz).

45 Transformación de infiltración *Agrobacterium*

[0077] Cepa ABI *Agrobacterium tumefaciens* con vectores binarios pART27 o pMLBart se utilizan para la transformación. Ambos vectores contienen el gen de nptII como marcador seleccionable. Cultivos *Agrobacterium* de pequeña escala se hicieron crecer en medio LB líquido con antibióticos apropiados a 28°C durante la noche. Los cultivos a pequeña escala se diluyeron 50 veces en medio LB con los antibióticos apropiados para cultivos de una noche a gran escala. Las células fueron cosechadas por centrifugación a 5000 rpm (aproximadamente 3.000 g) durante 15 minutos, y se re-suspendieron en medio de infiltración a una DO600 de 0,8.

[0078] Las inoculaciones se realizaron por inmersión de las partes aéreas de las plantas durante 30 segundos en 300 mL de una solución que contiene 5% (w/v) de sacarosa, 10 mM de MgCl₂, células *Agrobacterium* re-suspendidas de un cultivo "overnight" de 200 mL, y 0,05% del tensioactivo (Silwet L-77). Después de que las plantas de inoculación se dejaron en un lugar de poca luz o oscuro y se cubren con una cúpula de plástico transparente para mantener la humedad; la cúpula se retiró y las plantas se volvieron a la cámara de crecimiento 12 a 24 h después de la inoculación. Las plantas transformadas se mantuvieron en el invernadero y las semillas se cosecharon a la maduración completa.

60 Selección de plantas

[0079] Las semillas se germinaron en el suelo y las plantas transgénicas se seleccionaron por pulverización con 0,1% herbicida BASTA® en el invernadero. La pulverización se llevó a cabo una semana después de la germinación y se repitió cuatro veces a intervalos de dos días. Las plantas transgénicas se identificaron fácilmente al final de la selección BASTA®. Si bien este tipo de plantas continuaron creciendo y permanecieron verdes, las plantas no

transformadas permanecieron pequeñas, se convirtieron en blanco y se murieron dos semanas después de la selección. Para resistencia a la kanamicina que contiene planta positiva de selección, las semillas fueron seleccionados en medio MS suplementado con 50 mg/mL de kanamicina.

5 Cruces

[0080] Después de la obtención de planta de homocigotos para cada subunidad de PheRS (α o β), se sometieron a cruces. Las plantas utilizadas como hembras se trataron manualmente. Anteras de flores recién abiertas de plantas donantes fueron cosechadas y la polinización se realizó tocando las anteras en las estigmas de las plantas tratadas. Las flores polinizadas se marcaron y cualquier resto de flores leído o no leído de la misma planta se retiraron para evitar cualquier confusión en la cosecha. La selección de plantas positivas que contienen las dos subunidades de PheRS se realizó como se describe en la sección "Selección de plantas" en lo que antecede.

15 Resistencia m-Tyr

[0081] Para evaluar los efectos de m-Tyr en crecimiento de raíces *Arabidopsis*, 20 μ m de m-Tyr se añadió a medio MS. Semillas *Arabidopsis* fueron esterilizadas mediante agitación en 30% de lejía, 0,3% de Triton X-100 durante 10 min, seguido de tres lavados con agua destilada estéril. Placas de Petri con los gérmenes en el medio de agar se estratificaron en frío durante 72 horas a 4°C, y posteriormente se colocaron verticalmente en verde de la casa a 23°C, de menos de ciclo 16: 8 h luz/oscuridad. Después de 7 días de crecimiento, se analizó la longitud de la raíz de la planta.

20 Ejemplo 1: El efecto de la expresión bacteriana PheRS en Resistencia *Arabidopsis* a m-Tyr

[0082] Los genes PheRS bacterianos descritos en la sección "Materiales y Métodos" en lo que antecede se expresaron bajo el control del promotor CaMV 35S constitutivo. Un péptido de tránsito se añade al N-terminal de subunidades *EcPheRS- α* y *EcPheRS- β* de la enzima bacteriana con el fin de dirigirlos a la mitocondria y cloroplastos de *Arabidopsis thaliana*. El segundo par de constructos incluyendo el PheRS- α y PheRS- β carecía de los péptidos de tránsito. Por lo tanto, cuatro diferentes construcciones se transformaron en *Arabidopsis thaliana*, y plantas autógamas de homocigotos se generaron como se ha descrito anteriormente. Cada línea se cruzó posteriormente para crear plantas que contienen *EcPheRS* heterodiméricas que poseen actividad de edición localizada en el citoplasma (CYT-PheRS) y *EcPheRS* heterodiméricas localizadas en la planta de mitocondrias y cloroplastos (MTP-PheRS). Se obtuvieron varias líneas transgénicas independientes, y se analizaron su resistencia a m-Tyr. La resistencia a m-Tyr se examinó mediante el cultivo de líneas *Arabidopsis thaliana* *cyt-PheRS* y *mtp-PheRS* de tipo salvaje, en placas de Petri que contienen 20 μ M m-Tyr en el medio de cultivo. Las mismas líneas cultivadas en medios no tratados sirvieron como control. Resistencia a m-Tyr se observó en la generación F2. Se encontró que la resistencia era mucho más profunda para la línea que contiene *mtp-PheRS* (Fig. 2). Se puede observar que mientras que las raíces de plantas de tipo salvaje no se desarrollaron en 20 μ M m-Tyr las raíces de las líneas que contienen *mtp-PheRS* desarrollaron hasta la mitad de la longitud de las plantas no tratadas. Las raíces de *cyt-PheRS* que expresan la línea están menos desarrolladas en comparación con la línea que contiene *mtp-PheRS*. Es de notar que el crecimiento de las plantas transgénicas de *Arabidopsis* cultivadas en condiciones normales no se vieron afectadas considerablemente por la presencia de PheRS bacterianas en el citoplasma o orgánulos (Fig. 2).

45 LISTADO DE SECUENCIAS

[0083]

<110> YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD.

50 <120> PLANTAS TRANSGÉNICAS RESISTENTES A AMINOÁCIDOS NO PROTEICOS

<130> YEDA/0120 PCT

<150> 61/554993

55 <151> 2011-11-03

<160> 8

<170> Versión 3.5 de patentIna

60 <210> 1

<211> 984

<212> ADN

<213> *Escherichia coli*

65 <220>

ES 2 619 002 T3

<221> misc_feature
 <223> subunidad alfa E. Coli PheRS

<400> 1

5

	atgtcacatc	tgcgagaact	ggttgccagt	gcgaaggcgg	ccattagcca	ggcgtcagat	60
10	gttgccgctg	tagacaatgt	gcgcgtcgaa	tatttgggta	aaaaggcca	cttaaccctt	120
	cagatgacga	ccctgctga	gctgccgcca	gaagagcgtc	cggcagccgg	tgcggttatc	180
	aacgaagcga	aagagcaggt	tcagcagcgg	ctgaatgcgc	gtaaagcgga	actggaaagc	240
15	gctgcactga	atgcgcgtct	ggcggcggaa	acgattgatg	tctctctgcc	aggctcgtcg	300
	attgaaaacg	gcggtctgca	tccggttacc	cgtaccatcg	accgtatcga	aagtttcttc	360
	ggtgagcttg	gctttaccgt	ggcaaccggg	ccgaaatcg	aagacgatta	tcataacttc	420
20	gatgctctga	acattcctgg	tcaccaccgg	gcgcgcgctg	accacgacac	tttctggttt	480
	gacgctaccc	gcctgctgcg	taccagacc	tctggcgtac	agatccgcac	catgaaagcc	540
25	cagcagccac	cgattcgtat	catcgcgcct	ggccgtgttt	atcgtaacga	ctacgaccag	600
	actcacacgc	cgatgttcca	tcagatggaa	ggtctgattg	ttgatacca	catcagcttt	660
	accaacctga	aaggcacgct	gcacgacttc	ctgcgtaact	tctttgagga	agatttgag	720
30	attcgcttcc	gtccttccta	cttcccgttt	accgaacctt	ctgcagaagt	ggatgtcatg	780
	ggtaaaaacg	gtaaatggct	ggaagtactg	ggctgcggga	tggtgcatcc	gaacgtgctg	840
35	cgtaacgctg	gcatcgacc	ggaagtttac	tctggtttcg	ccttcgggat	ggggatggag	900
	cgtctgacta	tgttgcgta	cggcgtcacc	gacctgcggt	cattcttcga	aaacgatctg	960
	cgtttcctca	aacagtttaa	ataa				984

40

<210> 2
 <211> 2388
 <212> ADN

45 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> misc_feature
 <223> subunidad beta E. Coli PheRS

50

<400> 2

55

60

65

ES 2 619 002 T3

5 atgaaattca gtgaactgtg gttacgcgaa tgggtgaacc cggcgattga tagcgatgcg 60
ctggcgaatc aaatcactat ggcgggcctg gaagttgacg gtgtagaacc ggttgccggt 120
agcttccacg gcgtggtcgt tgggtgaagtg gttgagtgtg cgcagcatcc gaacgctgac 180
10 aaactgogtg tgacaaaagt gaatgtcggc ggcgatcgcc tgctggacat cgtctgcggt 240
gcgccaaact gccgtcaggg cctgcgtgtg gcggtagcga ccattggtgc tgttctgccg 300
ggtgatttca aaattaaagc ggcgaaactg cgcggcgaac cgtctgaagg gatgctgtgc 360
15 tccttttctg agctgggaat ttctgacgac cataacggca ttatcgaact gcctgcagat 420
gcgcccattg gcaactgacat ccgcgaatac ctgaaactcg atgacaacac catcgaaatc 480
20 agcgtaacgc caaacgctgc cgactgttta ggtatcattg gtggtgcgcg tgacgttgcc 540
gtgctgaatc agctgccgct ggttgaaccg gaaatcgttc cggttggtgc gaccatcgac 600
gacacgctgc cgattacagt cgaagcggcg gaagcctgcc cgcgttatct tggccgtgtg 660
25 gtaaaaggca ttaacgttaa agcgcctaact ccgctgtgga tgaaagaaa actgcgtcgt 720
tgccggatcc gttctatcga tgcagttgtt gacgtacca actatgtgct gctcgaattg 780
ggccagccga tgcacgcttt cgataaagat cgcattgaag gcggcattgt ggtgccgatg 840
30 gcgaaaaggg gcgaaacgct ggtgctgctc gacggtagctg aagcgaagct gaatgctgac 900
actctggtca tcgccgacca caacaaggcg ctggcgatgg gcggcatctt cggtgccgaa 960
35 cactctggcg tgaatgacga aacacaaaac gtgctgctgg aatgcgcttt ctttagcccg 1020
ctgtctatca ccggtcgtgc tcgtcgtcat ggcctgcata ctgatgcgtc tcaccgttat 1080
gagcgtggcg ttgatccggc actgcagtac aaagcgatgg aacgtgcgac ccgtctgctg 1140
40 attgacatct gcggtggtga ggctggtccg gtaattgata tcaccaacga agcaacgctg 1200
ccgaagcgtg caaccatcac tttacgtcgt agcaaaactgg atcgcctgat cggccatcat 1260
45 attgcggatg agcaggtaac tgacattctg cgtcgtctcg gctgcgaagt gaccgaaggc 1320
aaagacgagt ggcaggcagt tgcgccgagc tggcgtttcg acatggagat tgaagaagat 1380
ctggtcgaag aagtgcgctg tgtttacggc tacaacaaca tcccggatga gccggtacag 1440
50 gcaagcctga ttatgggtac tcaccgtgaa gctgacctgt cgtcaagcg cgtgaaaacg 1500
ctgctcaacg ataaaggcta tcaggaagtg atcacctata gcttcggtga tccgaaagtg 1560
cagcagatga tccatccagc cgttgaagcc ttactgctgc caagcccgat ctctgttgaa 1620

55

60

65

ES 2 619 002 T3

5 atgtcagcaa tgcgtctttc tctgtggacc ggcctgctgg caaccgtggt gtacaaccag 1680
aaccgtcagc agaaccgtgt gcgcattttc gaaagcggtc tgcgtttcgt accagatact 1740
caggcaccgt tgggcattcg tcaggatctg atgttagccg gtgtgatttg cggtaaccgt 1800
10 tacgaagagc actggaacct ggcaaaagag accgttgatt tctatgattt gaaaggcgat 1860
cttgaatccg ttctcgacct gaccggtaaa ctgaatgagg ttgagttccg tgcagaagcg 1920
15 aatccggcac tgcacccggg gcaatccgca gcgatttatc tgaagggtga acgtattggt 1980
tttgttgggg ttgttcatcc tgaactggaa cgtaaactgg atcttaacgg tcgcactctg 2040
gtgttcgaac tggagtggaa caagctcgca gaccgcgtgg tgcctcaggc gcgcgagatt 2100
20 tctcgttcc cggcgaaccg togtgacatc gcggtggtgg tcgcagaaaa cgttcccgcga 2160
gcggatattt tatccgaatg taagaaagt ggcgtaaadc aggtagttgg cgtaaaccta 2220
tttgacgtgt acccgggtaa ggggtgttgcg gaggggtata agagcctcgc cataagcctg 2280
25 atcctgcaag ataccagccg tacactcgaa gaagaggaga ttgccgctac cgtcgccaaa 2340
tgtgtagagg cattaanaaga gcgattccag gcatcattga gggattga 2388

30 <210> 3
<211> 327
<212> PRT
<213> Escherichia coli

35 <220>
<221> MISC_FCCHARACTERISTICA
<223> subunidad alfa E. Coli PheRS

40 <400> 3

Met Ser His Leu Ala Glu Leu Val Ala Ser Ala Lys Ala Ala Ile Ser
1 5 10 15
45 Gln Ala Ser Asp Val Ala Ala Leu Asp Asn Val Arg Val Glu Tyr Leu
20 25 30
50 Gly Lys Lys Gly His Leu Thr Leu Gln Met Thr Thr Leu Arg Glu Leu
35 40 45
55 Pro Pro Glu Glu Arg Pro Ala Ala Gly Ala Val Ile Asn Glu Ala Lys
50 55 60
60 Glu Gln Val Gln Gln Ala Leu Asn Ala Arg Lys Ala Glu Leu Glu Ser
65 70 75 80
65 Ala Ala Leu Asn Ala Arg Leu Ala Ala Glu Thr Ile Asp Val Ser Leu
85 90 95

ES 2 619 002 T3

5 Pro Gly Arg Arg Ile Glu Asn Gly Gly Leu His Pro Val Thr Arg Thr
100 105 110

10 Ile Asp Arg Ile Glu Ser Phe Phe Gly Glu Leu Gly Phe Thr Val Ala
115 120 125

15 Thr Gly Pro Glu Ile Glu Asp Asp Tyr His Asn Phe Asp Ala Leu Asn
130 135 140

20 Ile Pro Gly His His Pro Ala Arg Ala Asp His Asp Thr Phe Trp Phe
145 150 155 160

25 Asp Thr Thr Arg Leu Leu Arg Thr Gln Thr Ser Gly Val Gln Ile Arg
165 170 175

30 Thr Met Lys Ala Gln Gln Pro Pro Ile Arg Ile Ile Ala Pro Gly Arg
180 185 190

35 Val Tyr Arg Asn Asp Tyr Asp Gln Thr His Thr Pro Met Phe His Gln
195 200 205

40 Met Glu Gly Leu Ile Val Asp Thr Asn Ile Ser Phe Thr Asn Leu Lys
210 215 220

45 Gly Thr Leu His Asp Phe Leu Arg Asn Phe Phe Glu Glu Asp Leu Gln
225 230 235 240

50 Ile Arg Phe Arg Pro Ser Tyr Phe Pro Phe Thr Glu Pro Ser Ala Glu
245 250 255

55 Val Asp Val Met Gly Lys Asn Gly Lys Trp Leu Glu Val Leu Gly Cys
260 265 270

60 Gly Met Val His Pro Asn Val Leu Arg Asn Val Gly Ile Asp Pro Glu
275 280 285

65 Val Tyr Ser Gly Phe Ala Phe Gly Met Gly Met Glu Arg Leu Thr Met
290 295 300

70 Leu Arg Tyr Gly Val Thr Asp Leu Arg Ser Phe Phe Glu Asn Asp Leu
305 310 315 320

75 Arg Phe Leu Lys Gln Phe Lys
325

ES 2 619 002 T3

<210> 4

<211> 795

<212> PRT

5 <213> Escherichia coli

<220>

<221> misc_feature

<223> subunidad beta E. Coli PheRS

10

<400> 4

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 619 002 T3

5 Met Lys Phe Ser Glu Leu Trp Leu Arg Glu Trp Val Asn Pro Ala Ile
1 5 10 15

10 Asp Ser Asp Ala Leu Ala Asn Gln Ile Thr Met Ala Gly Leu Glu Val
20 30

15 Asp Gly Val Glu Pro Val Ala Gly Ser Phe His Gly Val Val Val Gly
35 40 45

20 Glu Val Val Glu Cys Ala Gln His Pro Asn Ala Asp Lys Leu Arg Val
50 55 60

25 Thr Lys Val Asn Val Gly Gly Asp Arg Leu Leu Asp Ile Val Cys Gly
65 70 75 80

30 Ala Pro Asn Cys Arg Gln Gly Leu Arg Val Ala Val Ala Thr Ile Gly
85 90 95

35 Ala Val Leu Pro Gly Asp Phe Lys Ile Lys Ala Ala Lys Leu Arg Gly
100 105 110

40 Glu Pro Ser Glu Gly Met Leu Cys Ser Phe Ser Glu Leu Gly Ile Ser
115 120 125

45 Asp Asp His Ser Gly Ile Ile Glu Leu Pro Ala Asp Ala Pro Ile Gly
130 135 140

50 Thr Asp Ile Arg Glu Tyr Leu Lys Leu Asp Asp Asn Thr Ile Glu Ile
145 150 155 160

55 Ser Val Thr Pro Asn Arg Ala Asp Cys Leu Gly Ile Ile Gly Val Ala
165 170 175

60 Arg Asp Val Ala Val Leu Asn Gln Leu Pro Leu Val Gln Pro Glu Ile
180 185 190

65 Val Pro Val Gly Ala Thr Ile Asp Asp Thr Leu Pro Ile Thr Val Glu
195 200 205

Ala Pro Glu Ala Cys Pro Arg Tyr Leu Gly Arg Val Val Lys Gly Ile
210 215 220

ES 2 619 002 T3

5 Asn Val Lys Ala Pro Thr Pro Leu Trp Met Lys Glu Lys Leu Arg Arg
 225 230 235 240

10 Cys Gly Ile Arg Ser Ile Asp Ala Val Val Asp Val Thr Asn Tyr Val
 245 250 255

15 Leu Leu Glu Leu Gly Gln Pro Met His Ala Phe Asp Lys Asp Arg Ile
 260 265 270

20 Glu Gly Gly Ile Val Val Arg Met Ala Lys Glu Gly Glu Thr Leu Val
 275 280 285

25 Leu Leu Asp Gly Thr Glu Ala Lys Leu Asn Ala Asp Thr Leu Val Ile
 290 295 300

30 Ala Asp His Asn Lys Ala Leu Ala Met Gly Gly Ile Phe Gly Gly Glu
 305 310 315 320

35 His Ser Gly Val Asn Asp Glu Thr Gln Asn Val Leu Leu Glu Cys Ala
 325 330 335

40 Phe Phe Ser Pro Leu Ser Ile Thr Gly Arg Ala Arg Arg His Gly Leu
 340 345 350

45 His Thr Asp Ala Ser His Arg Tyr Glu Arg Gly Val Asp Pro Ala Leu
 355 360 365

50 Gln His Lys Ala Met Glu Arg Ala Thr Arg Leu Leu Ile Asp Ile Cys
 370 375 380

55 Gly Gly Glu Ala Gly Pro Val Ile Asp Ile Thr Asn Glu Ala Thr Leu
 385 390 395 400

60 Pro Lys Arg Ala Thr Ile Thr Leu Arg Arg Ser Lys Leu Asp Arg Leu
 405 410 415

65 Ile Gly His His Ile Ala Asp Glu Gln Val Thr Asp Ile Leu Arg Arg
 420 425 430

Leu Gly Cys Glu Val Thr Glu Gly Lys Asp Glu Trp Gln Ala Val Ala
 435 440 445

Pro Ser Trp Arg Phe Asp Met Glu Ile Glu Glu Asp Leu Val Glu Glu
 450 455 460

Val Ala Arg Val Tyr Gly Tyr Asn Asn Ile Pro Asp Glu Pro Val Gln

ES 2 619 002 T3

5 465 470 475 480
 Ala Ser Leu Ile Met Gly Thr His Arg Glu Ala Asp Leu Ser Leu Lys
 485 490 495
 10 Arg Val Lys Thr Leu Leu Asn Asp Lys Gly Tyr Gln Glu Val Ile Thr
 500 505 510
 15 Tyr Ser Phe Val Asp Pro Lys Val Gln Gln Met Ile His Pro Gly Val
 515 520 525
 20 Glu Ala Leu Leu Leu Pro Ser Pro Ile Ser Val Glu Met Ser Ala Met
 530 535 540
 25 Arg Leu Ser Leu Trp Thr Gly Leu Leu Ala Thr Val Val Tyr Asn Gln
 545 550 555 560
 30 Asn Arg Gln Gln Asn Arg Val Arg Ile Phe Glu Ser Gly Leu Arg Phe
 565 570 575
 35 Val Pro Asp Thr Gln Ala Pro Leu Gly Ile Arg Gln Asp Leu Met Leu
 580 585 590
 40 Ala Gly Val Ile Cys Gly Asn Arg Tyr Glu Glu His Trp Asn Leu Ala
 595 600 605
 45 Lys Glu Thr Val Asp Phe Tyr Asp Leu Lys Gly Asp Leu Glu Ser Val
 610 615 620
 50 Leu Asp Leu Thr Gly Lys Leu Asn Glu Val Glu Phe Arg Ala Glu Ala
 625 630 635 640
 55 Asn Pro Ala Leu His Pro Gly Gln Ser Ala Ala Ile Tyr Leu Lys Gly
 645 650 655
 60 Glu Arg Ile Gly Phe Val Gly Val Val His Pro Glu Leu Glu Arg Lys
 660 665 670
 65 Leu Asp Leu Asn Gly Arg Thr Leu Val Phe Glu Leu Glu Trp Asn Lys
 675 680 685
 70 Leu Ala Asp Arg Val Val Pro Gln Ala Arg Glu Ile Ser Arg Phe Pro
 690 695 700
 75 Ala Asn Arg Arg Asp Ile Ala Val Val Val Ala Glu Asn Val Pro Ala
 705 710 715 720

ES 2 619 002 T3

5 Ala Asp Ile Leu Ser Glu Cys Lys Lys Val Gly Val Asn Gln Val Val
725 730 735

10 Gly Val Asn Leu Phe Asp Val Tyr Arg Gly Lys Gly Val Ala Glu Gly
740 745 750

15 Tyr Lys Ser Leu Ala Ile Ser Leu Ile Leu Gln Asp Thr Ser Arg Thr
755 760 765

20 Leu Glu Glu Glu Glu Ile Ala Ala Thr Val Ala Lys Cys Val Glu Ala
770 775 780

25 Leu Lys Glu Arg Phe Gln Ala Ser Leu Arg Asp
785 790 795

30 <210> 5
<211> 350
<212> PRT
<213> Thermus thermophilus

35 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> subunidad alfa T. thermophilus PheRS

40 <400> 5

45 Met Leu Glu Glu Ala Leu Ala Ala Ile Gln Asn Ala Arg Asp Leu Glu
1 5 10 15

50 Glu Leu Lys Ala Leu Lys Ala Arg Tyr Leu Gly Lys Lys Gly Leu Leu
20 25 30

55 Thr Gln Glu Met Lys Gly Leu Ser Ala Leu Pro Leu Glu Glu Arg Arg
35 40 45

60 Lys Arg Gly Gln Glu Leu Asn Ala Ile Lys Ala Ala Leu Glu Ala Ala
50 55 60

65 Leu Glu Ala Arg Glu Lys Ala Leu Glu Glu Ala Ala Leu Lys Glu Ala
65 70 75 80

70 Leu Glu Arg Glu Arg Val Asp Val Ser Leu Pro Gly Ala Ser Leu Phe
85 90 95

75 Ser Gly Gly Leu His Pro Ile Thr Leu Met Glu Arg Glu Leu Val Glu
100 105 110

80 Ile Phe Arg Ala Leu Gly Tyr Gln Ala Val Glu Gly Pro Glu Val Glu
115 120 125

ES 2 619 002 T3

5 Ser Glu Phe Phe Asn Phe Asp Ala Leu Asn Ile Pro Glu His His Pro
130 135 140

10 Ala Arg Asp Met Trp Asp Thr Phe Trp Leu Thr Gly Glu Gly Phe Arg
145 150 155 160

15 Leu Glu Gly Pro Leu Gly Glu Glu Val Glu Gly Arg Leu Leu Leu Arg
165 170 175

20 Thr His Thr Ser Pro Met Gln Val Arg Tyr Met Val Ala His Thr Pro
180 185 190

25 Pro Phe Arg Ile Val Val Pro Gly Arg Val Phe Arg Phe Glu Gln Thr
195 200 205

30 Asp Ala Thr His Glu Ala Val Phe His Gln Leu Glu Gly Leu Val Val
210 215 220

35 Gly Glu Gly Ile Ala Met Ala His Leu Lys Gly Ala Ile Tyr Glu Leu
225 230 235 240

40 Ala Gln Ala Leu Phe Gly Pro Asp Ser Lys Val Arg Phe Gln Pro Val
245 250 255

45 Tyr Phe Pro Phe Val Glu Pro Gly Ala Gln Phe Ala Val Trp Trp Pro
260 265 270

50 Glu Gly Gly Lys Trp Leu Glu Leu Gly Gly Ala Gly Met Val His Pro
275 280 285

55 Lys Val Phe Gln Ala Val Asp Ala Tyr Arg Glu Arg Leu Gly Leu Pro
290 295 300

60 Pro Ala Tyr Arg Gly Val Thr Gly Phe Ala Phe Gly Leu Gly Val Glu
305 310 315 320

65 Arg Leu Ala Met Leu Arg Tyr Gly Ile Pro Asp Ile Arg Tyr Phe Phe
325 330 335

Gly Gly Arg Leu Lys Phe Leu Glu Gln Phe Lys Gly Val Leu
340 345 350

65 <210> 6
<211> 785

<212> PRT
<213> Thermus thermophilus

<220>

5 <221> MISC_FEATURE
<223> subunidad beta T. thermophilus PheRS

<400> 6

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 619 002 T3

5 Met Arg Val Pro Phe Ser Trp Leu Lys Ala Tyr Val Pro Glu Leu Glu
1 5 10 15

10 Ser Pro Glu Val Leu Glu Glu Arg Leu Ala Gly Leu Gly Phe Glu Thr
20 25 30

15 Asp Arg Ile Glu Arg Val Phe Pro Ile Pro Arg Gly Val Val Phe Ala
35 40 45

20 Arg Val Leu Glu Ala His Pro Ile Pro Gly Thr Arg Leu Lys Arg Leu
50 55 60

25 Val Leu Asp Ala Gly Arg Thr Val Glu Val Val Ser Gly Ala Glu Asn
65 70 75 80

30 Ala Arg Lys Gly Ile Gly Val Ala Leu Ala Leu Pro Gly Thr Glu Leu
85 90 95

35 Pro Gly Leu Gly Gln Lys Val Gly Glu Arg Val Ile Gln Gly Val Arg
100 105 110

40 Ser Phe Gly Met Ala Leu Ser Pro Arg Glu Leu Gly Val Gly Glu Tyr
115 120 125

45 Gly Gly Gly Leu Leu Glu Phe Pro Glu Asp Ala Leu Pro Pro Gly Thr
130 135 140

50 Pro Leu Ser Glu Ala Trp Pro Glu Glu Val Val Leu Asp Leu Glu Val
145 150 155 160

55 Thr Pro Asn Arg Pro Asp Ala Leu Gly Leu Leu Gly Leu Ala Arg Asp
165 170 175

60 Leu His Ala Leu Gly Tyr Ala Leu Val Glu Pro Glu Ala Ala Leu Lys
180 185 190

65 Ala Glu Ala Leu Pro Leu Pro Phe Ala Leu Lys Val Glu Asp Pro Glu
195 200 205

70 Gly Ala Pro His Phe Thr Leu Gly Tyr Ala Phe Gly Leu Arg Val Ala
210 215 220

75 Pro Ser Pro Leu Trp Met Gln Arg Ala Leu Phe Ala Ala Gly Met Arg

ES 2 619 002 T3

	225				230					235				240		
5	Pro	Ile	Asn	Asn	Val	Val	Asp	Val	Thr	Asn	Tyr	Val	Met	Leu	Glu	Arg
					245					250					255	
10	Ala	Gln	Pro	Met	His	Ala	Phe	Asp	Leu	Arg	Phe	Val	Gly	Glu	Gly	Ile
				260					265					270		
15	Ala	Val	Arg	Arg	Ala	Arg	Glu	Gly	Glu	Arg	Leu	Lys	Thr	Leu	Asp	Gly
			275					280					285			
20	Val	Glu	Arg	Thr	Leu	His	Pro	Glu	Asp	Leu	Val	Ile	Ala	Gly	Trp	Arg
		290					295					300				
25	Gly	Glu	Glu	Ser	Phe	Pro	Leu	Gly	Leu	Ala	Gly	Val	Met	Gly	Gly	Ala
	305					310					315					320
30	Glu	Ser	Glu	Val	Arg	Glu	Asp	Thr	Glu	Ala	Ile	Ala	Leu	Glu	Val	Ala
					325					330					335	
35	Cys	Phe	Asp	Pro	Val	Ser	Ile	Arg	Lys	Thr	Ala	Arg	Arg	His	Gly	Leu
				340					345					350		
40	Arg	Thr	Glu	Ala	Ser	His	Arg	Phe	Glu	Arg	Gly	Val	Asp	Pro	Leu	Gly
			355					360					365			
45	Gln	Val	Pro	Ala	Gln	Arg	Arg	Ala	Leu	Ser	Leu	Leu	Gln	Ala	Leu	Ala
		370					375						380			
50	Gly	Ala	Arg	Val	Ala	Glu	Ala	Leu	Leu	Glu	Ala	Gly	Ser	Pro	Lys	Pro
	385					390					395					400
55	Pro	Glu	Ala	Ile	Pro	Phe	Arg	Pro	Glu	Tyr	Ala	Asn	Arg	Leu	Leu	Gly
					405					410					415	
60	Thr	Ser	Tyr	Pro	Glu	Ala	Glu	Gln	Ile	Ala	Ile	Leu	Lys	Arg	Leu	Gly
				420					425					430		
65	Cys	Arg	Val	Glu	Gly	Glu	Gly	Pro	Thr	Tyr	Arg	Val	Thr	Pro	Pro	Ser
			435					440					445			
70	His	Arg	Leu	Asp	Leu	Arg	Leu	Glu	Glu	Asp	Leu	Val	Glu	Glu	Val	Ala
		450					455					460				
75	Arg	Ile	Gln	Gly	Tyr	Glu	Thr	Ile	Pro	Leu	Ala	Leu	Pro	Ala	Phe	Phe
	465					470					475					480

ES 2 619 002 T3

5 Pro Ala Pro Asp Asn Arg Gly Val Glu Ala Pro Tyr Arg Lys Glu Gln
 485 490 495
 Arg Leu Arg Glu Val Leu Ser Gly Leu Gly Phe Gln Glu Val Tyr Thr
 500 505 510
 10 Tyr Ser Phe Met Asp Pro Glu Asp Ala Arg Arg Phe Arg Leu Asp Pro
 515 520 525
 15 Pro Arg Leu Leu Leu Leu Asn Pro Leu Ala Pro Glu Lys Ala Ala Leu
 530 535 540
 20 Arg Thr His Leu Phe Pro Gly Leu Val Arg Val Leu Lys Glu Asn Leu
 545 550 555 560
 25 Asp Leu Asp Arg Pro Glu Arg Ala Leu Leu Phe Glu Val Gly Arg Val
 565 570 575
 30 Phe Arg Glu Arg Glu Glu Thr His Leu Ala Gly Leu Leu Phe Gly Glu
 580 585 590
 35 Gly Val Gly Leu Pro Trp Ala Lys Glu Arg Leu Ser Gly Tyr Phe Leu
 595 600 605
 40 Leu Lys Gly Tyr Leu Glu Ala Leu Phe Ala Arg Leu Gly Leu Ala Phe
 610 615 620
 45 Arg Val Glu Ala Gln Ala Phe Pro Phe Leu His Pro Gly Val Ser Gly
 625 630 635 640
 50 Arg Val Leu Val Glu Gly Glu Glu Val Gly Phe Leu Gly Ala Leu His
 645 650 655
 55 Pro Glu Ile Ala Gln Glu Leu Glu Leu Pro Pro Val His Leu Phe Glu
 660 665 670
 60 Leu Arg Leu Pro Leu Pro Asp Lys Pro Leu Ala Phe Gln Asp Pro Ser
 675 680 685
 65 Arg His Pro Ala Ala Phe Arg Asp Leu Ala Val Val Val Pro Ala Pro
 690 695 700
 Thr Pro Tyr Gly Glu Val Glu Ala Leu Val Arg Glu Ala Ala Gly Pro
 705 710 715 720
 Tyr Leu Glu Ser Leu Ala Leu Phe Asp Leu Tyr Gln Gly Pro Pro Leu
 725 730 735

ES 2 619 002 T3

5 Pro Glu Gly His Lys Ser Leu Ala Phe His Leu Arg Phe Arg His Pro
 740 745 750

10 Lys Arg Thr Leu Arg Asp Glu Glu Val Glu Glu Ala Val Ser Arg Val
 755 760 765

15 Ala Glu Ala Leu Arg Ala Arg Gly Phe Gly Leu Arg Gly Leu Asp Thr
 770 775 780

15 Pro
 785

20 <210> 7
 <211> 123
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Polinucleótido sintético

<400> 7

30 ggaatttcta caatggtggg ctcagctctc aggagaggtg cccatgcata tgtctacctg 60
 gtgagtaagg ccagtcacat ctccagaggc catcagcacc aggccctggg atcgaggcct 120
 35 cct 123

40 <210> 8
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

45 <400> 8

50 Met Val Gly Ser Ala Leu Arg Arg Gly Ala His Ala Tyr Val Tyr Leu
 1 5 10 15

55 Val Ser Lys Ala Ser His Ile Ser Arg Gly His Gln His Gln Ala Trp
 20 25 30

Gly Ser Arg Pro Pro
 35

60

65

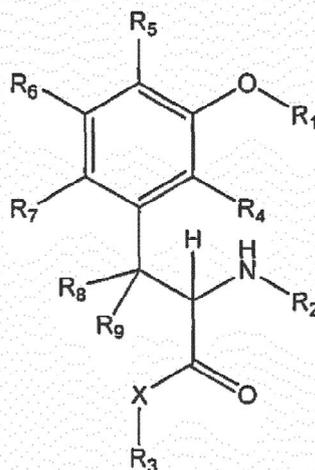
Reivindicaciones

1. Una planta transgénica que comprende al menos una célula que comprende al menos un polinucleótido exógeno que codifica una sintetasa de ARNt de aminoácido (aaRS) o un fragmento de la misma, los aaRS o un fragmento de los mismos que comprende un módulo de edición capaz de hidrolizar ARNt misacilada con análogo de aminoácido no proteico, en donde la planta es resistente al análogo de aminoácido no proteico y sales de los mismos, donde el análogo no aminoácidos de la proteína es compuesto de meta-tirosina (m-Tyr) y los aaRS es sintetasa de fenilalanilo-ARNt (PheRS).

2. La planta transgénica de la reivindicación 1, en la que dicha planta crece en un medio que contiene el aminoácido no proteico o sal del mismo en una concentración que inhibe significativamente el crecimiento de una planta no transgénica correspondiente, preferiblemente en la que la inhibición del crecimiento se muestra por al menos una de la reducción de longitud de la raíz, la reducción radical de la raíz, masa de raíces reducida, altura de la planta reducida, el cambio aberrante en una morfología de tejido de la planta o el color, reducción de la masa de planta con brotes, número reducido de planta con brotes y cualquier combinación de los mismos.

3. La planta transgénica de la reivindicación 1, en la que el compuesto m-Tyr tiene una fórmula de Fórmula I o una sal del mismo:

Formula I:



donde:

R₁ y R₂ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, sulfonato, sulfonamida, fosfonato, alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, alcoxicarbonilo, sacárido, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo, en el que cada uno de fosfonato, alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, alcoxicarbonilo, sacárido, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo está sustituido o no sustituido;

R₃ se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, alcoxicarbonilo, sacárido, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, y heteroarilo, en el que cada uno de los grupos alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, alcoxicarbonilo, sacárido, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo está sustituido o no sustituido;

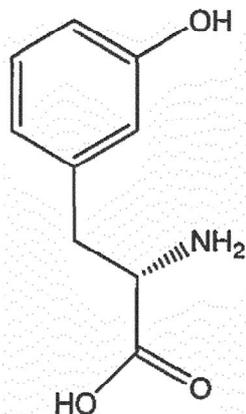
X se selecciona del grupo que consiste en O y NY, en el que Y se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, alcoxicarbonilo, sacárido, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, y heteroarilo, en el que cada uno de los grupos alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, alcoxicarbonilo, sacárido, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo está sustituido o no sustituido;

R₄, R₅, R₆ y R₇ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, hidroxilo, halógeno, amino, y nitro; y

R₈ y R₉ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, hidroxilo, halógeno, amino, metilo y metilo halogenado.

preferiblemente

en el que el compuesto m-Tyr tiene una fórmula de la Fórmula II:



4. La planta transgénica de la reivindicación 1, en la que PheRS es una PheRS bacteriana heterotetramérica compuesta por dos hebras PheRS- α y dos PheRS- β .

5. La planta transgénica de la reivindicación 4, en la que PheRS bacteriana se selecciona del grupo que consiste en PheRS *Escherichia coli* (*E. coli*) y PheRS *Thermus thermophilus* preferiblemente en el que el PheRS- α *E. Coli* está codificado por un polinucleótido que tiene el conjunto de secuencia de ácido nucleico expuesta en SEQ ID NO: 1 y PheRS- β *E. Coli* está codificado por un polinucleótido que tiene la secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 2; o en el que PheRS- α *E. Coli* comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 3 y PheRS- β *E. Coli* comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 4; o en la que PheRS- α *T. thermophilus* comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 5 y la PheRS- β *T. thermophilus* comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 6.

6. La planta transgénica de la reivindicación 1, en la que el polinucleótido que codifica los aaRS o fragmento de los mismos comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido dirigido seleccionado del grupo que consiste en un péptido de dirección mitocondrial y un péptido dirigido del cloroplasto; o dicha planta comprende una combinación del polinucleótido que codifica los aaRS o un fragmento del mismo que comprende además la secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido dirigido mitocondrial y el polinucleótido que codifica los aaRS o un fragmento de los mismos que comprende además la secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido de orientación del cloroplasto.

7. La planta transgénica de la reivindicación 6, en la que cada uno del péptido dirigido mitocondrial y el péptido dirigido al cloroplasto está codificado por un polinucleótido que tiene la secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 7, preferiblemente en la que cada uno del péptido dirigido mitocondrial y péptido dirigido de cloroplasto comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 8.

8. Una semilla de planta producida por la planta transgénica de la reivindicación 1, en la que la semilla comprende al menos un polinucleótido exógeno que codifica sintetasa de ARNt de aminoacilo (aaRs) dicho fragmento de la misma y en la que la semilla es para uso en la cría de una planta transgénica que comprende dicho polinucleótido exógeno que codifica una sintetasa de ARNt de aminoacilo (aaRs) o un fragmento de la misma que tiene un módulo de edición capaz de hidrolizar ARNt misacilada con análogo de aminoácido no proteico, en el que la planta transgénica es resistente al análogo de aminoácido no proteico y sales del mismo.

9. Un cultivo de tejido que comprende al menos una célula transgénica de la planta de la reivindicación 1 o un protoplasto derivado del mismo, preferiblemente en el que dicho cultivo de tejido regenera una planta transgénica que comprende al menos un polinucleótido exógeno que codifica una sintetasa de ARNt de aminoacilo (aaRs) o un fragmento del mismo que tiene un módulo de edición capaz de hidrolizar ARNt misacilada con análogo de aminoácido no proteico, la planta transgénica es resistente al análogo de aminoácido no proteico y sales de los mismos en el que el análogo de aminoácido no proteico es un compuesto de meta-tirosina (m-Tyr) y el aaRS es sintetasa de fenilalanilo-ARNt (PheRS).

10. Un método para producir una planta transgénica resistente a análogo de aminoácido fitotóxico no proteico o una sal del mismo, que comprende (a) la transformación de una célula vegetal con al menos un polinucleótido

exógeno que codifica una sintetasa de ARNt de aminoacilo (aaRs) o un fragmento de la misma que comprende un módulo de edición, el módulo de edición es capaz de hidrolizar ARNt aminoacilada no proteica; y (b) regenerar la célula transformada en una planta transgénica resistente al análogo de aminoácido fitotóxico no proteico o una sal del mismo en la que el análogo de aminoácidos no proteicos es el compuesto de la tirosina meta-(m-Tyr) y los aaRS es sintetasa de fenilalanilo-ARNt (PheRS).

11. El método de la reivindicación 10, en el que PheRS es un compuesto de PheRS bacteriana heterotetramérica por dos hebras de PheRS- α y dos PheRS- β .

12. El método de la reivindicación 11, en el que PheRS bacteriana se selecciona del grupo que consiste en PheRS *Escherichia coli* (*E. coli*) y PheRS *Thermus thermophilus*, preferiblemente, en el que el PheRS- α *E. Coli* se codifica por un polinucleótido que tiene la secuencia de ácido nucleico expuesta en SEQ ID NO: 1 y PheRS- β *E. Coli* está codificado por un polinucleótido que tiene la secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 2; o

en el que PheRS- α *T. thermophilus* comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 5 y PheRS- β *T. thermophilus* comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 6.

13. El método de la reivindicación 10,

en el que el polinucleótido que codifica los aaRS o fragmento de la misma comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido dirigido seleccionado del grupo que consiste de un péptido dirigido mitocondrial y un péptido dirigido cloroplasto; o

en el que la célula vegetal se transforma con una combinación del polinucleótido que codifica los aaRS o un fragmento del mismo que comprende además la secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido dirigido mitocondrial y el polinucleótido codifica los aaRS o un fragmento del mismo que comprende además la secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido dirigido de cloroplasto.

14. El método de la reivindicación 13, en el que cada uno del péptido dirigido mitocondrial y el péptido dirigido de cloroplasto está codificado por un polinucleótido que tiene la secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 7, preferiblemente en el que cada uno del péptido dirigido mitocondrial y el péptido dirigido de cloroplasto comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 8.

15. Una planta transgénica producida por el método de la reivindicación 10, en la que la planta es resistente al aminoácido fitotóxico no proteico; preferiblemente

en el que dicha planta crece en un medio que contiene el aminoácido no proteico o sal del mismo en una concentración que inhibe significativamente el crecimiento de una planta no transgénica correspondiente; o en el que el aminoácido fitotóxico no proteico es compuesto de meta-tirosina (m-Tyr).

FIGURA 1A

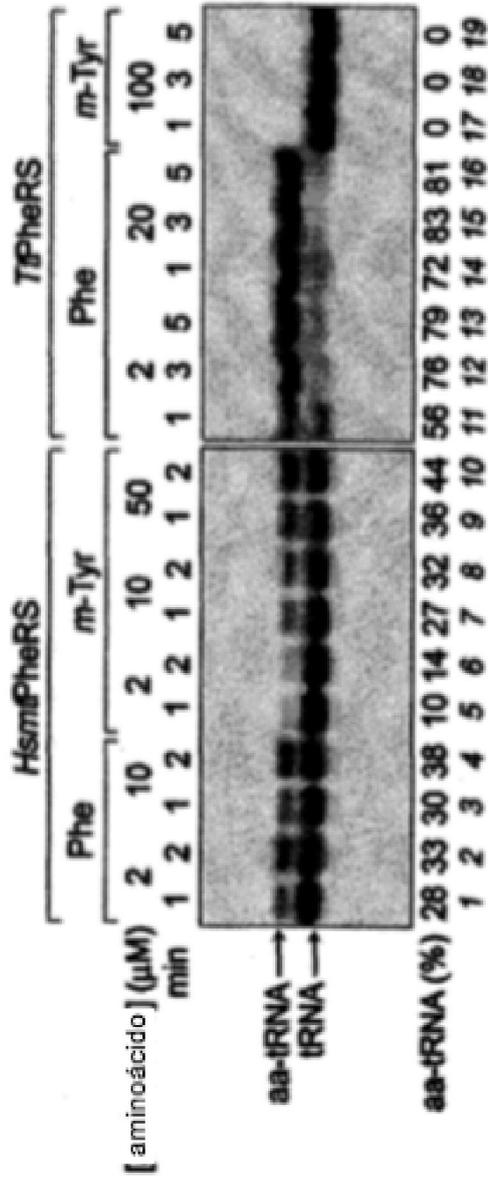
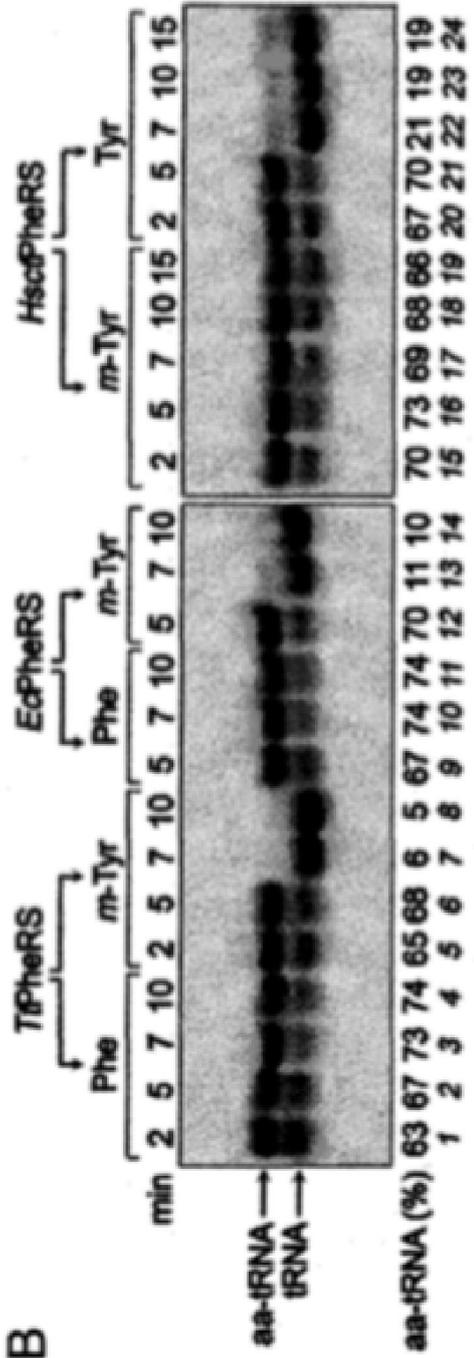


FIGURA 1B



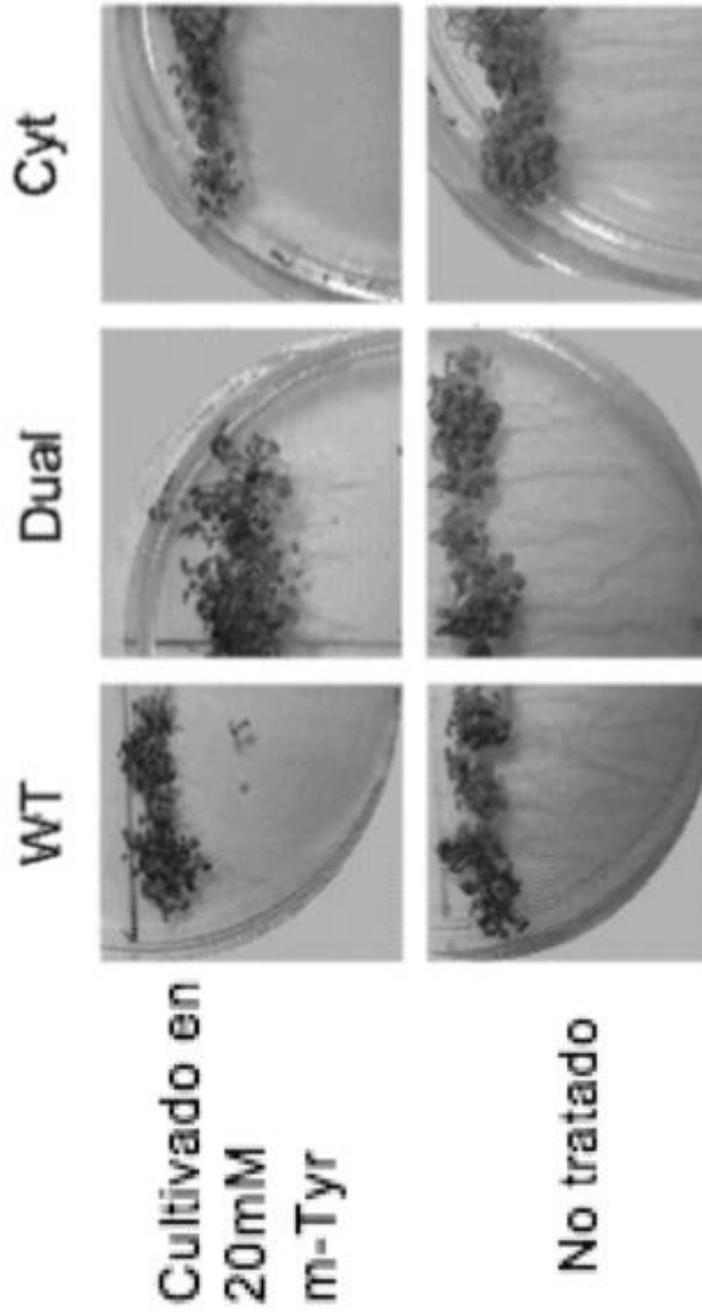


FIGURA 2