



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 274 820**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/82** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00991182 .7**

86 Fecha de presentación : **13.12.2000**

87 Número de publicación de la solicitud: **1240342**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **18.09.2002**

54 Título: **Obtención de plantas transgénicas de la especie Tagetes.**

30 Prioridad: **21.12.1999 DE 199 62 133**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.06.2007**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.06.2007**

73 Titular/es: **SunGene GmbH**  
**Corrensstrasse 3**  
**06466 Gatersleben, DE**

72 Inventor/es: **Kunze, Irene;**  
**Herbers, Karin y**  
**Heim, Ute**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 274 820 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

Obtención de plantas transgénicas de la especie *Tagetes*.

5 La invención se refiere a un procedimiento para la obtención de plantas fértiles transformadas de la especie *Tagetes*, caracterizado porque están contenidos los siguientes pasos: (a) cultivo de la planta de partida a transformar, así como obtención del plantón apropiado, (b) transferencia de secuencias de DNA en células de la planta (c) selección de células de la planta transformadas y (d) regeneración de plantas transgénicas fértiles, empleándose para la regeneración en la fase 1 una citoquinina, o bien un conjugado de citoquinina, y una auxina, o bien conjugado de auxina, y en la fase 2 una auxina, o bien conjugado de auxina y ácido giberélico GA3. Además, el procedimiento está caracterizado porque la transferencia de secuencias de DNA en la planta a transformar, o bien sus plantones, se puede determinar, a modo de ejemplo, mediante *Agrobacterium tumefaciens*. Por lo demás, el procedimiento está caracterizado porque las hojas se pueden utilizar como plantones, porque se efectúa un co-cultivo de 2 a 8 días con *Agrobacterium*, y porque durante el co-cultivo se emplea un medio que contiene reguladores de crecimiento. El procedimiento está caracterizado porque, para la selección, se puede emplear, a modo de ejemplo, fosfotricina, y porque para la regeneración para dar plantas transgénicas intactas se emplean dos combinaciones diferentes de reguladores de crecimiento. El procedimiento es apropiado para transformar el tipo *Tagetes erecta*, o bien *Tagetes patula*. La invención se refiere también a las propias plantas de *Tagetes* transgénicas fértiles, que se han obtenido mediante el procedimiento descrito, así como a sus semillas transgénicas.

20 La especie de plantas *Tagetes* que pertenece a la familia de Asteraceae posee eventualmente propiedades interesantes, lo que explica su utilización tanto como planta de cultivo, como también a modo de planta ornamental. Muchos tipos de esta especie producen compuestos bioactivos con acción nematocida, fungicida e insecticida, acumulan flavonoides y carotenoides con actividades antioxidantes y colorantes, son resistentes a sales, y sirven para fines decorativos debido a sus múltiples colores y formas de flores.

30 La acción nematocida de las raíces de *Tagetes* se basa en la síntesis de derivados de tiofeno. Los derivados de tiofeno son compuestos heterocíclicos que contienen azufre, que se acumulan sobre todo en raíces e hipocotilos. Están caracterizados por un anillo de 5 eslabones que contiene un átomo de S. En la formación de anillo participa un grupo sulfhidrilo procedente del aminoácido cisteína. Los representantes importantes de tiofenos, que se pueden formar también en *Tagetes* son, por ejemplo: BBT (5-(but-3-en-1-inil)-2,2'-bi-tienilo), BBTOAc(5-(4-acetoxi-12-butinil)-2,2'-bitienilo), BBTOH (5-(4-hidroxi-1-butinil)-2,2'-bitienilo) y  $\alpha$ -T (2,2':5',2''-tertienilo).

35 Los pétalos de *Tagetes* contienen un 9-22% de flavonoides, y aproximadamente un 27% de carotenoides, que están constituidos en un 0,4% por  $\beta$ -caroteno, en un 1,5% por éster de criptoxantina, y en un 86,1% por ésteres de xantofila (Benk *et al.*, Riechst, Aromen y Koerpen, 26 (1976), 216-221).

40 Según una estimación del año 1975, existen más de 2000 flavonoides diferentes. Algunos representantes importantes son, por ejemplo, las antocianinas con 250, las chalconas con 60, las auronas con 20, y las flavonas con 350 estructuras conocidas, que poseen propiedades colorantes. Los flavonoles con 350, y los isoflavonoides con 15 representantes, conceden a las plantas propiedades, como protección a la picadura, o tienen un acción tóxica sobre hongos.

45 Los carotenoides pertenecen al gran grupo de terpenoides. La mayor parte de éstos son tetraterpenos. Los hidrocarburos carotenoides se llaman también carotenos, y sus derivados oxidados son las xantofilas. Los carotenoides son componentes esenciales en membranas activas en fotosíntesis de todas las plantas, algas y cianobacterias. Están contenidas en sistemas de pigmentos (caída de luz) de cloroplastos, y actúan concomitantemente en el proceso de absorción de luz primaria y canalización de fotones de fotosíntesis. Además adoptan la función de fotorreceptores en una serie de procesos inducidos por la luz adicionales en la planta. El color amarillo de muchas flores se basa en cromoplastos que contienen carotenoides, en la mayor parte de los casos exentos de clorofila. Los carotenoides vegetales sirven también como precursores para la biosíntesis de reguladores de crecimiento vegetales ácidos abscísico, así como de vitamina A, que es significativa para la alimentación de hombres y animales. Adquiere interés creciente como anticancerígeno potencial, y se emplea como colorante en cosmética e industria de productos alimenticios. Los carotenoides procedentes de pétalos de *Tagetes* desmenuzados encuentran ya empleo como aditivo a piensos para aves para la intensificación de color de la yema de huevo de gallina.

55 Actualmente existe un gran interés económico en aumentar, o bien mejorar el contenido en carotenoides y la composición de carotenoides en plantas.

60 La pluralidad genética limitada en tipos de *Tagetes* conocidos limita fuertemente las posibilidades de mejora de estas especies con métodos de cultivo biológicos clásicos.

65 Por medio de procedimientos de técnica génica es posible transferir genes ajenos al genoma vegetal. Este proceso se denomina transformación, y las plantas resultantes se denominan transgénicas. La condición básica para la generación de plantas transgénicas es la disponibilidad de un sistema de transformación apropiado, la presencia de un marcador seleccionable, la identificación de células de plantas transformadas con éxito, y la regeneración de células transformadas para dar plantas fértiles completas.

## ES 2 274 820 T3

Para la transformación se dispone de varios procedimientos en la actualidad. El método empleado con mayor frecuencia para la transformación de plantas dicotiledóneas es la transferencia génica mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. En este caso se aprovecha la capacidad natural de la bacteria del suelo para integrar material genético en el genoma vegetal. Otros procedimientos apropiados son, a modo de ejemplo, la transformación de protoplastos mediante absorción de DNA inducida por polietilenglicol, la electroporación, la sonicación o microinyección, así como la transformación de células o tejidos intactos por micro- o macroinyección en tejidos o embriones, electroporación de tejidos, incubación de embriones secos en disolución que contiene DNA, la infiltración en vacío de semillas, y la transferencia génica biolítica.

La aplicación de *Agrobacterium tumefaciens* para la transformación de plantas bajo empleo de plántones de cultivos de tejidos se describió por Horsch *et al.* (Science 228 (1985), 1229-1231), Fraley *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80(1983) 4803-4807) y Bevens *et al.* (Nature 304 (1983), 184-187). Muchas cepas de *Agrobacterium tumefaciens* son aptas para transferir material genético también a especies de Tagetes, como por ejemplo las cepas EHA 101 [pEHA101], EHA 105 [pEHA 105], LBA4404[pAL4404], C58C1[pMP90] y C58C1[pGV2260]. La cepa EHA101 [pEHA101] fue descrita por Hood *et al.* (J. Bacteriol 168 (1986), 1291-1301), la cepa EHA105[pEHA105], fue descrita por Hood *et al.* (Transgenic Research 2 (1993), 208-218), la cepa LBA4404[pAL4404] descrita por Hoekema *et al.* (Nature 303 (1983), 179-181), la cepa C58C1[pMP90] fue descrita por Koncz and Schell (Mol. Gen. Genet. 204 (1986), 383-396), y la cepa C58C1[pGV2260] fue descrita por Deblaere *et al.* (Nucl. Acids Res. 13 (1985), 4777-4788).

La cepa de agrobacterias empleadas para la transformación contiene, adicionalmente a su plásmido Ti desarmado, un plásmido binario con el T-DNA o transferir, que contiene generalmente un gen para la selección de células transformadas y el gen a transferir. Ambos genes deben estar equipados con señales de iniciación y terminación transcripcionales y translacionales.

El plásmido binario se puede transferir, a modo de ejemplo, mediante electroporación u otros métodos de transformación en la cepa de agrobacteria (Mozo & Hooykaas, Plant Mol. Biol. 16 (1991), 917-918). El cocultivo de plántones vegetales con la cepa de agrobacteria tiene lugar generalmente durante dos a tres días.

La expresión de genes ajenos se puede regular de manera constitutiva, inducible (mediante factores bióticos y abióticos), de modo específico para los tejidos, o bien específico para el desarrollo. Una expresión relativamente constitutiva se consigue, a modo de ejemplo, mediante el promotor 35S del virus de mosaico de coliflor en plantas, que se ha descrito por Shewmaker *et al.* (Virology 140(1985), 281-288) y Gardner *et al.* (Plant Mol. Biol. 6 (1986), 221-228).

Como genes marcadores seleccionables se pueden emplear, a modo de Ejemplo, el gen de resistencia de bialofos (bar), el gen de resistencia de canamicina, o bien G418 (NPTII), así como el gen DOG<sup>R</sup>1. El gen de resistencia a bialofos se aisló originalmente a partir de *Streptomyces hygroscopicus*. Este codifica para una fosfotricinacetiltransferasa (PAT), que acetila el grupo amino libre de fosfotricina (PPT), y con ello consigue una detoxificación de PPT (de Block *et al.*, EMBO J. 6 (1987), 2513-2518). El gen NPTII codifica para una fosfotransferasa de neomicina, que reduce la acción inhibitoria de canamicina, neomicina, G418 y paromicina mediante una reacción de fosforilado. El gen DOG<sup>R</sup>1 se aisló a partir de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Sonnewald y Ebneith, EP 0 807 836). Este codifica para una fosfatasa de desoxiglucosa-6-fosfato, que concede resistencia frente a 2-DOG (Randez-Gil *et al.*, Yeast 11 (1995), 1233-1240).

Hasta la fecha, a pesar de sus propiedades biotecnológicas interesantes, apenas se elaboró la especie Tagetes respecto a modificaciones técnicas génicas. Para una mejora técnica génica de Tagetes, una condición es un buen sistema de regeneración. La regeneración a través de organogénesis bajo empleo de hojas de plánton de partida se desarrolló por Ketel (Physiol. Plant. 93 (1986), 298-304), Khotari y Chandra (Hortscience 19 (1984a), 703-705) y (J. Plant Physiol, 122 (1986), 235-241). Khotari y Chandra describen también la regeneración de plantas a partir de rodajas de flores inmaduras, no fecundadas (J. Plant Physiol 117 (1984b), 105-108). También se pueden emplear hipocótilos para la generación (Belarmino *et al.*, Jpn J. Breed 42 (1992), 835-841).

La transformación y establecimiento de cultivos de raíces de *Tagetes laxa* se ha descrito por Talou *et al.*, Planta Médica 60, 260-262 (1994), aunque hasta la fecha no se han descrito procedimientos de transformación con una regeneración subsiguiente para dar plantas transgénicas, fértiles, para la especie Tagetes.

Otras especies conocidas de la familia Asteraceae son, a modo de ejemplo, Taraxacum con el tipo conocido *Taraxacum officinale* (diente de león), dalia, Helianthus, con el tipo conocido *Helianthus annuus* (girasol), Aster, Calendula (caléndula), Carduus (*Pappus simple*), achicoria, entre otras. Con excepción de girasol, para todas las especies de esta familia no existen técnicas, o existen apenas técnicas *in vitro*, u otras técnicas, insuficientes, que serían apropiadas para la transformación de estas especies. Aunque los representantes aislados de la familia de Asteraceae son relativamente homogéneos desde el punto de vista morfológico, las técnicas *in vitro* para la regeneración de transformación no se pueden generalizar, de modo que la utilización de protocolos de transformación, que se han elaborado, a modo de ejemplo, para el girasol, no es posible para otras especies, como Tagetes.

Por lo tanto, la presente invención tomaba la tarea de poner a disposición un procedimiento para la obtención de plantas transgénicas fértiles de la especie Tagetes.

## ES 2 274 820 T3

El procedimiento según la invención abre por primera vez la posibilidad de regeneración de células vegetales transformadas de la especie *Tagetes* para dar plantas transgénicas fértiles.

El procedimiento para la obtención de plantas de *Tagetes* transformadas de manera estable consiste en los siguientes pasos: (a) el cultivo de plantas de partida a transformar, así como la obtención del plantón apropiado; (b) la transferencia de secuencias de DNA en células vegetales; (c) la selección de células vegetales transformadas, y (d) la regeneración de estas células vegetales transformadas para dar plantas transgénicas fértiles, empleándose para la regeneración en la fase 1 una citoquinina, o bien un conjunto de citoquinina, y una auxina, o bien un conjugado de auxina, y en la fase 2 una auxina, o bien un conjugado de auxina, y ácido giberélico GA3.

Como métodos para la transformación son apropiadas la transformación génica tanto directa, como también indirecta. Con éxito también se pueden emplear la transformación mediada por agrobacterias bajo empleo de los más diversos plantones de partida, como por ejemplo cotiledóneas, hojas, hipocotilos, tallos, raíces, callos, semillas maduras e inmaduras, o bien tejidos de flores. En este caso, la transferencia génica se puede efectuar tanto mediante cocultivo/incubación aislada, o bien humectación con la cepa de agrobacterias, como también mediante una infiltración en vacío de plantones a favorecer con el cultivo bacteriano correspondiente. En este caso, el cultivo de semillas como auxiliares puede ser ventajoso. Cada cepa de agrobacteria, que contiene un plásmido Ti o Ri con las informaciones genéticas necesarias para la transferencia, es apropiada como vector para la transformación. Las cepas de agrobacterias apropiadas son EHA101 [pEHA101], EHA105 [pEHA105], LBA4404 [pAL4404], C58C1 [pMP90] y C58C1 [pGV2260]. También vectores virales parecen apropiados para la transformación de *Tagetes*. Otros métodos para la transferencia de material genético en *Tagetes* son, a modo de ejemplo, la transformación de protoplastos mediada por polietilenglicol (PEG), la electroporación, la sonicación o microinyección, así como la transformación de células intactas o tejidos mediante micro- o macroinyección en tejidos o embriones, electroporación de tejidos, incubación de embriones secos en disolución que contiene DNA, la infiltración en vacío de semillas, véase también Eds. Galun, E. and Breiman, A. In: *Transgenic Plants*, Imperial College Press, 1997. Del mismo modo es posible el empleo de cánones de partículas para el bombardeo de los más diversos plantones, como por ejemplo hojas y callos.

Para la transformación mediada por agrobacterias, se pueden emplear todos los vectores de transferencia génica que contienen las secuencias frontera necesarias para la transferencia de T-DNA (frontera izquierda y derecha, LB, o bien RB), portan uno o varios genes marcadores o delatores bajo control de promotores apropiados, así como terminadores, y/o contienen otros genes útiles u objetivo, igualmente bajo control de unidades reguladores transcripcionales y traslacionales. Como genes marcadores, o bien delatores seleccionables, son concebibles tanto los genes *bar/PAT*, *NPTII* y *DOG<sup>R</sup>1*, como también, a modo de ejemplo, los siguientes: el gen de cloroanfenicolacetiltransferasa (*CAT*) de Transposon *Tn9*, el gen octopinsintasa y nopalinsintasa, ambos de la región T del plásmido pTi, el gen higromincinofototransferasa de *E.coli*, el gen *aroA* de *Salmonella typhimurium*, que codifica la EPSP-sintasa, y de este modo proporciona resistencia contra glifosato, el gen glucoronidasa *E. coli*, el gen luciferaza, así como el gen GFP, en sus variantes disponibles hasta la fecha, que codifica para una proteína autofluorescente -originalmente fluorescente verde de manera exclusiva-. Además, todos los demás genes que codifican para la resistencia contra antimetabolitos, antibióticos o herbicidas, se pueden emplear como genes marcadores seleccionables, véase también Wilmlink, A. and Dons, J.J.M. (*Plant Mol. Biol.* 11 (1993), 165-185). También son empleables sistemas de selección positivos, como por ejemplo la consecución de la capacidad de un empleo de azúcares, como se describe en la WO 94/20627.

Preferentemente, la transferencia de secuencias de DNA se efectúa en la planta de *Tagetes* a transformar, o bien sus plantones, a través de transferencia génica mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

El medio de regeneración según la invención contiene una concentración de sacarosa de un 0,5-5% de sacarosa, preferentemente de un 1 a un 3% de sacarosa. En este caso se puede substituir sacarosa, en caso dado, también por otros azúcares -entre otros glucosa o fructosa-.

El medio de regeneración según la invención contiene además reguladores de crecimiento, como auxinas y/o conjugados de auxina, así como citoquininas y/o conjugados de citoquinina. Como auxinas entran en consideración auxinas tanto naturales, como también sintéticas. La auxina natural es ácido indolacético (IAA), auxinas sintéticas son, por ejemplo, ácido indol-3-butírico (IBA), ácido naf-1-ilacético (NAA), y el herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). También otros herbicidas con acción de auxina son concebibles como reguladores del crecimiento. Los conjugados de auxina son compuestos de auxina (IAA) con ácido aspártico, glucosa, mioinositol y otros reactivos. También en el caso de citoquininas son empleables, en caso dado, componentes naturales, como por ejemplo zeatina, y sintéticos, como 6-bencilaminopurina (BAP) y 6-furfurilaminopurina (cinetina). Frecuentemente se emplea ribósido de zeatina como conjugado de citoquinina. En este caso, las auxinas y las citoquininas se pueden emplear respectivamente como componentes aislados, como también como mezclas de auxina, o bien citoquinina. La concentración de reguladores de crecimiento aislado se sitúa en 0,05 - 10 mg/l, preferentemente en 0,1 - 5 mg/l.

En una forma de ejecución especial, se añaden al medio de cultivo en primer lugar los reguladores de crecimiento bencilaminopurina, así como ácido indolacético para el cultivo de plantones durante y después del co-cultivo con las bacterias (fase 1). Tras el cocultivo se efectúa la transferencia de plantones al mismo medio basal, que contiene adicionalmente un antibiótico, como por ejemplo carbenicilina, timentina, ticarcilina, cefotaxim o  $\beta$ -bactilo para la inhibición del crecimiento bacteriano, así como el verdadero agente selectivo para el enriquecimiento del material celular transgénico. La transferencia a medio fresco de la misma composición se efectúa respectivamente después de 14 días, hasta que se han desarrollado capullos y pequeños brotes (tiempo: aproximadamente 4-6 semanas). A

continuación para el crecimiento de brotes y desarrollo de raíces posterior se emplea un medio que, en lugar de bencilaminopurina y ácido indolacético, contiene los reguladores de crecimiento ácido indol-3-butírico y el ácido giberélico GA<sub>3</sub> (fase 2).

- 5 El procedimiento de regeneración según la invención para la obtención de plantas fértiles transgénicas de la especie *Tagetes* es aplicable, entre otras, en las especies *Tagetes* (*T.*) *patula*, *T. erecta*, *T. laxa*, *T. minuta*, *T. lucida*, *T. argentina* *cabrera*, *T. tenuifolia*, *T. lemmonii*, o bien *T. bipinata*.

#### Ejemplo 1

10

##### *Construcción del plásmido binario pTGI*

Para la construcción del plásmido binario pPTGI (Figura 1A) se empleó el plásmido pGPTV-Bar (Becker, D. *et al.*, Plant Mol. Biol. 20 (1992), 1195-1197). El gen GUS sin promotor de este plásmido se eliminó mediante la disociación con los enzimas de restricción EcoRI y SmaI. Los extremos sobresalientes se cargan a continuación bajo empleo de polimerasa de Klenow, y el fragmento se ha ligado con un fragmento PstI igualmente tratado, que contiene el gen glucuronidasa con un intron (GUS-IV2) (Vancanneyt, Mol. Gen. Genet. 220 (1990), 245-250).

Para la construcción del plásmido binario pPTGIDOG se amplificó el gen DOG<sup>R</sup>1 con una región de promotor limitante 35S y terminador ocs mediante PCR. A tal efecto sirvió el elemento de inserción pBinAR-DOG<sup>R</sup>1, que se ha descrito por Sonnewald y Ebneith, EP0807836, como secuencia de muestra. Para la amplificación se han empleado ambos cebadores 35SXbaI y OcsXbaI. 35SXbaI es homólogo a los nucleótidos 1 a 24 del promotor 35S del plásmido pBinAR (Höfgen y Willmitzer (Plant Science) 66 (1990), 221-230), y contiene adicionalmente una región de reconocimiento XbaI en el extremo 5' (5'-ATTCTAGACATGGAGTCAAAGATTCAAATAGA-3'). OcsXbaI es homólogo a los últimos 24 nucleótidos de la región de terminación ocs del plásmido pBinAR, y contiene un punto de restricción XbaI adicional (5'-ATTCTAGAGGACAATCAGTAAATTGAACGGAG-3'). El fragmento amplificado se liberó de extremos de hebras aisladas sobresalientes, se ligó con cebadores HindIII y se clonó en el plásmido pBS+ (Stratagene, Californien, USA). Tras análisis secuencial, el fragmento completo, que contenía el promotor 35S, el gen DOG<sup>R</sup>1, y la región de terminador ocs, se ha clonado como fragmento HindIII en el vector cortado con HindIII y pPTGI. La figura 1 muestra el mapa génico de T-DNA de ambos plásmidos binarios pPTG (5007 bp) (figura 1A) y pPTGI-DOG<sup>R</sup>1 (6209 bp) (figura 1B), que se emplearon para las transformaciones de *Tagetes*. Las abreviaturas tienen el siguiente significado:

- 35S-P: promotor CaMV 35S  
 35S-T: terminador CaMV 35S  
 NOS-P: promotor de nopalinsintasa  
 uidA: gen  $\beta$ -glucuronidasa  
 bar: gen fosfinotricinacetiltransferasa  
 LB: frontera izquierda  
 45 RB: frontera derecha  
 IV2: 2º intrón del gen ST-LS1  
 50 pAg7: gen 7-poli(A)señal  
 DOG<sup>R</sup>1: gen 2-DOG fosfato-fosfatasa de *Saccharomyces cerevisiae* S288c  
 ocs: terminador de octopinsintasa.

#### Ejemplo 2

##### *Determinación de la toxicidad de fosfinotricina (PPT)*

60 Se cortaron hojas de plantas de *Tagetes patula* establecidas *in vitro* de genotipos TAG 80 y TAG 81 (Genbank, IPK Gatersleben) transversalmente al nervio central en rodajas de 10 a 60 mm<sup>2</sup> de tamaño, se depositaron en medio MS con un 2% de sacarosa, 3 mg/l de bencilaminopurina (BAP) de ácido indolacético (IAA), y diferentes concentraciones de (IAA). La incubación tubo lugar en un ritmo de 16/8 h de luz/obscuridad con aproximadamente 50  $\mu$ E/m<sup>2</sup>s y 21 a 24°C durante 2 semanas. A continuación se registró la fracción de plantones deteriorados en el número total de plantones sometidos a ensayo (figura 2). Las concentraciones a partir de 1 mg/l de PPT condujeron a la muerte completa de todos los plantones en ambos genotipos de *Tagetes patula* sometidos a ensayo, por lo cual se empleó esta concentración para la selección tras el cocultivo.

## Ejemplo 3

*Transformación de Tagetes erecta*

5 Se emplearon como material primario plántones de brotes *in vitro* de *Tagetes erecta* TAG 76 (Benbank, IPK, Gatersleben). Para la esterilización superficial se incubaron las semillas durante 5 minutos en etanol al 70%, y a continuación se lavaron minuciosamente con agua estéril destilada. Después se secaron las semillas con papel filtrante, se depositaron en medio sólido MS (Murashige and Skoog (1962) *Physiol. Plant.* 15, 473-497), y se incubaron durante 3 a 12 semanas en ritmo de 16/8 h de luz/obscuridad con aproximadamente 50  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$  y a 21 hasta 24°C.

10 Todas las hojas (excepto cotiledóneas) que se habían formado durante este tiempo se cosecharon y se cortaron transversalmente al nervio central. Los plántones de hojas producidos de este modo, con un tamaño de 10 a 60  $\text{mm}^2$ , se conservaron durante un máximo de 2 horas en el transcurso de la preparación en medio MS líquido a temperatura ambiente.

15 El cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105[pTGI] se absorbió durante la noche en YEB (0,1% de extracto de levadura, 0,5% de extracto de carne de buey, 0,5% de peptona, 0,5% de sacarosa, 0,5% de sulfato de magnesio x 7  $\text{H}_2\text{O}$ ) con 25 mg/l de canamicina mediante inoculado de una colonia aislada a 28°C durante 16 a 20 horas. A continuación se cosechó la suspensión de bacterias mediante centrifugado a 6.000 g durante 10 minutos, y se resuspendió en el medio MS líquido de tal manera que se produjo una OD de aproximadamente 0,3 a 0,8.

20 Inmediatamente antes del cocultivo, el medio MS en el que se han conservado las hojas, se ha substituido por la suspensión de bacterias. La incubación de hojitas en la suspensión de agrobacterias se efectuó durante 30 minutos bajo agitación ligera a temperatura ambiente. A continuación se colocaron los plántones infectados en un medio MS solidificado con un 0,8% de planta Agar (Duchefa, NL) con un 2% de sacarosa, y con 3 mg/l de bencilaminopurina (BAP), así como 1 mg/l de ácido indolilacético (IAA). La aplicación de reguladores del crecimiento corresponde a una combinación desarrollada por Kothari y Chandra (1984, *HortScience* 19, 703-705). La orientación de hojas sobre el medio carece de significado. El cultivo de plántones tubo lugar durante 6 días bajo las mismas condiciones que para la germinación de semillas de *Tagetes*. A continuación se trasladaron los plántones cocultivados a medio MS fresco con los mismos reguladores de crecimiento, conteniendo este segundo medio adicionalmente 250 mg/l de  $\beta$ -bactilo y

30 1 mg/l de PPT.

A intervalos de 14 días se efectuó la transferencia de plántones a medio fresco hasta que se habían desarrollado capullos y pequeños brotes, que se trasladaron al mismo medio basal, incluyendo  $\beta$ -bactilo y PPT, pero con una combinación modificada de reguladores del crecimiento, esto es 0,5 mg/l de IBA y 0,5 mg/l de  $\text{GA}_3$ , para el enraizado.

35 Los brotes enraizados se pudieron trasladar al invernadero.

## Ejemplo 4

*Transformación de Tagetes patula*

40 Como material objetivo para la transformación sirvieron plantas *Tagetes patula* TAG80 establecidas *in vitro* (Genbank, IPK, Gatersleben). Se obtuvieron, o bien se propagaron según rutina mediante propagación de brotes bajo empleo de medio MS sólido, al que se habían añadido reguladores del crecimiento IBA (0,5 mg/l) y  $\text{GA}_3$  (0,5 mg/l). Se cocultivaron hojas de estas plantas con la cepa *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105[pTGI-DOG<sup>R</sup>1] durante 4, 6

45 y 8 días. La puesta en práctica del ensayo, así como las condiciones de regeneración empleadas, correspondían a las descritas en el ejemplo 3. Se enraizaron regenerados de brotes transgénicos potenciales en presencia de 1 mg/l, de PPT.

## Ejemplo 5

50 *Ensayo sobre transgenicidad*A. *Identificación de glucuronidasa*

55 Se sometieron hojas y segmentos de raíces de plantas regeneradas *in vitro* a una identificación de enzima glucuronidasa cualitativa (GUS), en la que se infiltró la misma en un tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7,0, que contenía 10 mM de EDTA, un 0,1% de Triton X100, 10 mM DTT, con el substrato GUS ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-glucurónico (X-GlcA) durante 1 minuto bajo vacío, y a continuación se incubaron durante aproximadamente 15 horas a 37°C. A continuación se efectuó la decoloración de plántones con etanol al 70% a temperatura ambiente. Las hojas y semillas mostraban una coloración azul intensiva, lo que identifica la expresión del gen delator en

60 *Tagetes*.

B. *Análisis de PCR genómico*

65 De las plantas transgénicas potenciales a analizar, así como de 3 plantas de tipo salvaje no transformadas, se aisló DNA genómico como sigue: aproximadamente 100 mg de material de hojas se congeló en un recipiente de reacción en nitrógeno líquido, y a continuación se disgregó con un homogeneizador. La extracción se efectuó en 900  $\mu\text{l}$  de tampón de extracción (100 mM tris-HCl, pH 8,0, 500 mM NaCl, 50 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 10 mM mercaptoetanol). Tras adición

## ES 2 274 820 T3

de 100  $\mu$ l de disolución de SDS al 20% se mezcló y se incubó durante 10 minutos a 65°C. Tras adición de 200  $\mu$ l de disolución de acetato potásico 5M siguió una incubación de 20 minutos a 4°C en un baño de hielo. El precipitado producido en este tiempo se eliminó mediante centrifugado a 12000 g durante 15 minutos, y el DNA contenido en el exceso se precipitó mediante adición de 800  $\mu$ l de isopropanol helado a -20°C en el intervalo de 30 minutos. Las muestras se centrifugaron para recoger el DNA, que se lavó a continuación con etanol helado al 70%, de secado al aire, y resuspendido en 25  $\mu$ l de 10 mM-tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA E) con 0,2 mg/ml RNas A. Se emplearon 3  $\mu$ l de DNA aislado de este modo para la reacción PCR.

El gen DOG<sup>R</sup>1 comprende 741 bp, y se amplificó mediante el empleo de ambos cebadores DOG<sup>R</sup>1-1 y DOG<sup>R</sup>1-2. DOG<sup>R</sup>1-1 es homólogo a los nucleótidos 1 a 26 del gen DOG<sup>R</sup>1, y contiene 10 nucleótidos adicionales, que comprenden los puntos de reconocimiento de restricción BamHI y NcoI (5'-ATGGATCCCCATGGCAGAAATTTTCAGCTGATCTATG-3'). DOG<sup>R</sup>1-2 es homólogo a los nucleótidos 720 a 741 del gen DOG<sup>R</sup>1, y contiene 11 nucleótidos adicionales, que comprenden el lugar de reconocimiento de restricción SalI (5'-ATGTCGACTACTCAGGCCCTTGTCAAAGGGTTG-3'). La carga para la reacción PCR se efectuó según los datos del fabricante Takara (Japan). Se desarrollaron los siguientes pasos de incubación:

1. 94°C - 4 min.

2. 94°C - 15 sec.

3. 58°C - 30 sec.

4. 72°C - 1 min.

Repetición de 4 veces de los pasos 2 - 4.

5. 94°C - 15 sec.

6. 56°C - 30 sec.

7. 62°C - 1 min.

Repetición de 4 veces de los pasos 5 - 7.

8. 94°C - 15 sec.

9. 52°C - 30 sec.

10. 72°C - 1 min.

Repetición de 24 veces de los pasos 8 - 10.

11. 72°C - 10 min.

12. 4°C - fin de la reacción.

A continuación de la reacción PCR se han mezclado 5  $\mu$ l de muestras aisladas con 5  $\mu$ l de disolución de detención (10 mM tris HCl, pH 8,0, 50% de glicerina, 0,05% de SDS, 0,2% de xilencianol), y se han separado en un gel de agarosa al 1%. Tras desarrollo de la separación electroforética a 100 V durante 30 minutos se valoró el gel mediante luz UV. La tabla 1 contiene los resultados de análisis de transgenicidad de productos transformados de *Tagetes patula* potenciales. Todas estas plantas se regeneraron en presencia de 1 mg/l de PPT. Para el análisis de PCR se emplearon sólo aquellas plantas que pueden formar reiteradamente raíces en presencia de herbicida. En todas estas planta se pudo identificar el gen DOG<sup>R</sup>1. Sorprendentemente, sólo en algunas plantas era identificable actividad de GUS en las hojas.

ES 2 274 820 T3

TABLA 1

Investigación de plantas de *Tagetes patula* transgénicas potenciales, que se han transformado con el plásmido binario pPTGI-DOG<sup>R</sup>1 (véase ejemplo 4)

Nº de plantas	Tiempo de co-cultivo (d)	Resistencia/nuevo enraizado <sup>a)</sup>	Actividad de GUS <sup>b)</sup>	PCR genómico (DOG <sup>R</sup> 1-cebador) <sup>c)</sup>
1	6	-	-	n.d.
2	6	-	-	n.d.
3	6	-	-	n.d.
4	6	+	-	+
5	6	(+)	-	+
6	6	(+)	-	+
7	6	(+)	-	+
8	6	-	-	n.d.
9	6	++	-	+
10	6	++	-	+
11	6	++	-	+
12	6	-	-	n.d.
13	6	-	-	n.d.
14	6	-	-	n.d.
15	6	+	-	+
16	6	+	-	+
17	6	++	(+)	+
18	6	-	-	n.b.
19	6	(+)	-	-
20	4	-	-	n.b.
21	4	-	-	n.b.
22	4	++	(+)	+
23	4	+	-	+
24	8	-	-	n.b.
25	8	-	-	n.b.
26	8	(+)	-	+
27	8	++	(+)	+
28	8	-	-	n.b.
29	8	(+)	(+)	+
30	8	++	(+)	+

Explicación de signos:

- a) - el brote de estas plantas no puede formar raíces en presencia de 1 mg/l de PPT, muestra apenas crecimiento débil y muere.  
 (+) el brote muestra sólo un poder de formación de raíces reducido. La raíz crece apenas.  
 + el brote muestra una clara formación de raíces. La planta crece normalmente.  
 ++ el brote forma un fuerte sistema de raíces en tiempo breve. la planta crece sin merma en presencia de 1 mg/l PPT.
- b) - no es identificable una actividad de GUS.  
 (+) se muestra una débil actividad de GUS en forma de puntos reducidos de color azul sobre la superficie de la hoja.
- c) n.d. no determinable.  
 + después de reacción de PCR y subsiguiente separación por electroforesis en gel se puede identificar una clara banda de aproximadamente 750 bp. En cargas de control para la que se ha empleado el DNA genómico de plantas de tipo salvaje *Tagetes* no eran identificables estas bandas.

## ES 2 274 820 T3

### Ejemplo 6

#### *Análisis de descendencia*

5 Para el análisis de descendencia se empleó la planta transgénica *Tagetes erecta* TAG 76 N° 2. La obtención de esta planta se describió en el ejemplo 3.

10 Las semillas de esta planta, así como de una planta de tipo salvaje no tratada se sembraron en cubetas para plantas (aproximadamente 30 x 60 cm), y se cultivaron bajo condiciones de invernadero a aproximadamente 25°C. Después de 12 días, los brotes habían formado aproximadamente 3 a 4 hojas, alcanzado una altura de unos 5 a 10 cm. Entonces se pulverizaron con una disolución diluida 1:1000 de herbicida Basta a intervalos de un día respectivamente. Cuatro días después de la última aplicación por pulverizado de herbicida se efectuó la valoración del ensayo. Todos los 83 brotes de tipo salvaje pulverizados mostraban daños masivos, o habían muerto ya. En el caso de una descendencia de brotes de la planta transgénica N° 2, de 190 plantas pulverizadas 134 no mostraba ningún tipo de daño, y 56 estaban dañadas, o bien habían muerto. En esta proporción de separación de aproximadamente 2,5 plantas resistentes: 1 planta sensible se aproxima una herencia de Mendel, que debería resultar 3:1 en el caso ideal.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

## ES 2 274 820 T3

### REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para la obtención de plantas fértiles transformadas de manera estable de la especie *Tagetes*, **caracterizado** porque están contenidos los siguientes pasos:
- (a) cultivo de la planta de cultivo a transformar, así como obtención del plantón apropiado,
- (b) transferencia de secuencias de DNA en células de la planta,
- 10 (c) selección de células de la planta transformadas,
- (d) regeneración de plantas fértiles transgénicas, empleándose para la regeneración en la fase 1 una citoquinina, o bien un conjugado de citoquinina, y una auxina, o bien conjugado de auxina, y en la fase 2 una auxina, o bien un conjugado de auxina, y ácido giberélico GA3.
- 15 2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque, para la regeneración, en la fase 1 se emplean bencilaminopurina y ácido indolacético, y en la fase 2 ácido indolbutírico y ácido giberélico GA3.
- 20 3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, **caracterizado** porque la transferencia de secuencias de DNA en la planta a transformar, o bien sus plantones, se efectúa mediante agrobacterias.
4. Procedimiento según la reivindicación 3, **caracterizado** porque las hojas se emplean como plantones.
- 25 5. Procedimiento según la reivindicación 3 o 4, **caracterizado** porque se efectúa un cocultivo de 2 a 8 días con agrobacterias.
6. Procedimiento según las reivindicaciones 3 a 5, **caracterizado** porque, en el caso del tipo de agrobacterias empleado, se trata de *Agrobacterium tumefaciens*.
- 30 7. Procedimiento según las reivindicaciones 3 a 6, **caracterizado** porque durante el cocultivo se emplea un medio que contiene reguladores de crecimiento.
8. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado** porque para la selección de células transformadas se emplean resistencias herbicidas, antibióticas o antimetabólicas, o se utilizan procedimientos de selección positivos.
- 35 9. Procedimiento según la reivindicación 8, **caracterizado** porque para la selección se emplea fosfinitricina (PPT).
10. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado** porque se transforma el tipo *Tagetes erecta*, o bien *Tagetes patula*.
- 40 11. Plantas de *Tagetes* transgénicas fértiles.
12. Plantas de *Tagetes* transgénicas fértiles, obtenidas mediante un procedimiento según las reivindicaciones 1 a 10.
- 45 13. Pétalos transgénicos de una planta de *Tagetes* según la reivindicación 11 o 12.
14. Semillas transgénicas de una planta de *Tagetes* según la reivindicación 11 o 12.
- 50
- 55
- 60
- 65



FIG.2

