

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 758 873**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/00** (2006.01)

**C12N 15/82** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.11.2012 E 16190303 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2019 EP 3199624**

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:

**06.05.2020**

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:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

**ES 2 758 873 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 INVENCIÓN

[0001] La presente invención se refiere a plantas transgénicas resistentes a los bioherbicidas, particularmente a los aminoácidos fitotóxicos no proteicos que incluyen análogos de aminoácidos de metatirosina y sus sales, y a métodos para producir las plantas transgénicas.

10

## ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0002] "Alelopatía" es un término que se refiere a un efecto (inhibitorio o estimulante) de una planta sobre las especies circundantes por los compuestos químicos (compuestos aleloquímicos) liberados por la planta al entorno. Los compuestos aleloquímicos suelen ser metabolitos secundarios que pueden sintetizarse en cualquiera de las partes de la planta y que pueden tener efectos beneficiosos (alelopatía positiva) o perjudiciales (alelopatía negativa) en los organismos sobre los que actúan. Los compuestos aleloquímicos no son necesarios para el metabolismo (es decir, el crecimiento, el desarrollo y la reproducción) de la planta alelopática (resistente), pero interfieren con las vías metabólicas vitales de las especies no resistentes, lo que proporciona una ventaja relativa a la planta resistente. El efecto alelopático ya se había descubierto en la Antigua Grecia. La ventaja del efecto alelopático de varias plantas de cultivo ampliamente utilizadas como el trigo, el arroz y el pepino es conocida y utilizada. Últimamente ha aumentado la conciencia sobre el potencial de la implementación de este fenómeno en el control de las malas hierbas. Entre otros compuestos aleloquímicos observados, se propuso la metatirosina, que muestra una prometedora actividad fitotóxica, como posible supresor de malas hierbas respetuoso con el medio ambiente (Bertin C. et al., 2007. Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A104, 16964-16969).

15

20

25

[0003] La metatirosina (m-Tyr) es un aminoácido natural no proteico. Se puede producir por dos posibles vías de síntesis: a través de la vía de síntesis de dopamina o por oxidación de fenilalanina por especies reactivas de oxígeno. La m-Tyr, un isómero del aminoácido proteico común tirosina (p-tirosina), se ha encontrado en *Euphorbia myrsinites* y algunas especies de festuca. De origen vegetal, se ha descubierto que la m-Tyr es tóxica para un amplio espectro de especies. A una concentración tan baja como 2  $\mu\text{M}$  añadida a un medio de agar, la m-Tyr inhibe el crecimiento de las raíces de *Arabidopsis thaliana* en un 50 %, y evita completamente la germinación de la semilla a una concentración de 50  $\mu\text{M}$  (Bertin C. et al. 2007, ibidem).

30

35

[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 las células eucariotas, ciertos aminoácidos oxidados suministrados exógenamente, incluida la m-Tyr, pueden incorporarse a las proteínas mediante las vías biosintéticas de las células en lugar de a través de reacciones químicas. Por lo tanto, es probable que, en muchos casos, los aminoácidos dañados *in vivo* estén disponibles para la síntesis de proteínas de nuevo. Esta teoría está respaldada por el hallazgo de que la exposición a m-Tyr resulta en la inhibición del crecimiento de una amplia gama de especies de plantas, incluidas las plantas de cultivo monocotiledóneas y dicotiledóneas importantes desde el punto de vista comercial. Se ha sugerido además que la fitotoxicidad de la m-Tyr es causada por su incorporación a las proteínas en lugar de la fenilalanina durante la síntesis de las proteínas.

40

45

[0005] La fenilalanil-ARNt sintetasa (PheRS) pertenece a la familia de las aminoacil-ARNt sintetetasas (aaRS), que desempeñan una función fundamental en la traducción del código genético. Las aaRS aseguran la fidelidad de la traducción del código genético, uniendo covalentemente los aminoácidos apropiados a las moléculas adaptadoras de ácido nucleico correspondientes - ARNt. Las aaRS son una familia notablemente diversa de enzimas, que varían considerablemente en la secuencia primaria, el tamaño de la subunidad y la organización oligomérica. Los análisis filogenéticos y estructurales revelan tres formas principales de PheRS: a) PheRS bacteriana ( $\alpha\beta$ )<sub>2</sub> heterotetramérica; b) PheRS arqueal/eucariota-citoplasmática ( $\alpha\beta$ )<sub>2</sub> heterotetramérica; y c) PheRS mitocondrial monomérica.

50

55

[0006] La precisión de la reacción de aminoacilación promovida por las aaRS, y por la PheRS en particular, se basa en el reconocimiento preciso del sustrato de aminoácidos. 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. La PheRS diferencia con éxito entre estos aminoácidos con un índice de error de 1:1000. Una actividad de edición de PheRS junto con otras aaRS garantiza un mayor nivel de precisión total de la biosíntesis de proteínas. La actividad de edición está asociada con el sitio específico, donde se hidrolizan los ARNt acilados incorrectamente.

60

65

[0007] Algunos de los inventores de la presente invención y colaboradores investigaron la capacidad de PheRS procedentes de diversas fuentes, incluyendo fuentes bacterianas (*Thermus thermophilus* (Tt) y *Escherichia coli* (CE)) y humanas (citósolicas (Hsct) y mitocondriales (Hsmt)) para activar m-Tyr y adjuntarla a ARNt<sup>Phe</sup> (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 según lo probado por la hidrólisis de ATP. Las mediciones cinéticas de la aminoacilación en estado estacionario (analizadas mediante electroforesis en gel ácido) no revelaron una carga incorrecta de ARNt<sup>Phe</sup> con m-Tyr por PheRS bacteriana (Fig. 1). Esta observación sirve como una indicación de la eficiencia del mecanismo de edición. Además, cuando la PheRS bacteriana se incubó con m-Tyr-ARNt<sup>Phe</sup> precargado, la m-Tyr fue desacilada del ARNt, proporcionando la evidencia de la llamada actividad de edición trans (Ling, J. et al., 2007. Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A 104, 72-77). Por el contrario, la enzima mitocondrial podría sintetizar m-Tyr-ARNt<sup>Phe</sup> de manera estable. La HsmtPheRS no contiene 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 a las cadenas de polipéptidos de proteínas. El análisis de parámetros cinéticos de la aminoacilación de ARNt<sup>Phe</sup> muestra que la eficiencia catalítica ( $k_{cat}/K_m$ ) de la unión de m-Tyr por HsmtPheRS es solo cinco veces menor que la del aminoácido correcto, principalmente debido a un mayor valor  $K_m$ . La actividad catalítica relativamente alta de las PheRS mitocondriales hacia m-Tyr y la falta de actividad de edición pueden explicar el profundo efecto tóxico que tiene la m-Tyr en las plantas. En las plantas, más de 150 proteínas se expresan en las mitocondrias y los cloroplastos, y la fenilalanil-ARNt sintetasa (PheRS) monomérica, presente en los orgánulos de las plantas, se parece mucho a las PheRS mitocondriales humanas. Por lo tanto, la incorporación de m-Tyr en lugar de Phe en las proteínas de los orgánulos produce una gran cantidad de proteínas dañadas, lo que reduce la viabilidad celular. La toxicidad moderada de la m-Tyr para las células de mamíferos puede explicarse por el hecho de que en estas células una mitocondria codifica solo 13 proteínas.

[0008] La reducción del uso de herbicidas se ha convertido en un objetivo importante para mantener la agricultura sostenible y la gestión del paisaje. Hay un esfuerzo continuo en el desarrollo de enfoques biológicos y orgánicos para el control de malas hierbas que puedan reemplazar de manera eficaz al uso de productos químicos peligrosos. Al mismo tiempo, se realizan esfuerzos para contar con medios y métodos para proteger las plantas de cultivo de los compuestos fitotóxicos adoptando el enfoque de la genética molecular y/o empleando productos naturales.

[0009] Por ejemplo, la publicación internacional de solicitud PCT N° WO/2005/077171 describe métodos para proteger a las plantas de daños y lesiones por herbicidas al recubrir o preparar las semillas 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 importante toxicidad de m-Tyr para las plantas y, por el contrario, su efecto reducido sobre hongos, mamíferos o bacterias, han llevado a su desarrollo como un herbicida biológico. La publicación de solicitud de patente de EE. UU. n° 20080261815 describe métodos para usar compuestos de m-tirosina de especies de Festuca para inhibir el crecimiento de malas hierbas y potenciar el crecimiento de plantas distintas de estas, y describe además métodos para identificar plantas que tienen propiedades herbicidas. El inconveniente del uso de m-tirosina como bioherbicida es que es tóxica no solo para las malas hierbas, sino también para las plantas de cultivo.

[0011] WO 2005/090582 describe el uso de la D-aminoácido oxidasa como marcador seleccionable o gen resistente a herbicidas en plantas. Las plantas portadoras del gen pueden cultivarse en medios que comprenden D-aminoácidos que son tóxicos para las plantas de tipo salvaje.

[0012] WO 2006/086474 describe el uso de metatirosina como herbicida para el control de las malas hierbas.

[0013] Klipca et al revelan en PNAS, 106 (2009), 11045-11048 que las aminoacil ARNt sintasas de origen animal no comprenden una actividad de edición, al contrario que las de origen bacteriano.

[0014] Existe una necesidad de, y sería altamente efectivo, disponer de medios para producir plantas transgénicas, particularmente plantas de cultivo u ornamentales que sean resistentes a compuestos aleloquímicos fitotóxicos, por ejemplo a aminoácidos no proteicos que incluyen m-tirosina.

## RESUMEN DE LA INVENCION

[0015] La presente invención proporciona medios y métodos para conferir a las plantas transgénicas resistencia a la presencia de aminoácidos fitotóxicos no proteicos en el medio de cultivo de la planta. La presente invención proporciona además plantas transgénicas resistentes a aminoácidos fitotóxicos no proteicos, particularmente a la metatirosina (m-Tyr) y sus sales.

[0016] La presente invención se basa en parte en el descubrimiento inesperado de que la expresión de fenilalanil-ARNt sintetasa (PheRS) bacteriana dentro de una célula vegetal, particularmente cuando la PheRS se expresa dentro de la mitocondria y/o cloroplasto, confiere resistencia de la planta a la metatirosina. Esta resistencia se debe a la capacidad de las PheRS bacterianas introducidas para hidrolizar las m-Tyr-ARNt<sup>Phe</sup> aciladas incorrectamente y para evitar la incorporación del aminoácido no proteico a proteínas.

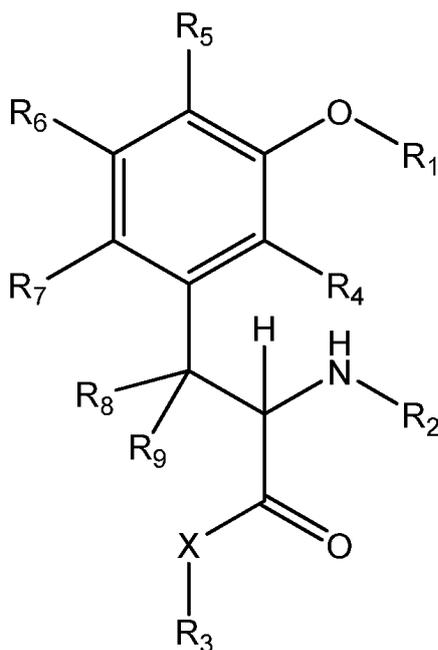
[0017] Por lo tanto, según un aspecto, la presente invención proporciona una planta transgénica que comprende al menos una célula que comprende al menos un polinucleótido exógeno que codifica una aminoacil ARNt sintetasa (aaRS) o un fragmento de la misma, donde la aaRS o un fragmento de la misma que comprende un módulo de edición que hidroliza ARNt acilada incorrectamente con un análogo de aminoácidos no proteicos, en donde la planta es resistente al análogo de aminoácidos no proteicos y sus sales.

[0018] En el contexto de la presente invención, el término "resistente al análogo de aminoácidos no proteicos" se refiere a la capacidad de la planta transgénica de crecer en un medio de cultivo que comprende el análogo de aminoácidos no proteicos en una concentración que inhibe significativamente el crecimiento de una planta no transgénica correspondiente. De acuerdo con algunas formas de realización, la inhibición del crecimiento se muestra en al menos una de las siguientes características: longitud de raíz reducida, radical de raíz reducido, masa de raíz reducida, altura de planta reducida, alteración anormal en la morfología o el color de un tejido vegetal, masa y/o número de brotes de planta reducidos y cualquier combinación de estos. Según algunas formas de realización, el análogo de aminoácidos no proteicos aislado o una composición que lo comprende se agrega al medio de cultivo. El análogo de aminoácidos no proteicos puede secretarse al medio de cultivo a partir de una planta que lo produce.

[0019] De acuerdo con algunas formas de realización, el análogo de aminoácidos no proteicos es el compuesto de metatirosina (m-Tyr) y la aaRS es fenilalanil-ARNt sintetasa (PheRS).

[0020] Según algunas formas de realización, el compuesto m-Tyr tiene una fórmula de fórmula I o una sal de la misma:

Fórmula I:



Donde

R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, sulfonato, sulfonamida, fosfonato, alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, alcoxicarbonilo, sacárido, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo, en donde cada uno de los fosfonato, alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, alcoxicarbonilo, sacárido, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo están sustituidos o no sustituidos;

R<sub>3</sub> se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, alcoxicarbonilo, sacárido, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo, en donde cada uno de los alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, alcoxicarbonilo, sacárido, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo están sustituidos o no sustituidos;

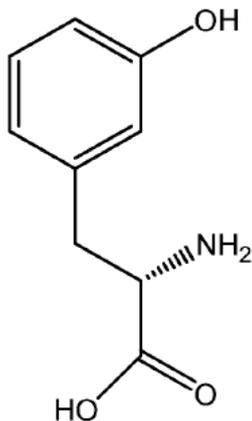
X se selecciona del grupo que consiste en O y N-Y, en donde Y se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, alcoxicarbonilo, sacárido, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo, en donde cada uno de los alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, alcoxicarbonilo, sacárido, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo están sustituidos o no sustituidos;

R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, hidroxilo, halógeno, amino y nitro; y

5 R<sub>8</sub> y R<sub>9</sub> se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, hidroxilo, halógeno, amino, metilo y metilo halogenado.

[0021] De acuerdo con algunas formas de realización típicas, el compuesto m-Tyr tiene la fórmula de la Fórmula II:

10



[0022] Según algunas formas de realización típicas actualmente, la PheRS es PheRS bacteriana. Se sabe que la PheRS bacteriana es heterotetramérica, que comprende dos subunidades  $\alpha$  y dos  $\beta$ . Según algunas formas de realización, las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  están codificadas por un único polinucleótido. Según otras formas de realización, cada una de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  está codificada por un polinucleótido separado. Según otras formas de realización adicionales, la PheRS bacteriana comprende al menos una subunidad  $\beta$  o un fragmento de esta que comprende el módulo de edición.

20 [0023] Según algunas formas de realización, la PheRS bacteriana es una PheRS bacteriana heterotetramérica seleccionada del grupo que consiste en PheRS de *Escherichia coli* (*E. coli*) y PheRS de *Thermus thermophilus*.

[0024] Según algunas formas de realización, la subunidad PheRS- $\alpha$  de *E. coli* está codificada por un polinucleótido que tiene la secuencia de ácido nucleico establecida en la SEQ ID NO: 1 y la subunidad PheRS- $\beta$  de *E. coli* está codificada por un polinucleótido que tiene la secuencia de ácido nucleico establecida en la SEQ ID NO: 2.

[0025] Según otras formas de realización, la subunidad PheRS- $\alpha$  de *E. coli* comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 3 y la subunidad PheRS- $\beta$  de *E. coli* comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 4.

[0026] Según otras formas de realización, la subunidad PheRS- $\alpha$  de *T. thermophilus* comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 5 y la subunidad PheRS- $\beta$  de *T. thermophilus* comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 6.

35 [0027] Según algunas formas de realización, el polinucleótido que codifica la aaRS o un fragmento de este que comprende el módulo de edición comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido de direccionamiento seleccionado del grupo que consiste en un péptido de direccionamiento hacia las mitocondrias y un péptido de direccionamiento hacia los cloroplastos. Los péptidos que se dirigen a las mitocondrias y a los cloroplastos pueden ser iguales o diferentes. Típicamente, el polinucleótido está diseñado de manera que el péptido de direccionamiento codificado se fusiona en el extremo amino (extremo N) del polipéptido aaRS codificado.

45 [0028] Según algunas formas de realización, la planta transgénica comprende una combinación del polinucleótido exógeno que codifica la aminoacil ARNt sintetasa (aaRS) o un fragmento de la misma que comprende además la secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido de direccionamiento hacia las mitocondrias y el polinucleótido exógeno que codifica la aaRS o un fragmento de la misma que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido de direccionamiento hacia los cloroplastos. El péptido de direccionamiento hacia los cloroplastos y el péptido de direccionamiento hacia las mitocondrias pueden ser iguales o diferentes.

[0029] De acuerdo con algunas formas de realización, los péptidos de direccionamiento hacia las mitocondrias y los cloroplastos están codificados por la secuencia de ácido nucleico establecida en la SEQ ID NO: 7 y tienen la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 8.

5 [0030] Además, los polinucleótidos de la presente invención pueden incorporarse en una construcción de ADN que permita su expresión en la célula vegetal. La construcción de ADN puede comprender al menos un elemento regulador de la 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.

10 [0031] La construcción de ADN puede comprender un promotor. El promotor puede ser promotor constitutivo, inducido o específico para un tejido, como se conoce en la técnica. Cada posibilidad representa una forma de realización separada de la presente invención. Según algunas formas de realización, el promotor es un promotor constitutivo operable en una célula vegetal. El promotor puede ser un promotor específico de raíz. La construcción de ADN puede comprender además señales de terminación de la transcripción y de secuencia de poliadenilación.

15 [0032] Opcionalmente, la construcción de ADN puede comprender 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  
20 y una combinación de estos.

[0033] La presente invención también abarca semillas de la planta transgénica, en donde la semilla comprende dicho al menos un polinucleótido exógeno que codifica dicha aminoacil ARNt sintasa (aaRS) o dicho fragmento de la misma en el que las plantas cultivadas a partir de dichas semillas son resistentes al análogo de aminoácido no  
25 proteico fitotóxico, particularmente a m-Tyr. La presente invención abarca además frutos, hojas o cualquier parte de la planta transgénica, así como cultivos de tejidos o un protoplasto derivado de la misma y plantas regeneradas a partir de ella.

[0034] Según otro aspecto más, la presente invención proporciona un método para producir una planta transgénica resistente a un análogo de aminoácido no proteico fitotóxico o una sal del mismo, que comprende (a) transformar una célula vegetal con al menos un polinucleótido exógeno que codifica una aminoacil ARNt sintetasa (aaRS) o un fragmento de la misma que comprende un módulo de edición, en el que el módulo de edición hidroliza ARNt aminoacilado no proteico acilado incorrectamente con dicho análogo de aminoácido fitotóxico no proteico; y (b)  
30 regenerar la célula transformada para obtener una planta transgénica resistente al análogo de aminoácido no proteico fitotóxico o una sal del mismo.

[0035] El/los polinucleótido(s) exógeno(s) que codifica(n) la aminoacil ARNt sintetasa (aaRS) o un fragmento de este/estos que comprende el módulo de edición, capaz de hidrolizar ARNt aminoacilado no proteico de acuerdo con lo divulgado por la presente invención, puede(n) introducirse en una construcción de ADN para incluir la totalidad elementos necesarios para la transcripción y traducción como se ha descrito anteriormente, de modo que los polipéptidos se expresen dentro de la célula vegetal.

[0036] La transformación de plantas con un polinucleótido o una construcción de ADN puede realizarse por diversos medios, como sabe un experto en la materia. Los métodos comunes se ejemplifican, pero no se limitan a, transformación mediada por *Agrobacterium*, bombardeo de microproyectiles, transferencia mediada por polen, transformación mediada por virus de ARN de plantas, transformación mediada por liposomas, transferencia génica directa (por ejemplo, por microinyección) y electroporación de callos embriogénicos compactos. Según una forma de realización, las plantas transgénicas de la presente invención se producen usando transformación mediada por *Agrobacterium*.

[0037] Las plantas transgénicas que comprenden los polinucleótidos exógenos que codifican aaRS o un fragmento de esta que comprende el módulo de edición de acuerdo con lo divulgado por la presente invención pueden seleccionarse empleando métodos estándar de genética molecular, como conoce una persona experta en la técnica. Según algunas formas de realización, las plantas transgénicas se seleccionan según su resistencia a un antibiótico o herbicida. Según una forma de realización, el antibiótico que sirve como marcador seleccionable es uno del grupo que consiste en cefotaxima, vancomicina y kanamicina. El herbicida que sirve como marcador seleccionable puede ser el herbicida no selectivo glufosinato de amonio (BASTA®).

[0038] Según otras formas de realización más, las plantas transgénicas de la invención se seleccionan en función de su resistencia al análogo de aminoácido no proteico fitotóxico o sus sales.

[0039] Cualquier planta puede transformarse con los polinucleótidos de la presente invención para producir las plantas transgénicas resistentes a la presencia de análogos de aminoácidos fitotóxicos no proteicos, particularmente m-Tyr o una de sus sales en el medio de cultivo de la planta. Según formas de realización típicas, la planta es una planta de cultivo o una planta ornamental.

[0040] Otros objetos, características y ventajas de la presente invención quedarán claros a partir de la siguiente descripción y dibujos.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5

[0041]

La figura 1 muestra la aminoacilación de ARNt<sup>Phe</sup> con aminoácidos nativos y no proteicos y la desacilación específica del producto cargado incorrectamente. Fig. 1A: Aminoacilación de transcrito de ARNt<sup>Phe</sup> de *E. coli* (1,2 μM) con Phe o m-Tyr por PheRS mitocondrial humana (Hsmt) (210 nM) o PheRS de *Thermus thermophilus* (Tt)(24 nM) analizado por electroforesis en gel desnaturante al 8% en condiciones ácidas (acetato de sodio 0,1 M, pH 5). Fig. 1B: Desacilación específica de transcrito de m-Tyr-ARNt<sup>Phe</sup>. El transcrito de ARNt<sup>Phe</sup> de *E. coli* (1,2 μM) se aminoaciló con Phe (25 μM), metro-Tyr (125 μM) o Tyr (1 mM) por HsmtPheRS (250 nM en experimentos con Phe y m-Tyr, o 500 nM en experimentos con Tyr) durante 5 min; luego la reacción continuó después de la adición (mostrada por flechas) de TtPheRS (16 nM), PheRS (48 nM) de *E. coli* (*Ec*) o HsctPheRS (32 nM) (recuperado de Klipcan L. et al. 2009, ibídem).

La Figura 2 muestra los fenotipos de tipo salvaje y líneas transgénicas de *A. Taliana*. Crecimiento radical de Wt (tipo salvaje), Cyt (planta transgénica que contiene PheRS bacteriana localizada en citosol) y Dual (planta transgénica que contiene PheRS bacteriana localizada en plastidios). Paneles superiores: muestras cultivadas en medios que contienen 20 μM de m-tirosina. Paneles inferiores: muestras no tratadas.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0042] La presente invención proporciona plantas transgénicas que son resistentes a la presencia de un aminoácido fitotóxico no proteico en el medio de cultivo, de modo que el crecimiento de la planta resistente no se ve esencialmente afectado por el aminoácido fitotóxico. La presente invención proporciona además medios y un método para producir las plantas transgénicas de la invención. Según algunas formas de realización, el aminoácido fitotóxico no proteico es un compuesto de metatirosina (m-Tyr) o una de sus sales.

30

#### Definiciones

[0043] Los términos "aminoacil ARNt sintetasa" o "aaRS" se usan en este documento como es común en la técnica anterior. 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 aminoacil-ARNt. El módulo de edición de aaRS ha evolucionado para corregir la mala acilación de aminoácidos no afines 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 afín y el ARNt. El término "fragmento de la misma" cuando se usa con referencia a la enzima aaRS, se refiere a un fragmento de la enzima que conserva su actividad catalítica y además comprende el módulo de edición de enzimas que es capaz de hidrolizar un aminoácido no proteico acilado incorrectamente al ARNt.

40

[0044] Los términos "aminoácido no proteico" y "análogo de aminoácido no proteico" se usan en este documento de manera intercambiable y se refieren a aminoácidos no incluidos en el conjunto de los 22 aminoácidos canónicos como es común en la técnica anterior.

45

[0045] El término "planta" se usa 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 medida en una estructura que está presente en cualquier etapa del desarrollo de una planta. Dichas estructuras incluyen, entre otras, una raíz, tallo, brote, hoja, flor, pétalo, fruto, etc.

50

[0046] Como se usa en el presente documento, el término "medio de cultivo" se refiere a cualquier medio que pueda usarse para apoyar el crecimiento de una planta, y puede incluir, sin limitación, diversos tipos de tierras o medios nutritivos de plantas. Los ejemplos adecuados de suelos incluyen, sin limitación, tierra natural y tierra artificial.

55

[0047] Los términos "polinucleótido", "secuencia de polinucleótido", "secuencia de ácido nucleico" y "polinucleótido aislado" se usan indistintamente en el presente documento. Estos términos abarcan secuencias de nucleótidos y similares. Un polinucleótido puede ser un polímero de ARN o ADN o un híbrido del mismo, que es monocatenario o bicatenario, lineal o ramificado, y que opcionalmente contiene bases de nucleótidos sintéticas, no naturales o alteradas. Los términos también abarcan híbridos de ARN/ADN.

60

[0048] El término "construcción", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada o ensamblada artificialmente 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 también puede ser 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

65

van a utilizar las secuencias reguladoras de una célula hospedadora. El término construcción incluye vectores pero no debe verse como limitado a los mismos.

[0049] El término "operativamente unido" se refiere a la asociación de secuencias de ácido nucleico en un solo fragmento de ácido nucleico para que su función se regule entre sí. Por ejemplo, un promotor está operativamente unido con una secuencia de codificación cuando es capaz de regular la expresión de esa secuencia de codificación (es decir, que la secuencia de codificación está bajo el control transcripcional del promotor). Las secuencias de codificación pueden estar operativamente unidas a secuencias reguladoras en una orientación sentido o antisentido.

[0050] Los términos "elemento promotor", "promotor" o "secuencia promotora", como se usan en el presente documento, se refieren a una secuencia de ADN que se encuentra en el extremo 5' (es decir, que precede a la región de codificación de proteínas de un polímero de ADN). La ubicación 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 a partir del gen. El promotor, por lo tanto, sirve como un elemento regulador transcripcional y también proporciona un sitio para el inicio 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 materia entienden que diferentes promotores pueden dirigir la expresión de un gen en diferentes tejidos o tipos de células, o en diferentes etapas de desarrollo, o en respuesta a diferentes condiciones ambientales. Se reconoce además que, dado que en la mayoría de los casos los límites exactos de las secuencias reguladoras no se han definido completamente, los fragmentos de ADN de alguna variación pueden tener una 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". Constantemente se descubren nuevos promotores de varios tipos útiles en células vegetales; numerosos ejemplos se pueden encontrar en Okamura J K y Goldberg R B (1989) *Biochemistry of Plants* 15: 1-82.

[0051] Como se usa en el presente documento, el término "potenciador" se refiere a una secuencia de ADN que puede estimular la actividad del promotor, y puede ser un elemento innato del promotor o un elemento heterólogo insertado para mejorar el nivel o la especificidad a un tejido de un promotor.

[0052] El término "expresión", como se usa en el presente documento, se refiere a la producción de un producto final funcional, por ejemplo, un ARNm o una proteína.

[0053] El término "transgénico" cuando se usa en referencia a una planta o semilla (es decir, una "planta transgénica" o una "semilla transgénica") 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 en general a una planta, una estructura vegetal, un tejido vegetal, una semilla vegetal 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 la planta ubicado 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 usan en el presente documento se refieren a una planta que comprende al menos una célula que comprende un polinucleótido transcribible exógeno y a una planta del mismo tipo que carece de dicho polinucleótido transcribible exógeno.

[0054] Los términos "transformantes" o "células transformadas" incluyen la célula transformada primaria y los cultivos derivados de esa célula independientemente del número de transferencias. Toda la progenie puede no ser exactamente idéntica en cuanto al contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas. La progenie mutante que tiene la misma funcionalidad que la cribada en la célula transformada originalmente se incluye en la definición de transformantes.

[0055] La transformación de una célula puede ser estable o transitoria. El término "transformación transitoria" o "transformada transitoriamente" 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 hospedadora. La transformación transitoria puede detectarse mediante, por ejemplo, un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), que detecta la presencia de un polipéptido codificado por uno o más de los polinucleótidos exógenos. Alternativamente, la transformación transitoria puede detectarse mediante la detección de la actividad de la proteína (por ejemplo,  $\beta$ -glucuronidasa) codificada por el polinucleótido exógeno.

[0056] El término "transformante transitorio" se refiere a una célula que ha incorporado transitoriamente uno o más polinucleótidos exógenos. En contraste, el término "transformación estable" o "transformado de manera estable" 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 de transferencia Southern 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 detectarse por

la actividad enzimática de un gen integrado en el tejido en crecimiento o por la reacción en cadena de la 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 manera estable uno o más polinucleótidos exógenos en el ADN genómico o de los orgánulos. Debe entenderse que una planta o una célula vegetal transformada con los ácidos nucleicos, construcciones y/o vectores de la presente invención puede transformarse de manera transitoria y estable. Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a los 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 los polímeros de aminoácidos naturales.

[0057] Entre los miles de aminoácidos no proteicos conocidos, alrededor de 300 se encuentran en las plantas. Muchos de ellos son estructuralmente similares a los considerados como sustratos de aminoácidos regulares de aminoacil ARNt sintetasas (aaRS). Se pueden generar modificaciones de la cadena lateral de aminoácidos *in vivo* por especies reactivas de oxígeno (ROS) tales como radicales hidroxilo y aniones superóxido. Muy a menudo, las modificaciones están asociadas con la producción de uno o más grupos hidroxilo en posiciones para, meta u orto en el anillo aromático de fenilalanina y tirosina. Sin embargo, las vías de incorporación de aminoácidos dañados por ROS en las cadenas de polipéptidos no estaban claras, teniendo en cuenta la actividad de edición de las aaRS.

[0058] La presente invención muestra ahora que (i) las sintetasas de fenilalanil-ARNt mitocondrial y citoplasmático (definidas como HsmtPheRS y HsctPheRS, respectivamente) catalizan la unión directa de m-Tyr a ARNt<sup>Phe</sup>, abriendo así el camino para el suministro del ARNt acilado incorrectamente al ribosoma y la incorporación de m-Tyr en proteínas eucariotas; y (ii) la presencia de PheRS bacteriana en mitocondrias y/o cloroplastos induce la resistencia de la planta a m-Tyr. Estos hallazgos forman la base para desarrollar sistemas de herbicidas y aminoácidos no proteínicos y plantas resistentes a estos herbicidas.

[0059] De acuerdo con 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 aminoacil ARNt sintetasa (aaRS) o un fragmento de la misma, donde la aaRS o un fragmento de la misma comprende un módulo de edición que hidroliza el ARNt acilado incorrectamente con un análogo de aminoácido no proteico, en donde la planta es resistente al análogo de aminoácido no proteico y sus sales.

[0060] Las enseñanzas de la presente invención se ejemplifican por la producción de plantas transgénicas que expresan una fenilalanil-ARN sintetasa (PheRS) bacteriana, que son resistentes al efecto fitotóxico de los compuestos de m-Tyr y sus sales. Sin embargo, debe entenderse explícitamente que el alcance de la presente invención abarca cualquier combinación de un aminoácido no proteico fitotóxico y aminoacil ARNt sintetasa (aaRS) o un fragmento de la misma, siempre que la aaRS o su fragmento comprenda un módulo de edición capaz de hidrolizar el aminoácido no proteico del ARNt.

[0061] La aaRS puede ser una enzima nativa que tiene una actividad de edición eficiente como se ejemplifica aquí para la PheRS de *E. coli*. Alternativamente, las aaRS pueden modificarse genéticamente para inducir o aumentar la actividad de edición. La plasticidad significativa de los sitios sintéticos y de edición de las aaRS, particularmente las PheRS y los cambios menores en su organización estereoquímica, se pueden usar para diseñar la arquitectura de estos sitios para cambiar la afinidad de unión hacia los ligandos pequeños o para controlar la actividad hidrolítica hacia ARNt acilado incorrectamente (Kotik-Kogan, O., Moor et al., 2005. Structure 13, 1799-1807; Fishman, R. y col. 2001. Acta crystallographica 57, 1534-1544) La aaRS exógena, que se encuentra preferiblemente dentro de los orgánulos celulares mitocondrias y cloroplastos, puede reparar los errores incorporados en las proteínas por las enzimas aaRS de tipo salvaje utilizando la actividad de edición adicional, y/o quelar el análogo de aminoácidos dañino y evitar su incorporación en las proteínas.

[0062] La clonación de un polinucleótido que codifica la aaRS se puede realizar por cualquier método conocido por un experto en la materia. Se pueden usar varias construcciones de ADN para expresar la aaRS en una planta deseada.

[0063] En la presente invención, se puede usar una construcción de ADN o un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica la aaRS, que puede comprender además elementos reguladores, que incluyen, pero no se limitan a, un promotor, un potenciador y una señal de terminación.

[0064] Entre los promotores más utilizados se encuentran el promotor de nopalina sintasa (NOS) (Ebert et al., 1987 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84: 5745-5749), el promotor de octapina sintasa (OCS), promotores de caulimovirus como el promotor 19S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) (Lawton et al., 1987 Plant Mol Biol. 9: 315-324), el promotor CaMV 35S (Odell et al., 1985 Nature 313: 810-812), y el promotor 35S del virus del mosaico de la escrofularia, el promotor inducible por luz de la subunidad pequeña de rubisco, el promotor Adh (Walker et al., 1987 Proc Natl Aca. Sci U.S.A. 84: 6624-66280), el promotor de sacarosa sintasa (Yang et al., 1990 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87: 4144-4148), el promotor del complejo gen R (Chandler et al., 1989. Plant Cell 1: 1175-1183), el promotor del gen de la proteína de unión a clorofila a/b, etc. Otros promotores utilizados comúnmente son los promotores de los genes ADPGPP del tubérculo de patata, el promotor de sacarosa sintasa, el promotor de la

almidón sintasa unida a gránulo, el promotor del gen de glutelina, el promotor ceroso de maíz, promotor del gen Brittle y promotor de Shrunken 2, el promotor del gen de la quitinasa ácida y los promotores del gen de la zeína (15 kD, 16 kD, 19 kD, 22 kD y 27 kD; Pedersen et al 1982 Cell 29: 1015-1026) Una gran cantidad de promotores se describe en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional N.º WO 00/18963. La construcción utilizada en la presente invención puede comprender el promotor constitutivo CaMV 35S.

[0065] Las "secuencias no codificantes 3'" se refieren a secuencias de ADN ubicadas hacia el extremo 3' de una secuencia codificante e incluyen secuencias de reconocimiento de poliadenilación y otras secuencias que codifican señales reguladoras capaces de afectar el procesamiento de ARNm o la expresión génica. La señal de poliadenilación generalmente se caracteriza por afectar a la adición de tractos de ácido poliadenílico al extremo 3' del precursor de ARNm. El uso de diferentes secuencias 3' no codificantes se ejemplifica mediante Ingelbrecht I L et al (1989. Plant Cell 1: 671-680).

[0066] En formas de realización particulares de la presente invención, cuatro clones de subunidades de PheRS de *E. coli*: *EcPheRS $\alpha$* , *mtp-EcPheRS $\alpha$* , *EcPheRS $\beta$*  y *mtp-EcPheRS $\beta$*  se prepararon bajo la regulación del promotor constitutivo 35S y presentaron resistencia al herbicida no selectivo glufosinato de amonio (BASTA®) (*EcPheRS $\alpha$*  y *mtp-EcPheRS $\alpha$* ) o kanamicina (*EcPheRS $\beta$*  y *mtp-EcPheRS $\beta$* ). *mtp-EcPheRS $\alpha$*  y *mtp-EcPheRS $\beta$*  incluyeron además péptidos de direccionamiento dual (hacia mitocondrias y cloroplastos). Los clones se transformaron en plantas de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Columbia (Col-0)) mediante *Agrobacterium tumefaciens*.

[0067] Los expertos en la materia apreciarán que los diversos componentes de las secuencias de ácido nucleico y los vectores de transformación descritos en la presente invención están operativamente unidos, para dar como resultado la expresión de dicho ácido nucleico o fragmento de ácido nucleico. Los expertos en la técnica conocen bien las técnicas para unir operativamente los componentes de las construcciones y los vectores de la presente invención. Dichas técnicas incluyen el uso de enlazadores, tales como enlazadores sintéticos, por ejemplo incluyendo uno o más sitios de enzimas de restricción.

[0068] Según otro aspecto más, la presente invención proporciona un método para producir una planta transgénica resistente a un análogo de aminoácido no proteico fitotóxico o una sal del mismo, que comprende (a) transformar una célula vegetal con al menos un polinucleótido exógeno que codifica una aminoacil ARNt sintetasa (aaRS) o un fragmento de la misma que comprende un módulo de edición que hidroliza ARNt mal acilado con un aminoácido no proteico; y (b) regenerar la célula transformada para obtener una planta transgénica resistente al análogo de aminoácido no proteico fitotóxico o una sal del mismo.

[0069] Los métodos para transformar una célula vegetal con secuencias de ácidos nucleicos usados en la presente invención son conocidos en la técnica. Como se usa en el presente documento, el término "transformación" o "transformar" describe un proceso por el cual un ADN exógeno, tal como una construcción de ADN, entra y transforma una célula receptora en una célula transformada, genéticamente modificada o transgénica. La transformación puede ser estable, en donde la secuencia de ácido nucleico está integrada en el genoma de la planta y como tal representa un rasgo estable y heredado, o transitorio, en donde la secuencia de ácido nucleico es expresada por la célula transformada pero no está integrada en el genoma, y como tal representa un rasgo transitorio. La secuencia de ácido nucleico puede transformarse de manera estable en una célula vegetal.

[0070] Existen varios métodos para introducir genes exógenos en plantas monocotiledóneas y 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).

[0071] Los principales métodos para la integración estable del ADN exógeno en el ADN genómico de la planta incluyen dos enfoques principales:

Transferencia de genes 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 según la especie de la planta y el sistema de administración de *Agrobacterium*. Un enfoque ampliamente utilizado es el procedimiento de los discos de hojas, que se puede realizar con cualquier explante de tejido que proporcione una buena fuente para el inicio 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 administración de *Agrobacterium* en combinación con infiltración al vacío. El sistema de *Agrobacterium* es especialmente útil en la generación de plantas dicotiledóneas transgénicas.

[0072] Absorción directa de ADN: existen varios métodos de transferencia directa de ADN a las células vegetales. En la electroporación, los protoplastos se exponen brevemente a un campo eléctrico fuerte, abriendo mini poros para permitir la entrada de ADN. En la microinyección, el ADN se inyecta mecánicamente directamente en las células mediante micropipetas. En el bombardeo de micropartículas, el ADN se adsorbe en microproyectiles, como cristales de sulfato de magnesio o partículas de tungsteno, y los microproyectiles se aceleran físicamente en células o tejidos vegetales.

[0073] Según algunas formas de realización, la transformación de las construcciones de ADN usadas en la presente invención en una célula vegetal se realiza usando un sistema de *Agrobacterium*.

[0074] La planta transgénica se cultiva luego en condiciones adecuadas para la expresión de la construcción o construcciones de ADN recombinante. La expresión de la construcción o construcciones de ADN recombinante reduce la susceptibilidad de la planta a análogos de aminoácidos no proteicos, particularmente a m-tirosina.

[0075] La regeneración, desarrollo y cultivo de plantas a partir de transformantes de protoplastos de una sola planta o de diversos explantes transformados es ampliamente conocida 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 cultivo típicamente incluye los pasos de selección de células transformadas, cultivando esas células o tejidos individualizados a través de las etapas usuales de desarrollo embrionario a través de la etapa de plántulas enraizadas. Los embriones y semillas transgénicos se regeneran de manera similar. Los brotes enraizados transgénicos resultantes se plantan luego en un medio de cultivo de plantas apropiado, tal como tierra.

[0076] La selección de plantas transgénicas transformadas con una secuencia de ácido nucleico de la presente invención para proporcionar plantas transgénicas que comprenden la aaRS exógena se realiza empleando métodos estándar de genética molecular, conocidos por una persona con conocimientos ordinarios en la técnica. La secuencia de ácido nucleico puede comprender además una secuencia de ácido nucleico que codifica un producto que confiere resistencia a un antibiótico y, por lo tanto, las plantas transgénicas se seleccionan de acuerdo con su resistencia al antibiótico. El antibiótico que sirve como marcador seleccionable puede ser uno del grupo aminoglucósido que consiste en paromomicina y kanamicina. Según formas de realización adicionales, la secuencia de ácido nucleico puede comprender además una secuencia de ácido nucleico que codifica un producto que confiere resistencia a un herbicida, que incluye, pero no se limita a, el herbicida no selectivo glufosinato de amonio (BASTA®). Los métodos para detectar la presencia y/o expresión del polinucleótido exógeno dentro de las plantas transgénicas también son conocidos por un experto en la materia 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 cultivando las plantas transgénicas que comprenden el polinucleótido exógeno en un medio que comprende la concentración fitotóxica del aminoácido no proteico. Solo las plantas que expresan una aaRS activa o un fragmento de la misma que tiene el módulo de edición pueden crecer normalmente en estas condiciones.

[0077] También dentro del alcance de esta invención están las semillas o partes de plantas obtenidas de las plantas transgénicas que mantienen la resistencia a la concentración fitotóxica del aminoácido no proteico. Las partes de las plantas incluyen tejidos diferenciados e indiferenciados, que incluyen, entre otros, raíces, tallos, brotes, hojas, polen, semillas, tejido tumoral y diversas formas de células y cultivos, como células individuales, protoplastos, embriones y tejido calloso. El tejido vegetal puede estar en la planta o en órganos, tejidos o cultivos celulares.

[0078] Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar más completamente algunas formas de realización de la invención. Sin embargo, de ninguna manera deben interpretarse como limitantes del amplio alcance de la invención. Un experto en la materia puede idear fácilmente muchas variaciones y modificaciones de los principios descritos en este documento sin apartarse del alcance de la invención.

## EJEMPLOS

### Material y métodos

[0079] Se prepararon cuatro clones de subunidades de PheRS de *E. coli*: *EcPheRS $\alpha$* , *mtp-EcPheRS $\alpha$* , *EcPheRS $\beta$*  y *mtp-EcPheRS $\beta$*  bajo la regulación del promotor constitutivo 35S y que poseían resistencia a BASTA (*EcPheRS $\alpha$*  y *mtp-EcPheRS $\alpha$* ) o kanamicina (*EcPheRS $\beta$*  y *mtp-EcPheRS $\beta$* ). *mtp-EcPheRS $\alpha$*  y *mtp-EcPheRS $\beta$*  contenían péptidos de direccionamiento dual (hacia mitocondrias y cloroplastos). Los clones se transformaron en plantas de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Columbia (Col-0)) mediante *Agrobacterium tumefaciens*.

[0080] Para la transformación, las plantas se cultivaron en una sala de cultivo en condiciones controladas (temperatura 22 °C, 8 horas de luz) durante 30 días y luego se transformaron como se describe a continuación. Las semillas transformadas y de tipo salvaje se esterilizaron, se trataron en frío y germinaron en medio MS estéril con o sin antibiótico. Después de la germinación, las plantas se plantaron en macetas y se transfirieron a la sala de cultivo (22 °C 16 horas de luz).

### Transformación por infiltración con *Agrobacterium*

[0081] La cepa de *Agrobacterium tumefaciens* ABI que alberga los vectores binarios pART27 o pMLBart se utilizó para la transformación. Ambos vectores contienen el gen nptII como marcador seleccionable. Se cultivaron cultivos de *Agrobacterium* a pequeña escala 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 antibióticos apropiados para cultivos a gran

escala durante la noche. Las células fueron cosechadas por centrifugación a 5000 r.p.m. (aproximadamente 3000 g) durante 15 minutos, y resuspendidas en medio de infiltración a una DO600 de 0,8.

[0082] Las inoculaciones se realizaron sumergiendo partes aéreas de las plantas durante 30 segundos en 300 ml de una solución que contenía sacarosa al 5% (p/v), MgCl 10 mM<sub>2</sub>, células de *Agrobacterium* resuspendidas de un cultivo nocturno de 200 ml y 0,05% del tensioactivo (Silwet L-77). Después de la inoculación, las plantas se dejaron en un lugar con poca luz o a oscuras y se cubrieron con una tapa de plástico transparente en forma de cúpula para mantener la humedad; se retiró la tapa y las plantas se devolvieron a la cámara de cultivo 12 a 24 h después de la inoculación. Las plantas transformadas se mantuvieron en el invernadero y las semillas se cosecharon tras la maduración completa.

#### Selección de plantas

[0083] Las semillas germinaron en el suelo y las plantas transgénicas se seleccionaron rociando con herbicida BASTA® al 0,1% en el invernadero. La pulverización se realizó 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 con BASTA®. Mientras que tales plantas continuaron creciendo y permanecieron verdes, las plantas no transformadas permanecieron pequeñas, se volvieron blancas y murieron dos semanas después de la selección. Para la selección de plantas positivas que contenían resistencia a la kanamicina, las semillas se seleccionaron en medio MS suplementado con 50 mg/ml de kanamicina.

#### Cruces

[0084] Después de obtener las plantas homocigotas para cada subunidad ( $\alpha$ - o  $\beta$ -) de PheRS, estas se sometieron a cruces. Las plantas utilizadas como hembras se emascularon a mano. Las anteras de flores recién abiertas de plantas donantes se cosecharon y la polinización se realizó poniendo en contacto las anteras con la parte superior de los estigmas de las plantas emasculadas. Se etiquetaron las flores polinizadas y se eliminaron las flores abiertas o sin abrir restantes de la misma planta para evitar confusiones en la cosecha. La selección de plantas positivas que contenían ambas subunidades de PheRS se realizó como se describe en la sección "Selección de plantas" anterior.

#### La resistencia a m-Tyr

[0085] Para evaluar los efectos de m-Tyr sobre el crecimiento de *Arabidopsis* en la raíz, se añadieron 20  $\mu$ m de m-Tyr al medio MS. Se esterilizaron semillas de *Arabidopsis* agitándolas en lejía al 30%, Triton X-100 al 0,3% durante 10 minutos, seguido de tres enjuagues con agua destilada estéril. Placas de Petri con semillas en medio de agar se estratificaron en frío durante 72 h a 4 °C, y posteriormente se colocaron verticalmente en un invernadero a 23 °C, en un ciclo de luz/oscuridad de 16:8 h. Después de 7 días de cultivo, se analizó la longitud de la raíz de la planta.

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

[0086] Los genes bacterianos de PheRS descritos en la sección "Material y Métodos" anterior se expresaron bajo el control del promotor constitutivo 35S CaMV. Se añadió un péptido de tránsito al extremo N terminal de subunidades *EcPheRS*- $\alpha$  y *EcPheRS*- $\beta$  de la enzima bacteriana para dirigirlas hacia las mitocondrias y los cloroplastos de *Arabidopsis thaliana*. El segundo par de construcciones que incluía PheRS- $\alpha$  y PheRS- $\beta$  carecía de los péptidos de tránsito. Por lo tanto, cuatro construcciones diferentes se transformaron en *Arabidopsis thaliana*, y se generaron plantas autopolinizadas homocigóticas como se ha descrito anteriormente. Cada línea se cruzó aún más para crear plantas que contenían *EcPheRS* heterodiméricas con actividad de edición localizada en citoplasma (cyt-PheRS) y *EcPheRS* heterodiméricas localizadas en mitocondrias y cloroplastos de plantas (mtp-PheRS). Se obtuvieron varias líneas transgénicas independientes y se analizó su resistencia a m-Tyr. La resistencia a m-Tyr se examinó mediante el cultivo de cyt-PheRS y mtp-PheRS de líneas de *Arabidopsis thaliana* de tipo salvaje en placas de Petri que contenían 20  $\mu$ M de m-Tyr en los medios de cultivo. Las mismas líneas cultivadas en medios no tratados sirvieron como control. La resistencia a m-Tyr ya se observó en la generación F2. Se descubrió que la resistencia era mucho más profunda para la línea que contenía mtp-PheRS (Fig. 2). Se puede ver que, si bien las raíces de las plantas de tipo silvestre no se desarrollaron a 20  $\mu$ M m-Tyr, las raíces de las líneas que contenían mtp-PheRS se desarrollaron hasta la mitad de la longitud de las plantas no tratadas. Las raíces de la línea de expresión de cyt-PheRS están menos desarrolladas en comparación con la línea que contenía mtp-PheRS. Cabe señalar que el crecimiento de las plantas transgénicas de *Arabidopsis* cultivadas en condiciones normales no se vio considerablemente afectado por la presencia de PheRS bacterianas en el citoplasma u orgánulos (Fig. 2).

[0087] La descripción anterior de las formas de realización específicas revelará tan completamente la naturaleza general de la invención que otros pueden, aplicando el conocimiento actual, modificar y/o adaptar fácilmente para diversas aplicaciones tales formas de realización específicas sin experimentación indebida y sin apartarse del concepto genérico, y, por lo tanto, tales adaptaciones y modificaciones deben y están destinadas a ser

comprendidas dentro del significado y rango de equivalentes de las formas de realización descritas. Debe entenderse que la fraseología o terminología empleada en este documento tiene el propósito de descripción y no de limitación. Los medios, materiales y pasos para llevar a cabo diversas funciones descritas pueden adoptar una variedad de formas alternativas sin apartarse de la invención.

5

LISTADO DE SECUENCIAS

[0088]

<110> YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD.

10 <120> Plantas transgénicas resistentes a aminoácidos no proteicos

<130> YEDA/0120 PCT

<150> 61/554993

<151> 2011-11-03

<160> 8

15 <170> Versión de PatentIn 3.5

<210> 1

<211> 984

<212> ADN

<213> *Escherichia coli*

20 <220>

<221> misc\_feature

<223> Subunidad alfa de PheRS de *E. coli*

<400> 1

ES 2 758 873 T3

atgtcacatc tgcgagaact ggttgccagt gcgaaggcgg ccattagcca ggcgtcagat 60  
 gttgccgcgt tagacaatgt gcgcgtcgaa tatttgggta aaaaaggga cttaacctt 120  
 cagatgacga ccctgcgtga gctgccgcca gaagagcgtc cggcagccgg tgcggttatc 180  
 aacgaagcga aagagcaggt tcagcaggcg ctgaatgcgc gtaaagcggg actggaaagc 240  
 gctgcactga atgcgcgtct ggcggcggaa acgattgatg tctctctgcc aggtcgtcgc 300  
 attgaaaacg gcggtctgca tccggttacc cgtaccatcg accgtatcga aagtttcttc 360  
 ggtgagcttg gctttaccgt ggcaaccggg ccggaatcg aagacgatta tcataacttc 420  
 gatgctctga acattcctgg tcaccaccgg gcgcgcgctg accacgacac tttctggttt 480  
 gacgctaccg gcctgctcgy taccagacc tctggcgtac agatccgcac catgaaagcc 540  
 cagcagccac cgattcgtat catcgcgcct ggccgtgttt atcgtaacga ctacgaccag 600  
 actcacacgc cgatgttcca tcagatggaa ggtctgattg ttgataccaa catcagcttt 660  
 accaacctga aaggcacgct gcacgacttc ctgcgtaact tctttgagga agatttgcag 720  
 attcgttcc gtccttccta cttcccgttt accgaacctt ctgcagaagt ggatgtcatg 780  
 ggtaaaaacg gtaaattggct ggaagtactg ggctgcggga tggatcatcc gaacgtgctg 840  
 cgtaacgctg gcatcgacc ggaagtttac tctggtttcg ccttcgggat ggggatggag 900  
 cgtctgacta tgttgcgta cggcgtcacc gacctgcgtt cattcttcga aaacgatctg 960  
 cgtttcctca aacagtttaa ataa 984

<210> 2  
 <211> 2388  
 <212> ADN  
 <213> *Escherichia coli*

5

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> *E. coli* PheRS subunit beta

ES 2 758 873 T3

<400> 2

atgaaattca	gtgaactgtg	gttacgcgaa	tgggtgaacc	cggcgattga	tagcgatgcg	60
ctggcgaatc	aaatcactat	ggcgggcctg	gaagttgacg	gtgtagaacc	ggttgccggt	120
agcttccacg	gcgtggtcgt	tggagaagtg	gttgagtggt	cgagcatcc	gaacgctgac	180
aaactgcgtg	tgacaaaagt	gaatgtcggc	ggcgatcgcc	tgctggacat	cgtctgcggt	240
gcgccaaaact	gccgtcaggg	cctgcgtgtg	gcggtagcga	ccattggtgc	tgttctgccg	300
ggtgatttca	aaattaaagc	ggcgaaactg	cgcggcgaac	cgtctgaagg	gatgctgtgc	360
tccttttctg	agctgggaat	ttctgacgac	cataacggca	ttatcgaact	gcctgcagat	420
gcgcogattg	gactgacat	ccgcgaatac	ctgaaactcg	atgacaacac	catcgaaatc	480
agcgtaacgc	caaaccgtgc	cgactgttta	ggtatcattg	gtgttgcgcg	tgacgttgcc	540
gtgctgaatc	agctgccgct	ggttgaaccg	gaaatcgttc	cggttgggtgc	gaccatcgac	600
gacacgctgc	cgattacagt	cgaagcgccg	gaagcctgcc	cgcgttatct	tggccgtgtg	660
gtaaaaggca	ttaacgtaa	agcgccaact	ccgctgtgga	tgaagaaaa	actgcgtcgt	720
tgcgggatcc	gttctatcga	tgcagttggt	gacgtcacca	actatgtgct	gctcgaattg	780
ggccagccga	tgcacgcttt	cgataaagat	cgcattgaag	gcggcattgt	ggtgcggatg	840
gcgaaagagg	gcgaaacgct	ggtgctgctc	gacggtagctg	aagcgaagct	gaatgctgac	900
actctgggtca	tcgccgacca	caacaaggcg	ctggcgatgg	gcggcatctt	cggtggcgaa	960
cactctggcg	tgaatgacga	aacacaaaac	gtgctgctgg	aatgcgcttt	ctttagccccg	1020
ctgtctatca	ccggtcgtgc	tcgtcgtcat	ggcctgcata	ctgatgcgtc	tcaccgttat	1080
gagcgtggcg	ttgatccggc	actgcagtac	aaagcgatgg	aacgtgcgac	ccgtctgctg	1140
attgacatct	gcggtggtga	ggctgggtccg	gtaattgata	tcaccaacga	agcaacgctg	1200
ccgaagcgtg	caaccatcac	tttacgtcgt	agcaactgg	atcgctgat	cgccatcat	1260
attgcggatg	agcaggtaac	tgacattctg	cgctcgtctcg	gctgcgaagt	gaccgaaggc	1320
aaagacgagt	ggcaggcagt	tgcgccgagc	tggcgtttcg	acatggagat	tgaagaagat	1380
ctggtcgaag	aagtcgcgcg	tgtttacggc	tacaacaaca	tcccggatga	gccggtacag	1440
gcaagcctga	ttatgggtac	tcaccgtgaa	gctgacctgt	cgctcaagcg	cgtgaaaacg	1500
ctgctcaacg	ataaaggcta	tcaggaagtg	atcacctata	gcttcggtga	tccgaaagtg	1560
cagcagatga	tccatccagc	cgttgaagcc	ttactgctgc	caagcccgat	ctctgttgaa	1620

ES 2 758 873 T3

atgtcagcaa tgcgtctttc tctgtggacc ggcctgctgg caaccgtggt gtacaaccag 1680  
aaccgtcagc agaaccgtgt gcgcattttc gaaagcggtc tgcgtttcgt accagatact 1740  
caggcaccgt tgggcattcg tcaggatctg atgttagccg gtgtgatttg cggtaaccgt 1800  
tacgaagagc actggaacct ggcaaaagag accgttgatt tctatgattt gaaaggcgat 1860  
cttgaatccg ttctcgacct gaccggtaaa ctgaatgagg ttgagttccg tgcagaagcg 1920  
aatccggcac tgcacccggg gcaatccgca gcgatttata tgaaaggatga acgtattggt 1980  
tttgttgggg ttgttcatcc tgaactggaa cgtaaactgg atcttaacgg tcgcactctg 2040  
gtgttcgaac tggagtggaa caagctcgca gaccgcgtgg tgcctcaggc gcgcgagatt 2100  
tctcgcttcc cggcgaaccg tcgtgacatc gcggtggtgg tcgcagaaaa cgttcccgcgca 2160  
gcggatattt tatccgaatg taagaaagtt ggcgtaaata aggtagttgg cgtaaactta 2220  
tttgacgtgt accgcggtaa ggggtgtgcg gaggggtata agagcctcgc cataagcctg 2280  
atcctgcaag ataccagccg tacaactcgaa gaagaggaga ttgccgctac cgtcgcctaaa 2340  
tgtgtagagg cattaanaaga gcgattccag gcatcattga gggattga 2388

<210> 3  
<211> 327  
5 <212> PRT  
<213> *Escherichia coli*

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> Subunidad alfa de PheRS de *E. coli*

10 <400> 3

ES 2 758 873 T3

Met Ser His Leu Ala Glu Leu Val Ala Ser Ala Lys Ala Ala Ile Ser  
 1 5 10 15

Gln Ala Ser Asp Val Ala Ala Leu Asp Asn Val Arg Val Glu Tyr Leu  
 20 25 30

Gly Lys Lys Gly His Leu Thr Leu Gln Met Thr Thr Leu Arg Glu Leu  
 35 40 45

Pro Pro Glu Glu Arg Pro Ala Ala Gly Ala Val Ile Asn Glu Ala Lys  
 50 55 60

Glu Gln Val Gln Gln Ala Leu Asn Ala Arg Lys Ala Glu Leu Glu Ser  
 65 70 75 80

Ala Ala Leu Asn Ala Arg Leu Ala Ala Glu Thr Ile Asp Val Ser Leu  
 85 90 95

ES 2 758 873 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Phe Leu Lys Gln Phe Lys  
325

<210> 4  
<211> 795  
<212> PRT  
<213> *Escherichia coli*

5 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> Subunidad beta de PheRS de *E. coli*

<400> 4

ES 2 758 873 T3

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

Asp Ser Asp Ala Leu Ala Asn Gln Ile Thr Met Ala Gly Leu Glu Val  
20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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 2 758 873 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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 2 758 873 T3

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

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

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

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

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

<210> 5

<211> 350

<212> PRT

5 <213> Thermus thermophilus

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> Subunidad alfa de PheRS de *T. thermophilus*

<400> 5

ES 2 758 873 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 758 873 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 6  
<211> 785  
<212> PRT  
<213> Thermus thermophilus

5 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> Subunidad beta de PheRS de T. thermophilus

<400> 6

ES 2 758 873 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



ES 2 758 873 T3

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

Tyr Ser Phe Met Asp Pro Glu Asp Ala Arg Arg Phe Arg Leu Asp Pro  
 515 520 525

Pro Arg Leu Leu Leu Leu Asn Pro Leu Ala Pro Glu Lys Ala Ala Leu  
 530 535 540

Arg Thr His Leu Phe Pro Gly Leu Val Arg Val Leu Lys Glu Asn Leu  
 545 550 555 560

Asp Leu Asp Arg Pro Glu Arg Ala Leu Leu Phe Glu Val Gly Arg Val  
 565 570 575

Phe Arg Glu Arg Glu Glu Thr His Leu Ala Gly Leu Leu Phe Gly Glu  
 580 585 590

Gly Val Gly Leu Pro Trp Ala Lys Glu Arg Leu Ser Gly Tyr Phe Leu  
 595 600 605

Leu Lys Gly Tyr Leu Glu Ala Leu Phe Ala Arg Leu Gly Leu Ala Phe  
 610 615 620

Arg Val Glu Ala Gln Ala Phe Pro Phe Leu His Pro Gly Val Ser Gly  
 625 630 635 640

Arg Val Leu Val Glu Gly Glu Glu Val Gly Phe Leu Gly Ala Leu His  
 645 650 655

Pro Glu Ile Ala Gln Glu Leu Glu Leu Pro Pro Val His Leu Phe Glu  
 660 665 670

Leu Arg Leu Pro Leu Pro Asp Lys Pro Leu Ala Phe Gln Asp Pro Ser  
 675 680 685

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 2 758 873 T3

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

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

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

Pro  
 785

<210> 7  
 <211> 123  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Polinucleótido sintético

<400> 7  
 ggaatttcta caatggtggg ctcagctctc aggagaggtg cccatgcata tgtctacctg 60  
 gtgagtaagg ccagtcacat ctccagagge catcagcacc aggcctgggg atcgaggect 120  
 cct 123

10 <210> 8  
 <211> 37  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Péptido sintético

<400> 8  
 Met Val Gly Ser Ala Leu Arg Arg Gly Ala His Ala Tyr Val Tyr Leu  
 1 5 10 15

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

## REIVINDICACIONES

1. Planta transgénica que comprende al menos una célula que comprende al menos un polinucleótido exógeno que codifica una aminoacil ARNt sintasa (aaRS) o un fragmento de la misma, donde la aaRS o un fragmento de la misma comprende un módulo de edición que hidroliza el ARNt acilado incorrectamente con un análogo de aminoácido no proteico, donde la planta es resistente a dicho análogo de aminoácido no proteico y sus sales.

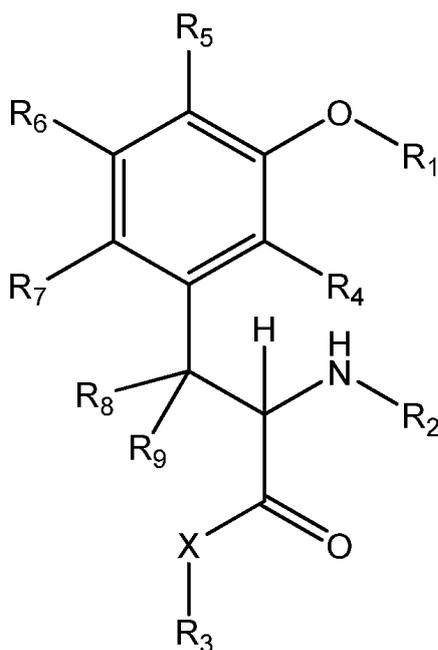
2. Planta transgénica según la reivindicación 1, en donde el análogo de aminoácido no proteico es el compuesto meta-tirosina (m-Tyr).

3. Planta transgénica según la reivindicación 1 o 2, en donde la aaRS es fenilalanil-ARNt sintetasa (PheRS).

4. Planta transgénica según la reivindicación 1, en donde dicha planta crece en un medio que contiene el aminoácido no proteico o una sal del mismo en una concentración que inhibe significativamente el crecimiento de una planta no transgénica correspondiente, preferiblemente en donde la inhibición del crecimiento es mostrada por al menos uno de los siguientes parámetros: longitud de raíz reducida, radical de raíz reducido, masa de la raíz reducida, altura de la planta reducida, cambio aberrante en la morfología o el color del tejido de una planta, masa de los brotes de una planta reducida, número de brotes de la planta reducido y cualquier combinación de los mismos.

5. Planta transgénica según la reivindicación 2, en donde el compuesto m-Tyr tiene una fórmula de Fórmula I o una de sus sales:

Fórmula I:



donde:

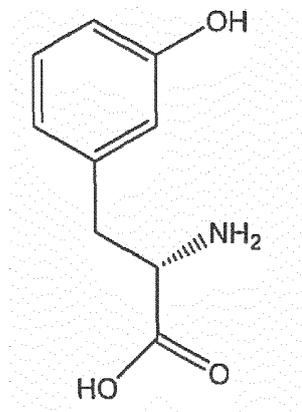
R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, sulfonato, sulfonamida, fosfonato, alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, alcocarbonilo, sacárido, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo, en donde cada uno de los fosfonato, alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, alcocarbonilo, sacárido, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo están sustituidos o no sustituidos;

R<sub>3</sub> se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, alcocarbonilo, sacárido, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo, en donde cada uno de los alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, alcocarbonilo, sacárido, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo están sustituidos o no sustituidos; X se selecciona del grupo que consiste en O y NY, en donde Y se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, alcocarbonilo, sacárido, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo, en donde cada uno de los alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, alcocarbonilo, sacárido, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo están sustituidos o no sustituidos;

R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, hidroxilo, halógeno, amino y nitro; y

R<sub>8</sub> y R<sub>9</sub> se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, hidroxilo, halógeno, amino, metilo y metilo halogenado, preferiblemente en donde el compuesto m-Tyr tiene una fórmula de fórmula II:

5



6. Planta transgénica según la reivindicación 3, en donde la PheRS es una PheRS bacteriana heterotetramérica compuesta por dos cadenas PheRS- $\alpha$  y dos PheRS- $\beta$ .

10

7. Planta transgénica según la reivindicación 6, en donde la PheRS bacteriana se selecciona del grupo que consiste en PheRS de *Escherichia coli* (*E. coli*) y PheRS de *Thermus thermophilus* preferiblemente

15

donde la PheRS- $\alpha$  de *E. coli* está codificada por un polinucleótido que tiene la secuencia de ácido nucleico establecida en la SEQ ID NO: 1 y la PheRS- $\beta$  de *E. coli* está codificada por un polinucleótido que tiene la secuencia de ácido nucleico establecida en la SEQ ID NO: 2; o donde la PheRS- $\alpha$  de *E. coli* comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 3 y la PheRS- $\beta$  de *E. coli* comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 4; o donde la PheRS- $\alpha$  de *T. thermophilus* comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 5 y la PheRS- $\beta$  de *T. thermophilus* comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 6.

20

8. Planta transgénica según la reivindicación 1,

25

en donde el polinucleótido que codifica la aaRS o fragmento de la misma comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido de direccionamiento seleccionado del grupo que consiste en un péptido de direccionamiento hacia las mitocondrias y un péptido de direccionamiento hacia los cloroplastos;

30

o dicha planta comprende una combinación del polinucleótido que codifica la aaRS o un fragmento de la misma que comprende además la secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido de direccionamiento hacia las mitocondrias y el polinucleótido que codifica la aaRS o un fragmento de la misma que comprende además la secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido de direccionamiento hacia los cloroplastos.

35

9. Planta transgénica según la reivindicación 8, en la que cada uno del péptido de direccionamiento hacia las mitocondrias y el péptido de direccionamiento hacia los cloroplastos está codificado por un polinucleótido que tiene la secuencia de ácido nucleico establecida en la SEQ ID NO: 7, preferiblemente en donde cada uno del péptido de direccionamiento hacia las mitocondrias y el péptido de direccionamiento hacia los cloroplastos comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 8.

40

10. Semilla de planta producida por la planta transgénica de la reivindicación 1, en donde la semilla comprende dicho al menos un polinucleótido exógeno que codifica dicha aminoacil ARNt sintasa (aaRS) o dicho fragmento de la misma.

45

11. Cultivo de tejidos que comprende al menos una célula transgénica de la planta de la reivindicación 1 o un protoplasto derivado de la misma.

50

12. Método para producir una planta transgénica resistente al análogo de aminoácido no proteico fitotóxico o una sal del mismo, que comprende (a) transformar una célula vegetal con al menos un polinucleótido exógeno que codifica una aminoacil ARNt sintetasa (aaRS) o un fragmento de la misma que comprende un módulo de edición, en el que el módulo de edición hidroliza ARNt aminoacilado no proteico acilado incorrectamente con dicho análogo

de aminoácido fitotóxico no proteico; y (b) regenerar la célula transformada para obtener una planta transgénica resistente a dicho análogo de aminoácido no proteico fitotóxico o una sal del mismo.

5 13. Método según la reivindicación 12, en el que el análogo de aminoácido no proteico es el compuesto metatirosina (m-Tyr).

10 14. Método según la reivindicación 12 o 13, en donde la aaRS es fenilalanil-ARNt sintetasa (PheRS), preferiblemente en donde la PheRS es una PheRS bacteriana heterotetramérica compuesta por dos cadenas PheRS- $\alpha$  y dos PheRS- $\beta$ .

15 15. Planta transgénica producida por el método de la reivindicación 12, en donde la planta es resistente a dicho aminoácido fitotóxico no proteico; preferiblemente en donde dicha planta crece en un medio que contiene dicho aminoácido no proteico o una sal del mismo en una concentración que inhibe significativamente el crecimiento de una planta no transgénica correspondiente.

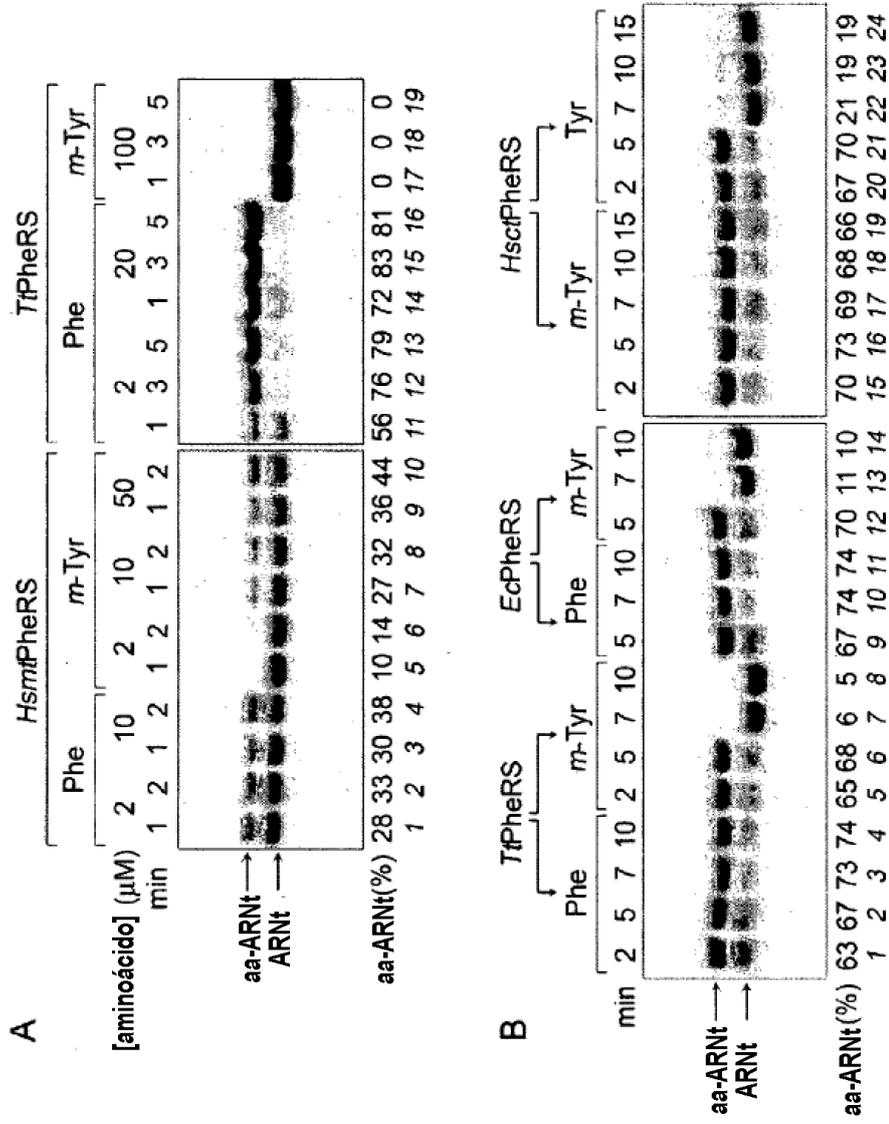


FIGURA 1

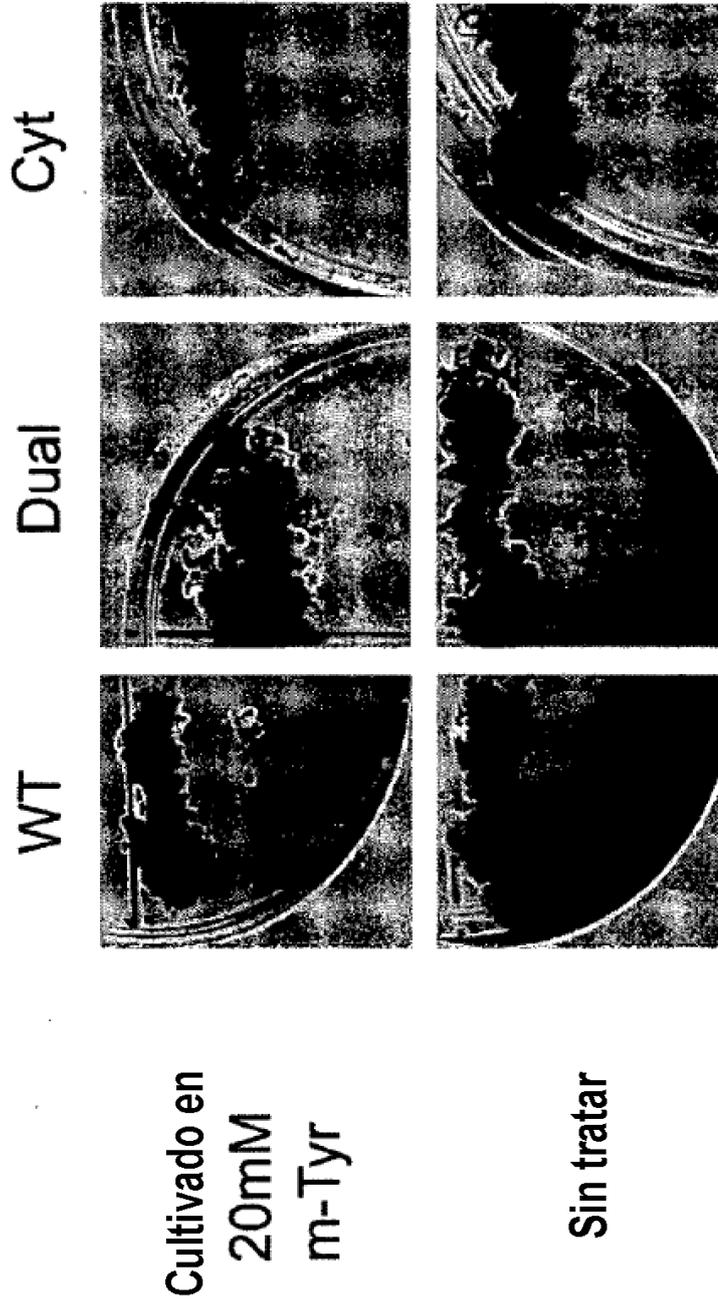


FIGURA 2