



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 311 116**

51 Int. Cl.:
C12N 15/82 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)
A01H 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03784146 .7**
96 Fecha de presentación : **01.08.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1527185**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.05.2005**

54 Título: **Transformación de plastidios utilizando vectores modulares.**

30 Prioridad: **06.08.2002 DE 102 36 001**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.02.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.02.2009

73 Titular/es: **Icon Genetics GmbH**
Briennerstrasse 12A
80333 München, DE

72 Inventor/es: **Herz, Stefan;**
Koop, Hans-Ulrich;
Golds, Timothy, J. y
Eibl, Christian

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 311 116 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

Transformación de plastidios utilizando vectores modulares.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se relaciona con biotecnología vegetal en general, y más particularmente con un procedimiento y vectores para transformación de plastidios de plantas. Específicamente, la presente invención proporciona un procedimiento de transformación genética de plastidios vegetales. También se describen vectores para el procedimiento y plantas o células vegetales que se obtienen o que se pueden obtener de acuerdo con el procedimiento de la invención.

Antecedentes de la invención

De acuerdo con el conocimiento aceptado generalmente, dos clases de organelos celulares, es decir, plastidios y mitocondrias se derivan de procariotas inicialmente independientes que fueron captados en un predecesor de las células eucarióticas actuales por eventos endosimbióticos separados (Gray, 1991). Como una consecuencia, estos organelos contienen su propio ADN, los transcritos de ADN en forma de ARN mensajero, ribosomas y por lo menos parte de los ARNt necesarios que se requieren para la descodificación de información genética (Merechal-Drouard *et al.*, 1991).

Mientras que poco después de la captación endosimbiótica estos organelos eran genéticamente autónomos dado que contenían todos los elementos necesarios para impulsar vida procariótica, esta autonomía se redujo durante la evolución por transferencia de la información genética al núcleo de las células. No obstante, su información genética es de complejidad suficiente para hacer que los organelos celulares recientes sean un objetivo atractivo para la tecnología genética. Este es particularmente el caso con plastidios, debido a que estos organelos aún codifican aproximadamente 50% de las proteínas que se requieren para su función principal dentro de la célula vegetal, la fotosíntesis. Los plastidios también codifican sus ARN ribosómicos, la mayor parte de sus ARNt y las proteínas ribosómicas. En total, el número de genes en el plastoma está en el ámbito de 120 (Palmer, 1991). La gran mayoría de las proteínas que se encuentran en los plastidios, no obstante, son importadas del compartimiento genético nuclear/citosólico.

Los plastidios pueden ser transformados genéticamente

Con el desarrollo de tecnologías de clonación molecular generales, ahora se ha vuelto posible modificar genéticamente plantas superiores por transformación. El énfasis principal en la transformación vegetal se encontraba y aún se encuentra en la transformación nuclear, dado que la mayor parte de los genes, aproximadamente 26.000 en el caso de *Arabidopsis thaliana*, cuya secuencia completa recientemente se ha publicado (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000) se encuentra en el núcleo de la célula. La transformación nuclear era más fácil de conseguir dado que estaban disponibles vectores biológicos tales como *Agrobacterium tumefaciens*, el cual puede ser modificado para habilitar eficazmente la transformación nuclear (Galvin, 1998). Además, el núcleo es accesible más directamente a ácidos nucleicos extraños, mientras que los organelos están rodeados por dos membranas de envoltura que, hablando de manera general, no son permeables a macromoléculas tales como ADN.

Una capacidad de transformar plastidios es altamente deseable dado que puede hacer uso de la alta dosificación genética en estos organelos, la cual tiene el potencial de expresión de niveles de transgenes extremadamente altos. Además, la transformación de plastidios es atractiva debido a que los rasgos codificados por los plastidios no son transmisibles por el polen; por lo tanto se reducen en gran medida los riesgos potenciales de un escape involuntario de un transgen a sus parientes silvestres de plantas transgénicas. Otras ventajas potenciales de la transformación de plastidios incluyen la factibilidad de expresión simultánea de genes múltiples como una unidad policistronica, y la eliminación de efectos de posición y y del silenciamiento génico que pueden resultar después de la transformación nuclear.

Los métodos que permiten la transformación estable de los plastidios en realidad se pueden desarrollar para plantas superiores. Hasta ahora están disponibles dos métodos diferentes, es decir, el bombardeo con partículas de los tejidos, en particular tejidos de hoja (Svab *et al.*, 1990) y el tratamiento de protoplastos con polietilenglicol (PEG) en presencia de vectores de transformación adecuados (Koop *et al.*, 1996). Ambos métodos median la transferencia de ADN plasmídico a través de dos membranas de envoltura en el estroma de los organelos.

Los métodos convencionales para transformación de plastidios habitualmente se basan en la selección para la inserción de un cassette marcador de resistencia a antibióticos en el plastoma, tal como un cassette de expresión que contenga el gen *aadA* (que codifica para la encima aminoglucósido adeniltransferasa) el cual confiere resistencia a inhibidores como espectinomycin o estreptomycin (US5877402) o *aphA-6* (que codifica para la enzima aminoglucósido fosfotransferasa A-6), el cual confiere resistencia a canamicina (Huang *et al.*, 2002). De manera alternativa, se obtiene la selección al sustituir un gen de plastidio residente completo por un gen mutante el cual confiere resistencia a inhibidores de selección (US5451513). Estos genes marcadores de selección que se necesitan para la selección de células vegetales transgénicas de un amplio fondo de células no transformadas, codifican para resistencia a antibióticos o a herbicidas. El gen marcador de selección del gen para plastidio mutante se incluye en la región de integración, la cual está flanqueada por regiones homólogas que dirigen la integración del plastoma. La selección para los transformantes de plastidios después se obtiene mediante cultivo del material vegetal transformado en un medio que contiene

el inhibidor apropiado. Dado que estos genes marcadores se integran de manera estable en el genoma junto con los genes de interés, permanecerán en las plantas transgénicas homoplastómicas aunque no se requieran para la función de los genes de interés. Estos genes marcadores remanentes son el tema principal de crítica de la biotecnología vegetal. La construcción de un sistema de selección que no resulte en un gen de resistencia en las plantas transgénicas, es por lo tanto altamente deseable (Iamtham and Day, 2000).

La tecnología convencional de transformación de plastidios se describe en Heifetz, 2000 y Koop *et al.*, 1996. La transformación de vectores plastidios habitualmente contienen uno o más genes de interés flanqueados por dos regiones del sitio de inserción, las cuales son necesarias para la introducción estable de las secuencias creadas mediante ingeniería al plastoma por eventos de recombinación homólogos (US5877402, US5451513). No obstante se necesita trabajo de clonación sustancial para generar las moléculas vectoras de transformación que contengan una gran cantidad de fragmentos diferentes: dos flancos, un gen marcador, uno o más genes de interés y elementos reguladores tales como elementos promotores, 5'-UTR, 3'-UTR o separadores.

La clonación de los vectores de transformación resulta problemática en casos donde (por lo menos uno de) los genes clonados tiene un efecto tóxico sobre la bacteria utilizada para clonación. Además, utilizar el potencial altamente deseable para coexpresar una serie de transgenes introducidos está limitado por el tamaño total del plásmido transformante.

Una complicación mayor al obtener una transformación de plastidios es el alto número de copias del plastoma. Después de la transferencia del ADN vector en los plastidios sólo una o muy pocas copias de las moléculas introducidas se recombinarán con el plastoma. Por lo tanto, inicialmente sólo una proporción pequeña de las moléculas de plastoma recombinantes se generan en el fondo de la amplia mayoría de las moléculas de plastoma de tipo silvestre ("estado heteroplastómico"). Mediante un procedimiento que consume mucho tiempo de segregación bajo presión selectiva es posible eliminar las copias del tipo silvestre originales del plastoma y obtener un "estado recombinante homoplastómico" que está caracterizado por la sola presencia de moléculas de plastoma recombinantes. La obtención del estado homoplastómico es soportado por varios ciclos de regeneración sobre un medio selectivo que contiene los antibióticos apropiados. Habitualmente 3-5 de tales ciclos son necesarios para obtener el estado recombinante homoplastómico. La presencia de copias remanentes de plastoma de tipo silvestre puede ser monitorizada por análisis molecular como PCR o hibridación Southern. Dado que se requieren varias semanas para un ciclo de regeneración, se necesitan varios meses para generar transformantes de plastidios homoplastómicos.

Por lo tanto, un objetivo de la invención es proporcionar un procedimiento de transformación genética de plastidios vegetales novedoso, eficaz, rápido y altamente versátil, por medio del cual se pueda elaborar plantas transgénicas o células vegetales genéticamente estables.

Otro objetivo de la invención es proporcionar un procedimiento de transformación genética de plastidios vegetales el cual permita una reducción significativa en el número de ciclos de regeneración necesarios para obtener plantas homoplastómicas.

Otro objetivo de la invención es proporcionar un procedimiento de transformación genética de plastidios vegetales el cual permita la expresión de genes múltiples de interés (expresión policistónica).

Un objetivo adicional es proporcionar vectores los cuales pueden ser utilizados de un modo modular, y de esta manera reducir el trabajo de clonación y el tamaño total de las moléculas plasmídicas.

Un objetivo adicional es proporcionar vectores los cuales permitan la clonación de secuencias que tienen efectos tóxicos sobre bacterias utilizadas para clonación.

Un objetivo adicional es proporcionar un método que permita la generación de transformantes los cuales no presenten un gen marcador de resistencia en la planta o la célula vegetal finales.

Descripción general de la invención

Los objetivos anteriores se obtienen por un procedimiento de generación de plantas transgénicas o células vegetales transformadas en su plastoma, que comprende:

(a) introducir en los plastidios vegetales una primera molécula de ADN y una segunda molécula de ADN, en donde:

dicha primera molécula de ADN contiene una primera región homóloga a una región del plastoma para dirigir la integración del plastoma y una primera secuencia de interés, y

dicha segunda molécula de ADN contiene una segunda región homóloga a una región del plastoma para dirigir la integración del plastoma y una segunda secuencia de interés,

en tanto que un segmento de secuencia de dicha primera secuencia de interés es homólogo a un segundo segmento de dicha segunda secuencia de interés,

(b) seleccionar transformantes que tienen una secuencia de integración integrada de manera estable en el plastoma, en tanto que dicha secuencia de integración contiene por lo menos una porción de dicha primera y por lo menos una porción de dicha segunda secuencia de interés, como una secuencia continua.

Las realizaciones preferidas se definen mediante las reivindicaciones dependientes.

Se ha encontrado sorprendentemente que es posible generar plantas transgénicas o células vegetales transformadas en sus plastomas al introducir en los plastidios vegetales por lo menos dos moléculas de ADN que contienen secuencias superpuestas, lo cual resulta en una secuencia de integración continua en la planta transplastómica final. El procedimiento de la invención presenta varias ventajas importantes con respecto a los procedimientos convencionales de transformación de plastidios. Estas ventajas se indican en lo siguiente.

El procedimiento de la invención comprende introducir una primera y una segunda molécula de ADN en plastidios de una planta que va a ser transformada. Estas moléculas de ADN, las cuales se utilizan como vectores, se pueden introducir de manera consecutiva, es decir, en dos etapas separadas, o simultáneamente, es decir, en un procedimiento de una etapa. Es menos laborioso y por lo tanto se prefiere introducir las dos moléculas de ADN en un procedimiento de una sola etapa, por ejemplo mediante la utilización de una mezcla de tales moléculas de ADN. Para introducir dichas moléculas de ADN, se pueden utilizar métodos de transformación conocidos (véase abajo).

El diseño de dichas dos moléculas de ADN es de importancia central para el procedimiento de la invención. Dicha primera molécula de ADN contiene una primera región homóloga a una región del plastoma para dirigir la integración del plastoma, y una primera secuencia de interés. Dicha segunda molécula de ADN contiene una segunda región homóloga a una región del plastoma para dirigir la integración del plastoma, y una segunda secuencia de interés. Por lo tanto, es suficiente una región homóloga a una región del plastoma para cada molécula de ADN. Preferiblemente, dicha primera o dicha segunda molécula de ADN contiene únicamente una región homóloga a una región del plastoma para dirigir la integración del plastoma. De manera más preferible, dicha primera y segunda molécula de ADN contienen ambas, únicamente una región homóloga a una región del plastoma para dirigir la integración del plastoma.

Dichas regiones homólogas dirigen la integración de cada molécula de ADN en un sitio deseado del plastoma. La primera y segunda región homóloga determinan juntas, el tipo de modificación de ADN (por ejemplo inserción, supresión) del plastoma por el procedimiento de la invención. En una realización preferida, el objetivo de realizar el procedimiento de la invención es introducir una secuencia de integración en el plastoma sin ninguna modificación adicional del plastoma como una supresión de las secuencias del plastoma. Preferiblemente, las regiones homólogas de la primera y segunda moléculas de ADN corresponden juntas a una secuencia continua de plastoma. Generalmente, dichas regiones homólogas se derivan de plastomas de las especies vegetales que van a ser transformadas. En la medida en que se garantice homología suficiente para recombinación homóloga, las regiones homólogas pueden ser derivadas de otras especies vegetales, no obstante, de manera preferible, a partir de especies vegetales estrechamente relacionadas.

La longitud de cada región homóloga para la integración del plastoma puede variar en un intervalo amplio siempre y cuando la frecuencia de recombinación sea suficiente. Cada región homóloga puede tener una longitud de entre 100 y 5000 pares de bases. Habitualmente, la frecuencia de recombinación disminuye conforme disminuye la longitud de las regiones homólogas. Por lo tanto, la longitud preferiblemente es de por lo menos 200 a 300 pares de bases. De manera más preferible, la longitud está entre 500 y 2000 pares de bases, y de manera mucho más preferible entre 500 y 1000 pares de bases.

Tales secuencias de interés pueden contener cualquier secuencia nucleotídica que se va a integrar en el plastoma. Como un ejemplo típico, dichas secuencias de interés contienen un gen que se va a expresar. Dicha primera y dicha segunda secuencia de interés pueden contener cada una un fragmento de un gen que se va a expresar, en tanto que el gen se ensambla en la secuencia de integración. A este respecto la invención es altamente versátil. No obstante, de manera preferible, dicha primera y dicha segunda secuencia de interés son diferentes.

Dicha primera secuencia de interés contiene un segmento de secuencia que es homólogo a un segmento de secuencia de dicha segunda secuencia de interés. Por lo tanto, este segmento homólogo es una región que se solapa de dicha primera y dicha segunda secuencia de interés. El segmento de secuencia homólogo permite la recombinación de dicha primera y dicha segunda secuencia de interés de manera tal que la secuencia de integración se conforma en el plastoma, en tanto que la secuencia de integración contiene por lo menos una porción de dicha primera y por lo menos una porción de dicha segunda secuencia de interés como una secuencia continua (véase figura 5). El segmento de secuencia en una secuencia de interés preferiblemente está ubicado en el extremo distal de la secuencia de interés con respecto a dicha región homóloga que dirige la integración del plastoma.

Como un requerimiento mínimo, dicha primera y dicha segunda secuencia de interés contienen cada una, un segmento de secuencia homólogo, es decir, una secuencia que es de homología suficiente para permitir la recombinación homóloga entre dicha primera y dicha segunda secuencia de interés. Preferiblemente, el segmento de secuencia homólogo de dicha primera y de dicha segunda secuencia de interés, son idénticos.

Dicho segmento de secuencia puede ser o puede contener una secuencia (o una parte de la misma) involucrada en la expresión de un ARN y/o una proteína. Dicho segmento de secuencia puede ser o puede contener una secuencia involucrada en regular la transcripción o traducción de una secuencia codificante (por ejemplo un promotor, una secuencia 5' o 3' no traducida, un sitio de unión de ribosoma, etc. o partes de los mismos). Además, dicho segmento de secuencia puede ser o puede contener una secuencia codificante (o una parte de la misma) de una proteína que se va a expresar. En los casos antes mencionados, el segmento de secuencia de dicho primera secuencia de interés y el segmento de secuencia de dicha segunda secuencia de interés preferiblemente son idénticos con el fin de no alterar la función de regulación de dicha secuencia reguladora o dicha secuencia codificante. De manera alternativa, dicho segmento de secuencia puede tener el único propósito de permitir la recombinación entre dicha primera dicha segunda secuencia de interés para formar dicho secuencia de integración y puede no estar involucrada en la expresión de un ARN o una proteína.

Dicho(s) segmento(s) de secuencia típicamente forma(n) parte del transplastoma de la planta transgénica o de las células vegetales generadas de acuerdo con la invención (véanse figura 6 y 6). Dicho segmento de secuencia puede ser parte de una unidad de transcripción, en tanto que se puede convertir en parte de un transcrito formado a partir de dicha unidad de transcripción. Si dicho segmento de secuencia (o una parte del mismo) no se desea en tal transcrito (por ejemplo, si dicho segmento de secuencia interrumpe una secuencia codificante que codifica para una proteína que se va a expresar), la parte no deseada se puede eliminar por recorte mediante empalme de ARN. En este caso, se puede incluir un intrón, en especial, un intrón autoempalmante como un intrón del grupo I o del grupo II, en dicho segmento de secuencia para eliminar por corten y empalme las partes no deseadas. Los intrones autoempalmantes de muchas fuentes y su uso en la ingeniería genética se conocen en la técnica. La primera secuencia de interés puede proporcionar una parte 5' del intrón, y la segunda secuencia de interés puede proporcionar una parte 3' del intrón, por lo que el intrón funcional se puede ensamblar cuando se forma la secuencia de integración.

Dicha primera y dicha segunda secuencia de interés pueden ser idénticas, lo que lleva a una secuencia de integración que consiste de dicha secuencia de interés. En este caso limitante, cada secuencia de interés se puede considerar que consiste de un segmento de secuencia homólogo. Este caso limitante no es un caso preferido de la invención. Preferiblemente, dicha primera o dicha segunda secuencia de interés contiene una secuencia además de dicho segmento de secuencia homólogo. De manera más preferible, cada una de dicha primera y dicha segunda secuencia de interés contiene una secuencia además de dicho segmento de secuencia homólogo, en lo que dichas secuencias adicionales en dicha primera y dicha segunda secuencia de interés son diferentes.

La recombinación entre dichas regiones que se solapan (segmentos de secuencia homólogos) de los vectores puede tener lugar dentro del plastoma para formar dicha secuencia de interés. Dicha secuencia de interés preferiblemente comprende porciones de secuencia de dicha primera y de dicha segunda secuencia de interés. Si dicha primera y dicha segunda secuencia de interés contienen cada una un gen de interés, se puede formar una secuencia de integración que comprenda dos genes de interés. De esta manera, el procedimiento de la invención se puede utilizar para ensamblar una secuencia de integración deseada a partir de dicha primera y dicha segunda secuencia de interés. El ensamblado de la secuencia de integración se puede utilizar para generar en los plastidios una función nueva que no estaba presente en una de las secuencias de interés sola. Como un ejemplo, un gen de interés que consiste de una secuencia codificante y de varias secuencias reguladoras se puede ensamblar en una forma funcional en la secuencia de integración. Además, una secuencia codificante de interés en dicha primera secuencia de interés se puede combinar con un promotor u otras secuencias reguladoras provistas de dicha segunda secuencia de interés (o viceversa). De esta manera, una secuencia reguladora que da lugar a una expresión deseada de dicha secuencia codificante se puede seleccionar o rastrear.

Además, se puede ensamblar en dicha secuencia de integración una secuencia codificante para expresar una proteína de interés, a cuyo efecto dicha primera y dicha segunda secuencia de interés (y opcionalmente secuencias de interés adicionales de vectores posteriores) proporcionan, cada una, una parte de dicha secuencia codificante para dicha secuencia de integración. Se pueden utilizar intrones autoempalmantes para obtener el marco de lectura correcto de la proteína que se va a expresar a nivel de ARN mensajero.

El procedimiento de la invención puede comprender introducir una o más moléculas adicionales de ADN en dichos plastidios vegetales además de dicha primera y dicha segunda molécula de ADN. Dicha(s) molécula(s) de ADN adicional(es) comprende(n) una(s) secuencia(s) adicional(es) de interés. Si se introduce una tercera molécula de ADN, dicha tercera molécula de ADN preferiblemente contiene un segmento de secuencia homólogo a un segmento de secuencia de dicha primera secuencia de interés y un segmento de secuencia homólogo a dicha segunda secuencia de interés. Dicha tercera molécula de ADN preferiblemente no tiene una región homóloga para la integración del plastoma.

Después de la transformación, se seleccionan los transformantes que contienen la secuencia de integración deseada. La selección típicamente es soportada por un inhibidor o antibiótico frente al que los transformantes son resistentes debido a un gen marcador. La selección puede comprender además permitir la segregación de sectores transformados y no transformados (por ejemplo en las hojas). Los sectores transformantes o transformados se pueden identificar por análisis molecular, por ejemplo PCR y transferencia Southern. Además, los transformantes o sectores transformados se pueden identificar fenotípicamente, por ejemplo por la expresión de un transgen. Un transgen se puede detectar, por ejemplo, por transferencia Western, por una actividad enzimática característica o por otra propiedad característica como una propiedad óptica, en especial fluorescente.

Se puede introducir en un plastoma con dicha primera y dicha segunda secuencia de interés, un gen marcador para seleccionar transformantes.

Como se indica en lo anterior, dicha primera secuencia de interés pueden proporcionar un fragmento de un gen marcador a dicha secuencia de integración, y dicha segunda secuencia de interés puede proporcionar otro fragmento de dicho gen marcador, con lo que los fragmentos se combinan en un gen marcador funcional en dicha secuencia de integración. Preferiblemente, dicha primera secuencia de interés contiene una parte 5' de un gen marcador y dicha segunda secuencia de interés contiene una parte 3' de dicho gen marcador. Dicha secuencia de integración entonces puede contener dicho gen marcador de manera que pueda ser expresado. Esta realización permite la selección para integración de ambos vectores y la recombinación para formar dicha secuencia de integración.

En el proceso de la invención se pueden obtener plantas transgénicas o células vegetales seleccionables libres de marcador, diseñando dicha primera y dicha segunda secuencia de interés de dicha primera y dicha segunda molécula de ADN, respectivamente, de manera que el gen marcador seleccionable en la secuencia de integración está flanqueado por elementos de secuencia homólogos entre sí, para permitir la escisión del gen marcador por recombinación homóloga, de manera similar a lo descrito por Iamtham y Day (Nature Biotechnol. (2000) 18, 1172-1176. En esta realización, dicha primera secuencia de interés puede contener, en sentido ascendente de una parte 5' de dicho gen marcador, un elemento de secuencia homólogo a un elemento de secuencia que se localiza en sentido descendente de una parte 3' de dicho gen marcador en dicha segunda secuencia de interés, de manera que dichos elementos de secuencia permiten la escisión por recombinación homóloga de una parte de dicha secuencia de integración que comprende dicha parte 5' o dicha 3' del gen marcador. La escisión del gen marcador típicamente requiere la liberación de presión de selección dicho gen marcador contra el que se proporciona resistencia.

Cada una de dicha primera y dicha segunda secuencia de interés puede contener un gen marcador completo. No obstante, de manera preferible, dicha primera secuencia de interés puede contener dicha parte 5' de dicho gen marcador y dicha segunda secuencia de interés puede contener dicha parte 3' de dicho gen marcador, en tanto que ni dicha parte 5' ni dicha parte 3' es capaz de conferir resistencia en ausencia de dicha parte 3' o dicha parte 5', respectivamente. Como un ejemplo, dicha parte 5' puede ser: un promotor, secuencias 5' no traducidas y la secuencia codificante de dicho gen marcador. Dicha parte 3' puede ser: la secuencia codificante de dicho gen marcador y secuencias 3' no traducidas.

La invención proporciona una realización adicional que permite producir plantas transplastómicas libres de marcador. Esto se puede conseguir al incluir un gen marcador seleccionable en una de dichas moléculas de ADN fuera de una unidad de secuencia que consiste de dicha región homóloga a una región del plastoma y dicha secuencia de interés. Tal colocación de un gen marcador permite la pérdida de dicho gen marcador en el curso de los eventos de recombinación que tienen lugar. Se puede incluir un gen marcador seleccionable en dicha primera y dicha segunda molécula de ADN de la manera descrita, o en dicha primera y en dicha segunda molécula de ADN. Si se incluye un gen marcador seleccionable en dicha primera y en dicha segunda molécula de ADN, estos genes marcadores seleccionables pueden ser iguales o pueden ser genes marcadores seleccionables diferentes. La colocación de dicho gen marcador fuera de la unidad de secuencia resulta en la escisión del gen marcador del plastoma en el curso de los eventos de recombinación contemplados en esta invención, creando plantas transplastómicas susceptibles de ser libres de marcador. Es evidente para una persona experta en la técnica, que el inhibidor o el antibiótico, para el gen marcador utilizado se aplica únicamente de manera transitoria en la selección de la etapa (b). En una etapa posterior, se elimina del medio el antibiótico con el fin de permitir la pérdida del (de los) gen(es) marcador(es) por eventos de recombinación homóloga mediados por secuencias duplicadas, las cuales se han generado durante la integración del vector.

En una realización específica del procedimiento de producción de plantas transplastómicas sin marcador, un gen marcador seleccionable se divide en un primero y un segundo fragmento, con lo que dicho primer fragmento se incorpora en dicha primera molécula de ADN fuera de una primera unidad de secuencia, y dicho segundo fragmento se incorpora en dicha segunda molécula de ADN fuera de una segunda unidad de secuencia. Dicha primera unidad de secuencia consiste de dicha primera región homóloga y dicha primera secuencia de interés. Dicha segunda unidad de secuencia consiste de dicha segunda región homóloga y dicha segunda secuencia de interés.

El procedimiento de la invención se puede aplicar a todas las plantas. De manera preferible, se aplica a plantas multicelulares. De manera más preferible, el procedimiento de la invención se aplica a plantas de cultivo. Ejemplos de plantas de cultivo se proporcionan en las definiciones.

La invención proporciona además un kit de partes que comprende una primera y una segunda molécula de ADN como se definen en el presente documento. También se revela una molécula de ADN para transformación de plastidios que contiene una región homóloga a una región de un plastoma para dirigir la integración del plastoma, y una secuencia de interés. También se revela una biblioteca de moléculas de ADN como se define en el presente documento, por medio de la cual cada una de dichas moléculas de ADN contiene una secuencia diferente de interés. Tal biblioteca se puede generar al clonar una mezcla de secuencias de ADN de interés en un vector que contiene una región homóloga a una región de un plastoma para dirigir la integración del plastoma. La biblioteca se puede mantener al transformar las moléculas de ADN en células tales como células bacterianas (por ejemplo de *E. coli*) o vegetales. También se revelan plantas o células vegetales transformadas con dichas moléculas de ADN del kit de partes o con dicha molécula de ADN revelada. También se revelan células vegetales y plantas que se obtienen o que se pueden obtener por el procedimiento de la invención.

Ventajas del procedimiento de la invención

El procedimiento que aquí se describe se puede aplicar para introducir secuencias de interés tales como genes o elementos reguladores o para introducir mutaciones tales como mutaciones, inserciones o supresiones puntuales en el plastoma.

El procedimiento de la invención permite generar plantas transplastómicas, en tanto que se puede conseguir un estado homoplastómico después de menos ciclos de regeneración que con los procedimientos de la técnica anterior. Dependiendo de la realización particular, las plantas homoplastómicas se pueden obtener después de 0 a 4 ciclos de regeneración, preferiblemente después de 2 ciclos, y de manera más preferiblemente después de 1 ciclo de regeneración. En realizaciones especiales, el estado homoplastómico se obtiene en transformantes primarios sin un ciclo de regeneración. De esta manera, el procedimiento de la invención permite una reducción enorme en el tiempo necesario para obtener plantas transplastómicas homoplastómicas. Las razones para esta sorprendente mejora en la eficiencia actualmente no está clara. En comparación con la transformación convencional de plastidios, el método que aquí se describe es más rápido, debido a que son necesarias menos etapas para obtener plantas homoplastómicas.

El método permite el uso de vectores de transformación más pequeños para los cuales la clonación es más sencilla que en el caso de vectores de transformación de plastidios convencionales.

El método libera la transformación de plastidios de cualquier limitación respecto del número o tamaño de secuencias que se van a introducir, debido a que se puede utilizar una cantidad ilimitada de vectores de transformación con secuencias superpuestas.

Los métodos liberan la transformación de plastidios de cualquier limitación impuesta por secuencias que son tóxicas para las bacterias utilizadas para clonación, debido a que las secuencias tóxicas se pueden clonar en dos moléculas vectoras diferentes de manera tal que cada una de ellas no puede ser tóxica por separado, incluso si se expresan en una secuencia proteínica.

Además, el método aquí descrito permite el uso de bibliotecas de vectores combinatorios en donde los vectores de la biblioteca contienen secuencias diferentes de interés.

El método se puede aplicar para generar transformantes, en tanto que la planta final no presenta ningún gen marcador de resistencia.

Cualquiera de los aspectos mencionados en lo anterior de este método nuevo, ofrece una ventaja sustancial en comparación con la transformación convencional de plastidios. Tomados juntos, el procedimiento y los vectores de esta invención constituyen un enorme progreso tanto en la velocidad como en la capacidad de uso y flexibilidad de la transformación de plastidios en general.

Definiciones

3'-UTR: región transcrita pero no traducida de (->) gen, en sentido descendente de una (->) región codificante;

5'-UTR: región transcrita pero no traducida de un (->) gen, en sentido ascendente de una (->) región codificante; en (->) genes (->) de plastidios, el 5'-UTR contiene información de secuencia para inicio de traducción (sitio de unión de ribosomas, (->) RBS) cercano a su extremo 3' y;

aadA: (->) región codificante de una aminoglucósido adeniltransferasa bacteriana, una proteína utilizada frecuentemente, que destoxifica los antibióticos (->) inhibidores de selección espectinomicina o estreptomycinina;

aphA-6 (->) región codificante de una aminoglucósido fosfotransferasa bacteriana A-6, una proteína que destoxifica el (->) inhibidor de selección de antibiótico: canamicina;

cloroplasto: clorofila que contiene (->) plastidios;

región codificante: secuencia nucleotídica que contiene la información para: a) la secuencia de aminoácidos de un polipéptido, o b) los nucleótidos de un ARN funcional; las regiones codificantes opcionalmente están interrumpidas por uno o más (->) intrones;

flanco, región flanqueante: secuencias de ADN en los extremos 5' y 3' de los insertos en un (->) vector de (->) transformación de un (->) plastidio convencional, que median la integración en el (->) plastoma objetivo, de secuencias entre los flancos mediante (->) recombinación homóloga recíproca doble. Mediante el mismo mecanismo, se pueden modificar o eliminar secuencias del (->) plastoma objetivo. De esta manera, los flancos del (->) vector de (->) transformación del (->) plastidio determinan donde se generan cambios en el (->) plastoma objetivo por (->) transformación;

expresión de gen: procedimiento que convierte la información de secuencia en función; en (->) genes que codifican para polipéptidos, la expresión del gen requiere la actividad de un (->) promotor, el cual inicia y dirige la actividad

ES 2 311 116 T3

de ARN polimerasa, lo que lleva a la formación de un ARN mensajero, el cual posteriormente se traduce en un polipéptido; en los (->) genes que codifican para ARN, la actividad mediada por un (->) promotor del ARN polimerasa genera el ARN codificado;

5 *gen(es)*: secuencia(s) nucleotídica(s) que codifica(n) para todos los elementos que se requieren para asegurar la función, por ejemplo expresión independientemente; los genes están organizados en (->) operones, los cuales contienen por lo menos una (->) región codificante completa; en (->) genes que codifican para polipéptidos, estos elementos son: (1) un (->) promotor, (2) una región 5' no traducida (->) 5'-UTR), (3) una (->) región codificante completa, (4) una región 3' no traducida (->) 3'-UTR); en los (->) genes que codifican para ARN, faltan la 5'UTR y la (->) 3'-UTR; en (->) operones que consisten de más de una (->) región codificante, dos (->) regiones codificantes completas sub siguientes están separadas por un (->) separador y los elementos (->) promotor, (->) 5'-UTR y (->) 3'-UTR son compartidos por las (->) regiones codificantes de ese (->) operón; un fragmento de un gen carece total o parcialmente por lo menos uno de los elementos que se incluyen en la lista anterior de un gen.

15 *gen de interés*: secuencia modificada o introducida de nuevas: el propósito de un intento de (->) transformación;

genoma: secuencia completa de ADN del núcleo de una célula o de un organelo celular;

GFP: proteína fluorescente verde

20 *recombinación homóloga*: procedimiento que conduce a un intercambio, inserción o supresión de secuencias debido a la presencia de uno o más (->) flancos con homología de secuencia suficiente para un sitio objetivo en un (->) genoma;

25 *intrón*: secuencia que interrumpe una (->) región codificante;

operón: estructura organizacional de varios (->) genes que comparten un promotor;

30 *planta(s)*: organismo(s) que contiene(n) (->) plastidios en sus células; esta invención se refiere particularmente a (->) plantas multicelulares; estas incluyen el grupo de las gimnospermas (tales como coníferas, abetos y pinos, etcétera) y angiospermas (tales como *monocotiledonias*, como cultivos de maíz, trigo, cebada, arroz, centeno, Triticale, sorgo, caña de azúcar, espárragos, ajos, árboles de palma, etcétera y *monocotiledonias* que no son de cultivo así como cultivos de dicotiledonias de tabaco, patata, tomate, colza, remolacha de azúcar, calabaza, pepino, melón, pimiento, especies cítricas, berenjena, uva, girasol, frijol de soya, alfalfa, algodón, etcétera) y dicotiledonias que no son cultivo así como helechos, agrimonia, musgos y algas verdes, rojas y pardas multicelulares;

35 *plastidio(s)*: organelo(s) con su(s) propia(s) maquinaria(s) genética(s) en células (->) vegetales que se presenta(n) en diversas formas funcional y morfológicamente diferente(s), por ejemplo aminoplastos, (->) cloroplastos, cromoplastos, etioplastos, gerontoplastos, leucoplastos, proplastidios, etcétera;

40 *plastoma*: secuencia completa de ADN del (->) plastidio;

promotor: secuencia nucleotídica funcional para iniciar y regular la transcripción;

45 *RBS, sitio de unión ribosómico*: elemento de secuencia de ADN en sentido ascendente del (->) codón de inicio de traducción de una (->) región codificante, que media en la unión de ribosomas y el inicio de la traducción desde el transcrito de ARN respectivo; los elementos RBS son parte de los (->) 5'-UTR o de los (->) separadores;

50 *inhibidor de selección*: compuesto químico que reduce el crecimiento y desarrollo de células no transformadas o de organelos más fuertes que el de los transformados;

55 *secuencia de interés*: secuencia modificada o introducida de nuevas, de cualquier longitud: el propósito de un intento de (->) transformación; si la introducción de una secuencia no se pretende, la longitud de la secuencia de interés puede ser cero, es decir, puede ser de interés no tener una secuencia de interés. En la presente invención, una secuencia de interés de una molécula de ADN utilizada como vector tiene por lo menos un segmento de secuencia homólogo a un segmento de secuencia de otra molécula de ADN utilizada como vector.

60 *vector de transformación*: molécula de ADN clonada que se genera para mediar la (->) transformación de un (->) genoma;

transformación: procedimiento que lleva a la introducción, la escisión o la modificación de las secuencias de ADN por tratamiento de (->) plantas o de células vegetales que incluyen el uso de por lo menos un (->) vector de transformación;

65 *transgen*: secuencia de ADN derivada de un (->) genoma, introducida en otro;

uidA: (->) región codificante de la β -glucuronidasa bacteriana, una proteína indicadora utilizada con frecuencia.

Descripción breve de las figuras

Figura 1 Esquema simplificado de los eventos de recombinación en la transformación convencional de plastidios: la integración de las secuencias vectoras de transformación en el plastoma tiene lugar mediante dos eventos de recombinación homólogos mediados por dos flancos homólogos. La región de tipo silvestre correspondiente del plastoma se transfiere al vector plasmídico.

Figura 2 Modelo sugerido de eventos de recombinación en la transformación plastídica convencional basado en nuestras observaciones: la primera recombinación homóloga vía el flanco izquierdo o derecho conduce a una inserción transitoria (reversible) de la totalidad del vector de transformación generando una duplicación de la secuencia flanqueante respectiva. Una segunda recombinación homóloga vía el flanco derecho o izquierdo, respectivamente, conduce a la escisión de las secuencias duplicadas. La región de tipo silvestre correspondiente del plastoma se transfiere al vector plasmídico.

Figura 3 Análisis por PCR de transformantes de tabaco transformados con pKCZ después de hasta tres ciclos de regeneración (ejemplo de referencia). Gel A (ciclo 0), Gel B (ciclo I), Gel C (ciclo II) y Gel D (ciclo III) muestran los productos que se obtienen utilizando los cebadores oSH58 y oSH58 los cuales son específicos para detectar la integración completa de pKCZ. Gel E ilustra que con la combinación de cebador oFCH60 y oSH58 todos los tipos de líneas del ciclo III aún contienen el cassette de selección *aadA* aunque no todos presentan eventos de inserción de vector completo (véase ejemplo 1).

Figura 4 Modelo sugerido de eventos de recombinación mediante la utilización de vectores modulares, de acuerdo con la invención (vector 1 y vector 2). La primera etapa de integración se muestra ya sea para el vector 1 o el vector 2. La segunda etapa de integración siguiente se muestra únicamente para el vector 1 (a la derecha) en la región de plastoma que ya contiene el vector 2. La segunda etapa de integración del vector 2 en la región del plastoma que ya contiene el vector 1 (no mostrada) procede de una manera análoga. Después de integración de vector completa de ambos vectores, el plastoma transformado final (parte inferior) se obtiene por eventos de eliminación de elementos repetitivos homólogos.

Figura 5 Esquema que presenta la región homóloga del vector 1 (hpr 1) y del vector 2 (hpr 2) para dirigir la integración del plastoma por recombinación homóloga. hpr indica región de plastoma homóloga. Además se muestra la secuencia de interés en ambos vectores (rectángulos blancos mas rectángulos con diagonales verticales). Las casillas con trazos verticales (denominados olr por región de superposición) representan un segmento de secuencia de dicha primera secuencia de interés (soi) que es homóloga a un segmento de secuencia de dicha segunda secuencia de interés (soi). Estos segmentos de secuencia homólogos o regiones superpuestas permiten la recombinación del vector 2 y del vector 1 en el plastoma. Dentro de las secuencias de interés, los segmentos de secuencia homólogos preferiblemente se colocan distalmente de las secuencias hpr. En la parte inferior, se muestra el transplastoma obtenido que contiene la secuencia de integración.

Figura 6 Esquema que muestra el uso de un vector adicional (vector 3) además del primer y segundo vector de la invención. El vector 3 no necesita contener una región homóloga para integración en el plastoma. El vector 3 tiene dos segmentos homólogos o regiones superpuestas (casillas con trazos verticales). Una región superpuesta (olr1) comparte homología con un segmento de la secuencia homóloga del vector 1. La otra región superpuesta (olr2) comparte homología con un segmento de secuencia homólogo del vector 2. olr1 y olr2 preferiblemente no son idénticos. hpr, región de plastoma homóloga; soi, secuencia de interés; olr, región superpuesta.

Figura 7 Esquema que muestra la producción de plantas transplastómicas sin marcador. El vector 2 contiene un gen marcador seleccionable fuera de la unidad de secuencia que consiste de la región homóloga y la secuencia de interés. La integración del vector 1 y del vector 2 conduce al transplastoma después de inserción del vector 1 y 2, que se puede seleccionar al aplicar de manera transitoria el antibiótico adecuado. La recombinación a través de los elementos duplicados genera la escisión de las secuencias que incluyen un gen marcador; hpr, región de plastoma homólogo; soi, secuencia de interés; olr, región de superposición.

Figura 8 Vector de transformación plastídico convencional pKCZ. *aadA*, aminoglucósido adeniltransferasa; INSL, secuencia de plastoma para *N. tabacum* de pares de bases 131106-132277; INSR, secuencia de plastoma de *N. tabacum* de los pares de bases 132278-133396; AP^r, β -lactamasa.

Figura 9 Vector de transformación de plastidio modular pICF742. *aadA*, secuencia codificante para aminoglucósido adeniltransferasa; LpsbA, 5'UTR del gen psbA de *N. tabacum*; PrpI32, promotor del gen rpI32 de *N. tabacum*; INSR, secuencia de plastoma de *N. tabacum* de los pares de bases 132279-133390; AP^r, β -lactamasa.

Figura 10 Vector de transformación de plastidio modular pICF743. *aadA* secuencia codificante para aminoglucósido adeniltransferasa; T α , terminador de operón α de *E. coli*; INSL, secuencia de plastoma de *N. tabacum* de pares de bases 131106-132277; AP^r, β -lactamasa.

Figura 11 Sitios de unión de cebador para análisis por PCR de transformantes de tabaco a partir de la cotransformación de pICF742 y pICF743. A, par cebador A; B, par cebador B; C, par cebador C.

Figura 12 Análisis por PCR de transformantes de tabaco a partir de la cotransformación de pICF742 y pICF743. 1, línea 1; 2, línea 2, A, par cebador A; B, par cebador B; C, par cebador C; los tres carriles de la izquierda, control sin ADN.

Figura 13 Transferencia Southern de transformantes de tabaco a partir de la cotransformación de pICF742 y de pICF743. A y C, restricción con Bsp 120I; B, restricción con AccIII. 1-5, línea 1-5; M, carril marcador (desde la parte superior; 10 kb, 8 kb, 6 kb, 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2.5 kb, 1.5 kb, 1 kb); WT, control de tipo silvestre.

Figura 14 Vector de transformación plasmídico pICF986 basado en la traducción modular. aadA His Tag, amino-glucósido adeniltransferasa con C terminal His Tag; INSL, secuencia de plastoma de *N. tabacum* complementaria a los pares de bases 534 a pares de bases 1336; INSR, secuencia de plastoma de *N. tabacum* complementaria a los pares de bases 155370 a pares de bases 533; AP^r, β -lactamasa; T7G10 sitio de unión ribosómico del gen 10 del fago T7; RBS, sitio de unión ribosómico sintético; uidA, β -glucuronidasa.

Figura 15 Vector de transformación plasmídico pICF1033 basado en la traducción modular. INSL, secuencia de plastoma de *N. tabacum* complementaria a pares de bases 534 a pares de bases 1336; AP^r, β -lactamasa; T7G10, sitio de unión ribosómico del gen 10 del fago T7; uidA (fragmento N), secuencia que codifica para la parte N terminal de 373 aminoácidos de β -glucuronidasa.

Figura 16 Vector de transformación plasmídico pICF1034 basado en la traducción modular. aadA His Tag, amino-glucósido adeniltransferasa con C terminal His Tag; INSR, secuencia de plastoma de *N. tabacum* complementaria a los pares de bases y 155370 a pares de bases 533; AP^r, β -lactamasa; T7G10, sitio de unión ribosómico del gen 10 del fago T7; RBS, sitio de unión ribosómico sintético; uidA, β -glucuronidasa.

Descripción detallada y realizaciones preferidas

Cuando se utilicen vectores de transformación plasmídicos convencionales se requieren un gran número de ciclos de regeneración para obtener transformantes homoplasmáticos.

Los vectores de transformación de plástidos convencionales habitualmente contienen una secuencia de integración la cual no está presente en la planta de tipo silvestre, y que contiene un gen marcador seleccionable, un(o) gen(es) de interés y elementos reguladores tales como promotores, 5'-UTR, 3'-UTR o elementos separadores. En el vector, la secuencia de integración está flanqueada por dos secuencias homólogas al plastoma objetivo y de esta manera dirigen la posición de la integración del plastoma. La inserción de la región de integración dentro del plastoma objetivo se obtiene por eventos de recombinación homóloga recíproca doble. Un modelo simplificado sugiere que la integración se produce a través de dos eventos de recombinación homólogos, un evento en cada flanco (figura 1). No obstante, el procedimiento molecular real es difícil de monitorizar y puede involucrar intermediarios más complejos. Los datos experimentales obtenidos en nuestro laboratorio sugieren que un primer evento de recombinación mediado por uno de los dos flancos lleva a la integración del vector de transformación completo y, por lo tanto duplica la secuencia flanqueante (figura 2). De hecho, la integración del vector plasmídico circular completo se puede demostrar por PCR y análisis de hibridación Southern (figura 3). En un punto diferente en el tiempo, un segundo evento de recombinación puede causar una inversión de la primera integración. De manera alternativa, una segunda recombinación entre otras dos secuencias flanqueantes duplicadas provoca la escisión tanto de la estructura principal plasmídica como de los fragmentos duplicados lo que genera la integración de la secuencia en el plastoma (figura 2).

Utilizando los vectores de transformación de plastidios convencionales, se requieren varios meses para obtener transformantes de plastidios homoplasmáticos debido a que son necesarios hasta 5 ciclos de regeneración. Se requiere un determinado número de generaciones de células para convertir las células heteroplasmáticas en células homoplasmáticas por segregación. La segregación en la configuración deseada de los plastomas es impulsada por aplicación de condiciones selectivas.

Los vectores de esta invención no contienen más de una región homóloga

En contraste con los métodos convencionales de transformación de plastidios, esta invención describe un procedimiento para producir plantas o células vegetales transplastómicas, en el cual se introducen por lo menos dos tipos diferentes de moléculas de ADN (por ejemplo, vectores de transformación) en los plastidios, de manera preferible simultáneamente. Una región homóloga para dirigir la integración del plastoma es suficiente para cada uno de los vectores, preferiblemente cada vector no contiene más de una región homóloga para dirigir la integración del plastoma. Además, cada vector contiene una secuencia de interés que preferiblemente no está presente en la planta de tipo silvestre. Las secuencias de interés de tales vectores resultarán en una secuencia de integración en la planta transplastómica que se obtenga.

La secuencia de integración puede contener genes extraños tales como un gen marcador u otras secuencias de interés. El gen marcador puede ser un gen que confiera resistencia contra un inhibidor, tal como un gen de resistencia a antibiótico aphA-6 o un gen de resistencia a herbicida como *bar* o un gen marcador visible como GFP.

Ejemplos de otras secuencias de interés son cualquier gen que codifique o que sea capaz de expresar una proteína útil como proinsulina, interferón, albúmina sérica bovina, factores de crecimiento humanos, péptidos que funcionen como vacunas (tales como una vacuna contra hepatitis B) o genes para enzimas técnicas. No obstante, la secuencia de integración a generar, también puede consistir de una eliminación de secuencias de plastidios, por ejemplo con el fin de generar mutantes específicos.

En el procedimiento de la invención se liberan en el plastidio por lo menos dos molécula de ADN (por ejemplo vectores), de las que cada uno contiene una región homóloga que define el sitio de integración del plastoma. Preferiblemente, dicha primera o dicha segunda molécula de ADN no tiene más de una región homóloga para dirigir la integración del plastoma. De manera más preferible, ni dicha primera ni dicha segunda molécula de ADN tiene más de una región homóloga para dirigir la integración del plastoma. Esto no excluye el uso de elementos en las secuencias de interés que tengan homología a secuencias de plastoma, como promotores o elementos reguladores u otras secuencias de plastidios. Si tales elementos homólogos a las secuencias de plastidios se utilizan en una secuencia de interés, en principio también pueden actuar como secuencias de integración de plastoma, lo que genera eventos de integración no deseados. Tales eventos de integración no deseados en muchos casos pueden no ser problemáticos, por ejemplo, si no generan transformantes estables o transformantes que se puedan seleccionar por el marcador seleccionable utilizado. Además, los transformantes no deseados se pueden detectar por análisis molecular, por ejemplo de la secuencia de integración.

Los elementos homólogos a las secuencias de plastidios preferiblemente son significativamente más cortos que las regiones homólogas para integración del plastoma. Esta medida generalmente consigue una frecuencia de recombinación significativamente menor para dichos elementos homólogos que para dichas regiones homólogas. De manera alternativa, tales elementos homólogos a las secuencias de plastidios preferiblemente se toman de secuencias de plastoma que se localizan alejadas del sitio de integración deseado de la molécula de ADN para impedir eventos de recombinación no deseados.

Las al menos dos moléculas de vector diferentes son liberadas simultáneamente o en dos o más etapas de transformación diferentes. La transformación simultánea de por lo menos dos tipos de moléculas se denomina cotransformación. Después de la cotransformación de por lo menos dos moléculas vector, los primeros regenerados que contienen plastidios con la modificación deseada del plastoma aparecen después de aproximadamente 3 semanas de cultivo bajo condiciones adecuadas de selección y cultivo, dependiendo del método de transformación aplicado. El método de cotransformación se puede utilizar con cualquier método de transformación que sea adecuado para la generación de transformantes de plastidios. Ejemplos de métodos de transformación de plastidios adecuados son la transformación biolística, la transformación mediada por PEG, otros métodos de transfección que utilizan agentes químicos o la tranfección de ácidos nucleicos mediada por campo eléctrico.

De manera alternativa, por lo menos dos moléculas vectoras se pueden aplicar en etapas de transformación separadas. La transformación consecutiva por al menos dos etapas de transformación conduce a los mismos resultados de integración observados durante la cotransformación.

Si se utiliza un tercer vector además de dicha primera y dichas segunda molécula de ADN, el tercer vector no necesita contener secuencia homóloga alguna derivada del plastoma objetivo, siempre y cuando las secuencias de interés de los vectores contengan una región de superposición suficiente para recombinación. Lo mismo es válido si se utilizan más de tres vectores.

Los fragmentos del gen marcador se pueden ubicar en vectores diferentes, en tanto que el gen marcador se ensambla por procedimientos de recombinación.

Los vectores de esta invención permiten la generación de plantas homoplastómicas en un tiempo muy breve

De manera sorprendente se ha encontrado que utilizando el método que aquí se describe, es posible recuperar transformantes de plastidios homoplastómicos después de sólo dos ciclos de regeneración. Preferiblemente, incluso es suficiente un ciclo de regeneración. En muchos casos, los regenerados recuperados después de transformación del tejido vegetal o de las células vegetales, son homoplastómicos incluso sin que se lleve a cabo ciclo de regeneración alguno. En contraste con los vectores de transformación de plastidios convencionales, es posible obtener plantas homoplastómicas después de un período muy corto de únicamente varias semanas. Por lo tanto, la invención que aquí se describe ofrece una enorme aceleración del procedimiento y una reducción notable del trabajo que se necesita para cultivo de tejido.

Los transformantes homoplastómicos no contienen ningún plastoma de tipo silvestre. La presencia de plastomas de tipo silvestre se puede supervisar por métodos tales como hibridación Southern o análisis por PCR. En el material vegetal transplastómico recuperado de regenerados primarios que aparecen después de transformación de tejido o células vegetales, se realizó un análisis Southern de rutina para identificar plastomas recombinantes y para detectar los plastomas de tipo silvestre remanentes. 40% del material analizado de este regenerado primario no contiene ningún plastoma de tipo silvestre remanente. Los plastomas de tipo silvestre se pudieron eliminar de los otros regenerados en únicamente una etapa de subcultivo, mientras que se necesitan hasta 5 ciclos de subcultivo utilizando vectores de transformación convencionales.

En la figura 4 se describe un mecanismo hipotético para la introducción de secuencias extrañas de acuerdo con esta invención. De acuerdo con este modelo, una de las dos moléculas vectoras que contiene una región homóloga se recombina con la secuencia de plastoma respectiva. El evento de recombinación homóloga genera la integración del vector completo que incluye la estructura principal plasmídica. También conduce a una duplicación de la región homóloga. Este procedimiento es reversible y puede resultar en la escisión de la secuencia recombinante por recombinación homóloga mediada por las regiones homólogas duplicadas, a menos que el procedimiento se establezca por otro evento de integración. Si la secuencia de integración contiene un gen marcador seleccionable que se puede expresar, el vector tenderá a permanecer integrado si se aplica presión selectiva. En ausencia de presión selectiva alguna, el plastoma con un vector integrado es altamente inestable. No obstante, un segundo evento de recombinación puede generar la integración de por lo menos otra molécula. Si la otra molécula contiene otra región homóloga, se puede producir una recombinación con la región homóloga respectiva del plastoma. De manera alternativa, también es posible que la recombinación esté mediada por cualquier otra secuencia repetida tal como la estructura principal del vector o la región de superposición de las moléculas. El segundo evento de recombinación se puede presentar entre el primer vector libre y el segundo vector integrado (que se muestra en la figura 4) o entre el segundo vector libre y el primer vector integrado (que no se muestra en la figura 4) o entre el primer vector integrado y el segundo vector integrado que se localizan en moléculas de plastoma diferentes (que no se muestran en la figura 4). Las moléculas de vector que no contienen una región de plastidio homóloga, se pueden recombinar únicamente con las otras secuencias repetidas. En cualquiera de los casos, aparecerá una integración de la totalidad de la segunda molécula vector. En los casos en donde se utilizan más de dos moléculas vector, la totalidad de las moléculas se integrarán por una de las regiones homólogas. Después de la integración de las diferentes moléculas en el plastoma, es posible una amplia serie de recombinaciones intramoleculares secundarias entre cualquiera de las secuencias repetidas. Como consecuencia, se eliminará la totalidad de las regiones repetidas. El resultado final de estos diversos eventos de recombinación es la generación de una región recombinante continua identificada como secuencia de integración.

Los vectores de esta invención se pueden utilizar en un enfoque combinatorio

La expresión en plastidios es útil para una amplia gama de propósitos diferentes que varían desde la composición nutriente modificada hasta expresión de un alto nivel de sustancias farmacéuticas en plantas. Para ese propósito, es necesario obtener un conjunto de promotores intercambiables y elementos reguladores que difieren tanto en potencia como en patrón de expresión. Esto permite construir vectores de expresión para propósitos diferentes (expresión débil, fuerte, constitutiva o regulada, etcétera). Los elementos deberían ser intercambiables para modificar el nivel de expresión. Para muchos casos es favorable utilizar promotores, 5'-UTR y 3'-UTR de diferentes genes debido a que esto excluye las recombinaciones internas en donde el gen insertado se intercambia con un gen endógeno por medio de los 5' y 3'-UTR. Por otra parte, algunas veces los 5' y 3'-UTR interactúan y juntos determinan actividades de traducción. Por lo tanto, no siempre es posible calcular el efecto de una combinación particular. Los vectores modulares de esta invención que contienen únicamente los elementos reguladores 5' ó 3', permiten una manera fácil y rápida de combinar diferentes elementos reguladores y de esta manera generar el cassette de expresión deseado en la secuencia de integración. Los vectores con diferentes elementos se pueden mantener en bibliotecas y se pueden combinar a voluntad. Además, si no se conoce la combinación óptima de diferentes elementos, se puede utilizar para la transformación una mezcla de diferentes elementos reguladores en diferentes vectores. El cassette de expresión con las propiedades deseadas después se obtiene por selección el transformante con las propiedades deseadas, opcionalmente seguido por análisis molecular.

Los vectores de esta invención evitan el trabajo de clonación excesivo

Los vectores de transformación de plastidios convencionales habitualmente contienen un gen marcador seleccionable necesario para la selección de los transformantes, uno o más genes de interés y elementos reguladores tales como promotores, 5'-UTR, 3'-UTR o elementos separadores. Se necesita un esfuerzo sustancial para generar estos plásmidos altamente complejos que consisten de muchos elementos diferentes. No obstante, en diferentes vectores de transformación se utilizan muchos elementos idénticos. Utilizando el método de esta invención es posible construir un vector que contenga estos elementos idénticos, tal como una región homóloga, un gen marcador de selección y elementos reguladores, en una molécula. El al menos otro vector de transformación presenta las secuencias diferentes de interés que se van a introducir en el plastoma. La combinación de la primera molécula vectora con cualquier otro vector adecuado que contenga cualquiera de las secuencias deseadas, reduce la complejidad de los plásmidos y, en consecuencia, el esfuerzo para construir estas moléculas.

Los vectores de esta invención son más pequeños que los vectores de transformación de plastidios convencionales y por lo tanto permiten la inserción de más secuencias de interés

La construcción de vectores de transformación con frecuencia está limitada por limitaciones de tamaño de inserto. Los vectores de transformación convencionales de plastidios habitualmente contienen dos regiones homólogas, un marcador seleccionable y elementos reguladores. Por lo tanto se puede introducir sólo un número limitado de secuencias adicionales. No obstante, puede ser deseable diseñar por ingeniería vías metabólicas complejas en los plastidios, que dependan de la expresión de varias enzimas diferentes. Dado que los vectores de la invención contienen menos secuencias obligatorias en comparación con los vectores convencionales, es posible insertar secuencias de interés más

grandes. Además, se pueden utilizar más de dos vectores de transformación con regiones superpuestas con el fin de introducir secuencias de integración incluso más grandes que se ensamblan en los plastidios.

- 5 *Los vectores de esta invención evitan los problemas derivados de los efectos tóxicos de algunas secuencias sobre las bacterias que se utilizan para clonación*

La ingeniería genética puede utilizar el potencial de las plantas como fábricas autorreproducibles para la producción de una gran cantidad de sustancias orgánicas. Se ha demostrado que la producción económica y ambientalmente amigable de sustancias, enzimas, elementos de diagnóstico y terapéuticos en las plantas es posible.

No obstante, en algunos casos los genes que se van a introducir en las plantas pueden tener efectos tóxicos sobre las bacterias utilizadas para clonación. En estos casos, se limita la construcción del vector de transformación. Un ejemplo de una secuencia que tiene efectos tóxicos sobre las bacterias es el gen HbsAg que codifica para el antígeno de superficie del virus de hepatitis B. La expresión del gen en plastidios vegetales sería ser deseable, debido a que constituye una fuente para una vacuna, por ejemplo contra la hepatitis. No obstante, la clonación del gen completo que incluye a los elementos reguladores utilizados en vectores de transformación convencionales está limitado debido a que los elementos reguladores del plastidios también están activos en la bacteria. Utilizando los vectores de esta invención es posible dividir el cassette de expresión completo de un gen como HbsAg entre dos moléculas de manera tal que ninguno de los vectores contenga por sí solo, un cassette expresable. Utilizando dicho enfoque, los efectos limitantes de los genes tóxicos para bacterias se superan.

- 25 *Los vectores de esta invención permiten la generación de plantas sin marcadores de resistencia*

Un método para obtener transformantes de plastidios los cuales carecen de genes marcadores de resistencia resulta altamente deseable con el fin de evitar dispersión no deseada del gen marcador al ambiente. Los vectores de transformación de plastidios convencionales habitualmente contienen un gen marcador de resistencia adecuado el cual es necesario para la selección de los transformantes. El marcador de resistencia se encuentra en la secuencia de integración del vector de transformación y conduce a una integración de plastoma estable del gen de resistencia en la planta final.

Utilizando los procedimientos y vectores que se describen en esta invención es posible colocar tales genes marcadores de resistencia fuera de la unidad de secuencia que consiste de la región homóloga y la secuencia de interés. Después de la transformación se produce una integración del vector de transformación completo (figura 2) lo que genera la inserción transitoria del marcador de selección en el plastoma. El evento de recombinación genera una duplicación de la región homóloga. Durante esta etapa, las células transformadas se pueden seleccionar sobre un medio que contenga el inhibidor apropiado. Tan pronto como el material vegetal se transfiere a medios sin inhibidor, se libera la presión selectiva para el mantenimiento de la integración del vector completo. Los eventos de recombinación adicionales (como se describen en la figura 4) mediados por las regiones homólogas duplicadas generadas previamente llevan a una escisión del gen marcador de selección. En consecuencia, la planta final no presenta el gen marcador de resistencia para selección de los transformantes.

El gen marcador de resistencia también se puede dividir en dos o más fragmentos que se superponen, cada uno localizado en un vector diferente, con lo que la resistencia es mediada únicamente si los fragmentos se recombinan hasta el gen marcador expresable completo.

En algunas realizaciones de la invención, se puede utilizar el empalme de intrones para procesar un transcrito primario para obtener un transcrito secundario deseado, por ejemplo para la traducción correcta de una proteína de interés. Para este propósito, una parte 5' de un intrón se puede incluir en la primera secuencia de interés, y una parte 3' de un intrón se puede incluir en la segunda secuencia de interés (o viceversa), con lo que se forma un intrón funcional ante la conformación de la secuencia de integración y la transcripción en plastidios. Tales partes de intrón 5' y 3' se pueden derivar de un intrón natural o de derivados del mismo. Los intrones autoempalmantes como los intrones del grupo I y del grupo II tienen la capacidad de empalmarse a sí mismos fuera del pre-ARNm. Ambos intrones, tanto del grupo I como del grupo II, son capaces de empalmarse (que incluyen el empalme trans) en sistemas artificiales (Been *et al.*, 1986, *Cell*, 47, 207-216; Jacquier *et al.*, 1986, *Science*, 234, 1099-1194; Jarrell *et al.*, 1988, *Mol. Cell Biol.* 8, 2361-2366). El empalme trans también se encuentra para intrones del grupo II en genes divididos de cloroplastos (Kohchi *et al.*, 1988, *Nucl. Acids Res.*, 16, 10025-10036) y para un intrón del grupo I en un gen dividido artificial en *Escherichia coli* (Galloway-Salvo *et al.*, 1990, *J. Mol. Biol.*, 211, 537-549). Los intrones del grupo I fueron descubiertos por primera vez en el ARNr de *Tetrahymena thermophila* (Cech, T.R., 1990, *Annu. Rev. Biochem.*, 59, 543-568). Requieren una U en la secuencia objetivo inmediatamente 5' al sitio de escisión y unen 4-6 nucleótidos en el lado 5' del sitio de escisión. Existen más de 75 miembros conocidos de este grupo hasta ahora. Se encuentran también en mitocondrias tanto de hongos como de plantas (Richard & Dujon, 1997, *Curr. Genet.*, 32, 175-181; Cho *et al.*, 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 14244-14249), cloroplastos (Turmel *et al.* 1993, *J. Mol. Biol.* 232, 446-46), fago T4 (Galloway *et al.*, 1990, *J. Mol. Biol.*, 211, 537-549), algas verdiazules u otros organismos. Las ribozimas sometidas a ingeniería en base a los intrones de *Tetrahymena* del grupo I (documento de E.U.A. 6,015,794; Ayre *et al.*, 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 3507-3512) o el empalme trans mediado por intrón del grupo II (Mikheeva & Jarrell, 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 7486-7490; E.U.A. 5,498,531) se pueden utilizar para la presente invención.

ES 2 311 116 T3

Ahora se describirán con detalle realizaciones preferidas de la invención.

Realización 1

Cotransformación de dos vectores

Los plastidios se transforman simultáneamente con dicha primera y dicha segunda molécula de ADN denominadas como vectores modulares (figura 5). El vector 1 (dicha primera molécula de ADN) contiene una región homóloga a una región de plastoma (dicha primera región homóloga). La integración de las secuencias de interés se debería producirse en sentido descendente de esta región de plastoma. La región homóloga típicamente tiene una longitud de 500 a 1000 pares de bases. Si se desea, también se pueden utilizar secuencias más cortas o más grandes. En el vector 1, la primera secuencia de interés se localiza en sentido descendente de esta región homóloga. La parte en sentido ascendente de la secuencia de integración está contenida en la primera secuencia de interés en sentido descendente de esta región homóloga.

El vector 2 (dicha segunda molécula de ADN) contiene una región homóloga a una región de plastoma (dicha segunda región homóloga). La integración de secuencias de interés debería producirse en sentido ascendente de esta región de plastoma. Esta región homóloga típicamente también tiene una longitud de 500 a 1000 pares de bases. En el vector 2, la segunda secuencia de interés se localiza en sentido ascendente de esta región homóloga. La parte en sentido descendente de la secuencia de integración está contenida en la segunda secuencia de interés, en sentido ascendente de esta región homóloga.

En esta realización preferida, las dos regiones homólogas de los dos vectores están presentes una al lado de la otra sobre el plastoma sin secuencias intermedias. Un segmento de secuencia de la región en sentido descendente de la primera secuencia de interés en el vector 1 es homólogo a un segmento de secuencia de la región en sentido ascendente de la segunda secuencia de interés en el vector 2. Este segmento de secuencia homólogo también se denomina como región de superposición. Típicamente, este segmento de secuencia homólogo tiene una longitud de 500 a 1000 pares de bases. Después de los eventos de recombinación descritos en la invención, la cotransformación de los dos vectores resulta en una secuencia de integración continua integrada entre las dos regiones de plastoma utilizadas como regiones homólogas. Típicamente, cada vector únicamente contiene una parte de la secuencia de integración.

Se ha demostrado que la recombinación también se produce con regiones homólogas más grandes o más cortas, pero una longitud de 500 a 1000 pares de bases es suficiente para recombinación eficaz y se puede amplificar fácilmente con procedimientos estándar de PCR.

El gen marcador para seleccionar transformantes se puede ubicar como dos fragmentos sobre los dos vectores, es decir, un fragmento sobre cada vector. El gen marcador se puede dividir en dos fragmentos de diversas maneras. Los ejemplos no limitantes para dicha división son:

a) El promotor y el 5'-UTR se localizan sobre el vector 1. La secuencia codificante se localiza sobre la región de superposición del vector 1 y el vector 2. El 3'-UTR se localiza sobre el vector 2.

b) El promotor 5'-UTR y la parte 5' de la secuencia codificante se localizan sobre el vector 1. La parte media de la secuencia codificante se localiza sobre la región superpuesta del vector 1 y del vector 2. La parte 3' de la secuencia codificante y 3'-UTR se localizan sobre el vector 2.

Si las regiones homóloga sobre los vectores se seleccionan de manera que la integración de la secuencia se integra en una región de plastoma transcrita por un promotor endógeno, no es necesario incluir un promotor en la parte frontal del gen marcador. Además del gen marcador, se puede(n) incluir un(os) gen(es) adicional(es) de interés en las secuencias de interés del vector 1 o del vector 2 o en ambas.

Realización 2

Cotransformación de genes fragmentados en dos vectores

Dado que los plastidios y las bacterias tienen sistemas de expresión similares, algunas veces es difícil o incluso imposible clonar vectores de transformación de plastidios en *E. coli* si los genes están involucrados en los productos génicos en los cuales son tóxicos para *E. coli*. Este problema se resuelve al dividirse tal gen en dos o más fragmentos, como se describe para el gen marcador en la realización 1. Sobre cada vector, el gen tóxico está presente como un gen incompleto o un fragmento que no es tóxico. Los plastidios después se transforman simultáneamente con dos vectores modulares, como se describe en la realización 1, después de lo cual el gen funcional de interés completo se reensambla dentro de los plastidios.

Realización 3

Cotransformación de 3 vectores

5 Para algunos propósitos resulta ventajoso distribuir una secuencia de integración necesaria para una transformación estable de un plastidio en 3 vectores (figura 6). Ejemplos no limitantes son: inserción de secuencias de integración muy largas (grupos de genes), construcción en serie de vectores de transformación, etcétera.

10 El vector 1 contiene una primera región homóloga a la región de plastoma y una primera secuencia de interés en sentido descendente de la misma. La integración de la secuencia de integración debería tener lugar en sentido descendente de esta región de plastoma. En sentido descendente de la primera región homóloga, la parte en sentido ascendente de la secuencia de integración está presente en la primera secuencia de interés.

15 El vector 2 contiene una segunda región homóloga a la región de plastoma y una segunda secuencia de interés. La integración de la secuencia de integración debería tener lugar en sentido ascendente de esta región de plastoma. En sentido ascendente de esta región homóloga, la parte en sentido descendente de la secuencia de integración se presenta en la segunda secuencia de interés. Como se describe para la realización 1, las secuencias homóloga típicamente tienen una longitud de 500 a 1000 pares de bases, pero no se limitan a esta longitud.

20 El vector 3 contiene una tercera secuencia de interés, la parte en sentido ascendente del cual es homóloga a la secuencia de interés del vector 1 y la parte en sentido descendente es homóloga a una secuencia de interés del vector 2. El vector 3 puede o no contener la secuencia de integración completa la cual se puede integrar en el plastoma.

Realización 4

25 *Plantas transplastómicas sin marcador seleccionable*

Si el gen marcador seleccionable se localiza fuera de la región diseñada para integración, el gen marcador estará presente en los intermediarios de integración de vector completo (figura 7). Cuando se libera la presión de selección, el gen marcador es escisionado junto con las secuencias vectoras. Las secuencias de plastidios homólogas y las secuencias de interés se distribuyen como se describe en la realización 1. Contrariamente a la realización 1, el gen marcador no se incluye en la secuencia de interés. En vez de esto, se localiza en otra parte sobre el vector 1 o el vector 2. Preferiblemente, el gen marcador se separa de la unidad que consiste de la región homóloga y la secuencia de interés, por medio de secuencias vectoras. Preferiblemente, el vector 1 y el vector 2 contienen cada uno un gen marcador de esta manera, siendo estos genes marcadores diferentes, por ejemplo aadA y aphA6. La selección después se lleva a cabo mediante la utilización de una combinación de los dos antibióticos respectivos, por ejemplo 500 mg/l de espectinomycin + 25 mg/l de canamicina. De manera alternativa, un fragmento de un gen marcador se localiza en el vector 1 y el otro fragmento del gen marcador se localiza en el vector 2, por lo que ambos fragmentos están fuera de la unidad definida en lo anterior. Entonces es un pre-requisito que ambos fragmentos compartan un segmento homólogo (una región de superposición) que permita la recombinación de ambos fragmentos para ensamblar un gen marcador funcional completo después de la inserción de ambos vectores en el plastoma. Dado que únicamente una fracción de los posibles eventos de recombinación proporciona un marcador funcional, la presión de selección mantiene a los intermediarios que contienen el marcador funcional. Cuando se retira la presión de selección, el gen marcador junto con las secuencias de vector remanentes se retirarán por recombinación debido a las secuencias vectoras repetitivas.

Realización 5

45 *Plantas transplastómicas sin marcador seleccionable*

50 Las plantas sin marcador de resistencia se pueden obtener mediante la utilización de vectores modulares los cuales contienen un elemento 5' de frecuencia homólogo del gen marcador de resistencia sobre la primera molécula de ADN y 3' del gen marcador de resistencia sobre la segunda molécula de ADN, mientras que el gen marcador de resistencia o un fragmento del mismo está presente sobre dicha primera y dicha segunda moléculas de ADN. Después de los eventos de recombinación que se describen en la figura 4, el gen marcador de resistencia flanqueado por dos elementos de secuencia homólogos se inserta dentro del plastoma. La presencia del marcador de selección en la secuencia de inserción se puede mantener por presión selectiva. Cuando el material vegetal se transfiere a un medio sin inhibidor, se libera la presión selectiva para el mantenimiento del gen marcador de resistencia. Un evento de recombinación adicional mediado por los dos elementos de secuencia homólogos puede generar la escisión del gen marcador de selección. En consecuencia, la planta final no presenta el gen marcador de resistencia utilizado para la selección de los transformantes.

65 El procedimiento de la invención preferiblemente se lleva a cabo con plantas de cultivo las cuales incluyen gimnospermas (tales como pino, abeto, picea, etcétera) y angiospermas. Las angiospermas son más preferidas. Las angiospermas incluyen plantas monocotiledonias como maíz, trigo, cebada, arroz, centeno, tritical, sorgo, caña de azúcar, espárrago, ajo, árboles de palma, etcétera y plantas dicotiledonia como tabaco, patata, tomate, colza, remolacha de azúcar, calabaza, pepino, melón, pimiento, especies cítricas, berenjenas, uvas, girasol, frijol de soya, alfalfa, algodón, etcétera, las más preferidas son las solanaceas (por ejemplo patata, tomate, pimiento, berenjena y tabaco).

Ejemplos

Los métodos de biología molecular utilizados en esta invención son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, por Sambrook *et al.* (1989) molecular cloning y por Ausubel *et al.* (1999) Short protocols in Molecular Biology.

Ejemplo 1

10 *Análisis por PCR de la integración del vector completo (vía un flanco) en el genoma del plastidio*

Transformación del Plastidio con el vector pKCZ

El vector pKCZ es un vector de transformación de plastidio convencional en el que el marcador de selección se clona entre los dos flancos utilizados para recombinación homóloga. El vector es diseñado para realizar una inserción neutra entre *trnR* y *trnN* en la región repetida invertida del genoma del plastidio de tabaco (Zou, 2001). El vector pKCZ comprende dos secuencias flanqueantes para recombinación homóloga (que corresponden a las secuencias de plastoma de *Nicotiana tabacum* 31106-132277 y 132278-133396, de acuerdo con GenBank número de acceso Z00044) y un cassette de expresión de plastidio *aadA* bajo el control del promotor de ARNr 16s (koop *et al.*, 1996). En la figura 8 se muestra un dibujo esquemático del constructo del plásmido.

Generación de transformantes primarios y selección subsecuente para líneas homoplastómicas

La transformación del plastidio mediada por pistola de partículas y la selección subsecuente se llevaron a cabo como se describe en Mühlbauer *et al.*, 2002. La selección de transformantes se basó en la resistencia a los antibióticos espectinomycin/estreptomycin, conferida por el producto del gen *aadA*. Con el fin de amplificar los genomas transformados de plastidio y eliminar los genomas de tipo silvestre, los transformantes primarios (ciclo-0) se sometieron a varias rondas adicionales de regeneración (para explantes de hojas pequeñas) en medio selectivo que contiene espectinomycin (aquí denominado como ciclo-I, ciclo-II, etc).

Análisis de transformantes primarios por PCR

Los transformantes de plastidios (ciclo-0) se identificaron por PCR utilizando ADN total aislado con el equipo DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Alemania). Para determinar la presencia del gen *aadA*, se utilizaron los cebadores oSH81 (5'-CTATCAGAGGTAGTTGGCGTC-3') y oFCH60 (5'-CACTACATTTGCTCATCGCC-3'). El programa de PCR era el siguiente: 3 min a 94°C, 1 ciclo; 45 seg a 94°C, 45 seg a 55°C, 2 min a 72°C, 30 ciclos; extensión final a 72°C durante 10 min. Los resultados muestran que las 48 líneas de 54 analizadas (6 hojas bombardeadas) proporcionaron el producto de amplificación esperado de 504 pares de bases. Para demostrar la integración completa del cassette *aadA* dentro del plastoma del tabaco se utilizaron los cebadores oSH58 (5'-TATTCCGACTTCCCCAGAGC-3') y oFCH60 (5'-CACTACATTTGCTCATCGCC-3'). El cebador oSH58 se localiza fuera (hacia el extremo 5') el flanco derecho de pKCZ en el plastoma del tabaco y en combinación con oFCH60 únicamente puede proporcionar el producto esperado de 2106 pares de bases ante la integración del cassette de expresión *aadA* entre *trnR* y *trnN* en la secuencia repetida invertida. El programa de PCR fue como sigue: 5 min a 94°C, 1 ciclo; 45 seg a 94°C, 45 seg a 55°C, 3.5 min a 72°C, 35 ciclos; extensión final a 72°C durante 7 min. La totalidad de las 48 líneas positivas por PCR para *aadA* mostraron el producto esperado de *aadA* en el flanco derecho de 2106 pares de bases.

Se seleccionan para análisis adicional 10 de los transformantes de ciclo-0 (1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 2:1, 2:4, 2:5 2:6 y 2:7).

Análisis por PCR de los transformantes que contienen vectores completamente integrados

Normalmente, se considera que la producción de transformantes de plastidios estables se produce vía dos eventos de recombinación simultáneos que se producen entre los flancos izquierdo y derecho de la molécula transformante del plastoma (como se muestra en la figura 1). En la figura 2 se presenta un mecanismo alternativo. Aquí, la integración completa del vector ocurre primero, vía recombinación con un flanco únicamente (ya sea izquierdo y derecho) con el plastoma, lo que resulta en la generación de un intermediario inestable hipotético. Los eventos de recombinación adicionales subsiguientes después se pueden llevar a cabo entre los flancos duplicados en esta molécula para generar o una situación de tipo silvestre o un cassette de *aadA* integrado de manera estable. Con el fin de probar esta posibilidad, se realizó PCR utilizando los cebadores oSH3 (5'-GGCATCAGAGCAGATTG-3') y Osh58 (5'-TATTCCGACTTCCC CAGAGC-3'). El cebador oSH3 se localiza dentro de la estructura principal del vector de pKCZ (pUC18) y el cebador oSH58 se localiza fuera (en sentido descendente) del flanco derecho de pKCZ en el plastoma del tabaco. Un producto de 2638 pares de bases únicamente se puede obtener con estos dos cebadores cuando se ha producido la integración completa de pKCZ, como se muestra en la figura 2. No se obtendrá ningún producto de PCR del tamaño esperado a partir del fragmento de plastoma tipo silvestre (que comprende los flancos izquierdo y derecho), dado que está ausente el sitio de unión para oSH3. El programa de PCR fue como sigue: 5 min a 94°C, 1 ciclo; 45 seg a 94°C, 45 seg a 55°C, 3.5 min a 72°C, 35 ciclos; extensión final a 72°C durante 7 min. Nueve de los 10 transformantes de ciclo-0 analizados mostraron un producto de PCR de 2,6 kb, lo cual sería consistente con la integración completa de pKCZ en el genoma del plastidio dentro de estas líneas (figura 3A). No se observó ningún producto del tamaño correcto en el control de tipo

silvestre o en la muestra 1:1. Dado que la integración de pKCZ resulta en la formación de un intermediario inestable, cabe esperar que con un incremento adicional en el tiempo, los eventos de recombinación entre los flancos duplicados en esta molécula llevarán ya sea a una situación de tipo silvestre o a un cassette *aadA* integrado de manera estable. Como tales, se analizaron muestras de ADN preparadas a partir del material vegetal del ciclo-I y ciclo-II mediante PCR con los cebadores oSH3 y oSH58. Si el modelo que se presenta en la figura 2 es correcto, la probabilidad de amplificar la banda de 2638 pares de bases con los cebadores oSH3 y oSH58 se debería reducir con cada ciclo de regeneración en la selección. Los resultados sugieren que de hecho este es el caso, dado que únicamente 5 de las 10 líneas de ciclo-I analizadas proporcionaron un producto PCR fuerte del tamaño esperado (figura 3B). Además, en el ciclo-II, el número de líneas que muestran amplificación clara de la banda esperada de 2638 pares de bases se redujo aún más.

El modelo que se presenta en la figura 2 también muestra que la totalidad de las líneas de ciclo-II las cuales son negativas para la integración completa del vector, aún así deberían mostrar señales de PCR consistentes con un cassette *aadA* integrado de manera estable a los rearrreglos moleculares descritos previamente. Para demostrar la integración del cassette *aadA* dentro de los cebadores del plastoma del tabaco se utilizaron los cebadores oSH58 (5'-TATTCCGACTTCCCCAGAGC-3') y Ofch60 (5'-cactacattcgctcatcgcc-3'). El programa de PCR fue como sigue: 5 min a 94°C, 1 ciclo; 45 seg a 94°C, 45 seg a 55°C, 3.5 min a 72°C, 35 ciclos; extensión final a 72°C durante 7 min. La totalidad de los 10 transformantes de ciclo-II mostró el producto esperado *aadA* en el flanco derecho de 2106 pares de bases (figura 3D) lo cual puede concordar con el escenario que se muestra en la figura 2.

Ejemplo 2

Construcción de vectores moleculares superpuestos

El vector modular pICF742 (figura 9) comprende la región flanqueante derecha homóloga al plastoma de tabaco, el promotor rpl32 de tabaco, el psbA-5'-UTR de tabaco y el gen marcado *aadA*.

La región flanqueante derecha se amplifica a partir del ADN de plastidio para tabaco (pares de base 132279 a 133390 del plastoma de *N. tabaco*) con cebadores modificantes 5'-TGGAGCTCGAATTGCCGCGAGCAAAGAT ATTAATG-3' y 5'-TACGAATCAAGAGAAGGTCACGGCGAGAC-3', que introducen un sitio de reconocimiento SacI en el extremo 5' y un sitio de reconocimiento EcoRI en el extremo 3'. El producto de PCR se purificó y digirió con SacI y EcoRI y se ligó en el plásmido pUC18 el cual se digirió con las mismas enzimas. El promotor rpl32 se amplificó a partir del ADN del plastidio de tabaco (pares de bases 113917 a pares de bases 114055 del plastoma de *N. tabaco*) con los cebadores de modificación 5'-GACCCTGCAGGCAAAAATCTCAAATAGCC-3' y 5'-CGGGATCCGATTTTCTTTAGACTTTCGG-3', que introducen un sitio de reconocimiento de PstI en el extremo 5' y un sitio de reconocimiento BamHI en el extremo 3'. El producto de PCR se reamplificó con cebadores modificantes 5'-CGGGATCCGATTTTCTTTAGACTTTCGG-3' y 5'-CGAGCTCCGCGGTGGCGGCCCCGTCGACCCTGCAGG CAAAAATCTC-3' para introducir un sitio de clonación múltiple nuevo que contenía un sitio de reconocimiento SacI en el extremo 5'. El producto resultante de PCR se digirió con BamHI y SacI y se ligó en un vector pUC18 limitado de manera similar, que contenía la región flanqueante derecha. El psbA-5'-UTR se amplificó a partir del ADN de plastidio de tabaco (complementario a las pares de bases 1598 -pares de bases 1680 plastoma de *N. tabaco*) con cebadores modificantes 5'-CGGGATCCAAAAAGCCTTCCATTTTCTATTT-3' y 5'-TTGCAGCCATGGTAAAATCTTGTT TATT-3' que introdujeron un sitio de reconocimiento BamHI en el extremo 5' y un sitio de reconocimiento NcoI en el extremo 3'. El producto de PCR se digirió con NcoI y BamHI. La secuencia de *aadA* de *E. coli* se amplificó del plásmido pFaadAII (Koop *et al.*, 1996) con el cebador modificante 5'-TGAATTCCCGGCTCGTGAAGCGG-3' y 5'-GGTGATGATGATCCTTGCCAACTACCTTAGTGATCTC-3' que introduce un sitio de reconocimiento NcoI en el extremo 5'. El producto de PCR se re-amplificó con los cebadores 5'-TGAATTCCCATGGCTCGTGAAGCGG-3' y 5'-GCTCTAGATTAGTGATGATGGTGATGATCCTTGCC-3' para introducir una etiqueta His y un sitio de reconocimiento XbaI en el extremo 3'. El producto PCR se digirió con NcoI y XbaI. El vector pUC 18 que contenía la región flanqueante derecha y el promotor rpl32 se digirió con BamHI y XbaI y se ligo con psbA-5'-UTR digerido y el *aadA* digerido. El plásmido resultante se digirió con XbaI y NdeI para separar el sitio de multiclonación pUC18 remanente. El plásmido digerido se purificó en un gel de agarosa. Se extrajo la banda de 4600 pares de bases, se purificó y los extremos se rellenaron con polimerasa Klenow. El plásmido después se volvió a ligar, lo que resultó en pICF742. El vector modular pICF743 (figura 10) comprende la región flanqueante izquierda homóloga al plastoma del tabaco, el terminador de operon α de *E. coli* y el gen marcador *aadA*.

El sitio de multiclonación de pUC18 entre PaeI y SapI se eliminó y se sustituyó por un sitio de multiclonación nuevo consistente (desde 5' hasta 3') de BamHI, KpnI, XbaI y NcoI. La región flanqueante izquierda se amplificó a partir del ADN del plastidio del tabaco (pares de bases 131106 a pares de bases 132277 del plastoma de *N. tabaco*) con cebadores modificantes 5'-GATGGATCCTTGCTGTTGCATCGAAAGAG-3' y 5'-CACTGGTACCCGGGAATTGT GACCTCTCGGGAGAATC-3', que introdujeron un sitio de reconocimiento BamHI en el extremo 5' y un sitio de reconocimiento KpnI en el extremo 3'. El producto de PCR se purificó y digirió con BamHI y KpnI y se ligó en el plásmido pUC18 con un sitio de multiclonación nuevo, el cual se digirió con las mismas enzimas. El plásmido resultante se digirió con KpnI y XbaI. El vector digerido se ligó con el oligonucleótido de cadena sencilla 5'-GATGTCTAGAAG CAACGTAAAAAACCCGCCCGGGGTTTTTATACCCGTAGTATCCCCAGCGGCCGCGGTAC-3', que codifica para el terminador de operon α de *E. coli*. La cadena complementaria se rellenó con polimerasa Taq, se digirió con XbaI y se volvió a ligar. El vector resultante se digirió con NcoI y XbaI y se ligó con el producto de PCR de *aadA* desde pICF742, lo que resultó en el vector pICF743.

ES 2 311 116 T3

Se mezclaron 12.5 µg del vector pICF742 y 12.5 µg del vector pICF743, se cargaron en partículas de oro y se transformaron en plastidios de *N. tabaco* mediante bombardeo por partículas como se describe en Mühlbauer *et al.*, 2002. La selección de transformantes se basó en la resistencia a los antibióticos espectinomina/estreptomicina, conferida por el producto del gen *aadA*. Con el fin de amplificar los genomas de plastidio transformados y de eliminar los genomas de tipo silvestre, los transformantes primarios (ciclo-0) se sometieron a varias rondas adicionales de regeneración (a partir de explantes de hojas pequeñas) sobre medio selectivo que contenía espectinomina (aquí designado como ciclo-I, ciclo-II etc). Se analizaron dos callos resistentes a espectinomina/estreptomicina del ciclo-0 mediante PCR para verificar la transformación. Se utilizaron tres pares de cebadores diferentes (figura 11):

A) 5'-CAGACTAATACCAATCCAAGCC-3' (unión fuera la región flanqueante izquierda en el plastoma de *N. tabaco*) y 5'-CTATCAGAGGTAGTTGGCGTC-3' (unión en el gen marcador).

B) 5'-CACTACATTTTCGCTCATCGCC-3' (unión en el gen marcador) y 5'-TATTCCGACTTCCCCAGAGC-3' (unión fuera de la región flanqueante derecha en el plastoma de *N. tabaco*)

C) 5'-CATCAATACCTCGGTCTAG-3' (unión en la región flanqueante izquierda) y 5'-ACACATAGATATGCCC GGTC-3' (unión en la región flanqueante derecha).

La prueba de PCR mostró amplificados con la totalidad de los tres cebadores, lo que demuestra la integración de ambos vectores que resulta en una región integrada continua (figura 12). Los tamaños amplificados calculados son de 2139 pares de bases (A), 2035 pares de bases (B) y 1450 pares de bases (C) lo que coincide bien con los tamaños observados. De manera notable, no es visible una señal de tipo silvestre (290 pares de bases) con el par cebador C, lo que indica que incluso en dicha etapa temprana no está presente el material no transformado.

Después se analizaron 5 callos resistentes a espectinomina/estreptomicina a partir del ciclo-0 y ciclo-I en tres experimentos de transferencia Southern independientes (figura 13). Dos líneas mostraron la presencia de únicamente el gen *aadA* integrado correcto completo (línea 1 y línea 3: 3.8 kb para restricción de Bsp120I y 6.7 kb para restricción AccIII). Una línea (línea 2) mostró el gen *aadA* integrado y una señal adicional (4.9 kb para la restricción Bsp120I y 3.5 kb para la restricción AccIII) que corresponde a una recombinación intermedia. Dos líneas (línea 4 y línea 5) mostraron la señal de recombinación intermedia (4.9 kb para la restricción Bsp120I) y la señal de tipo silvestre (2.6 kb para la restricción Bsp120I). Este resultado indica que dos de las 5 líneas analizadas alcanzaron el estado de integración plasmídico dentro de un tiempo muy corto.

Ejemplo 3

Construcción de vectores basados en traducción modular superpuestos

Los vectores basados en traducción no contienen elementos promotores propios sino que se basan en elementos promotores endógenos del plastoma en sentido ascendente del sitio de integración deseado.

Este ejemplo presenta dos vectores modulares (pICF1033 y pICF1034) los cuales combinados sustituyen a un vector basado en traducción (pICF986) el cual no pudo ser construido pese a varios intentos, debido al alto nivel de expresión en *E. coli*. El sitio de unión ribosómico (T7G10) utilizado, media la expresión alta en plastidios así como en *E. coli*. Aunque los vectores no contienen elementos promotores de plastidio, la región flanqueante izquierda necesaria para recombinación homóloga contiene elementos de secuencia los cuales tienen actividad promotora en *E. coli*.

Contrario a pICF986 (figura 14), los dos vectores modulares pICF1033 (figura 15) y pICF1034 (figura 16) se pudieron construir sin problemas. Dado que el vector modular que contiene la región flanqueante izquierda (pICF1033) no contiene el gen completo que se va a expresar, este vector modular evita la expresión elevada problemática en *E. coli*.

El vector modular pICF1033 contiene la región homóloga flanqueante izquierda para el plastoma de tabaco, el sitio de unión ribosómico del gen 10 del fago T7 y la parte N-terminal del gen indicador *uidA*.

La región flanqueante izquierda se amplificó a partir del ADN del plastidio de tabaco (complementario a los pares de bases 534 a las pares de bases 1336 del plastoma de *N. tabaco*) con cebadores modificantes 5'-TATAGGGCCC AGCTATAGGTTTACATTTTACCC-3' y 5'-GTCCTGCAGTTATCCATTTGTAGATGGAGCTTCG-3', introduciendo un sitio de reconocimiento Bsp120I en el extremo 5' y un sitio de reconocimiento PstI en el extremo 3'. El producto de PCR se purificó y digirió con Bsp120I y PstI y se ligó en el vector pICF5001, el cual se digirió con las mismas enzimas. El plásmido pICF5001 es un derivado de pUC18 que contiene el sitio de clonación múltiple modificado 5'-GAATTCGGGCGCCGTCGACCCTGCAGGCCCCGGGGATCCATATGCCATGGTCTAGATGATCATCATCACCATC ATCACTAATCTAGAGAGCTCCTCGAGGCGCGCGGTACCATGCATGCAAGCTT-3'. La ligación resulta en un pICF5001 que alberga la región flanqueante izquierda. El sitio de unión ribosómico del gen 10 del fago T7 y una etiqueta de fusión N terminal que mejora la actividad de traducción se introduce al insertar la secuencia nucleotídica sintética 5'-CTGCAGGATCCTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGTAATAATTTGTTAACTTTAAGAAG GAGATATACATATGGCTAGCATTTCCATGG-3' entre el sitio PstI y NcoI de pICF5001 que alberga a la región flanqueante izquierda. El vector resultante se digirió con NcoI y HindIII. El fragmento N-terminal de *uidA* se ampli-

ficó a partir del ADN de *E. coli* con cebadores modificantes 5'-CATGCCATGGTCCGTCCTGTAGAA-3' y 5'-GC CAAGCTTGTACAGTTCTTTTCGGCTTGTGCCC-3', que introdujeron un sitio de reconocimiento NcoI en el extremo 5' y un sitio de reconocimiento HindIII en el extremo 3'. El producto de PCR se purificó y digirió con NcoI y HindIII. El producto de PCR después se insertó en el vector, se digirió con las mismas enzimas, lo que resultó en pICF1033.

El vector modular pICF1034 contiene el sitio de unión ribosómico del gen 10 del fago T7, el gen indicador *uidA* completo, un segundo sitio de unión ribosómico sintético, el gen marcador *aadA* y la región flanqueante derecha.

El sitio de unión ribosómico del gen 10 del fago T7 se introdujo en pICF5001 como se describe en lo anterior. Se utilizaron los cebadores modificantes 5'-CATGCCATGGTCCGTCCTGTAGAA-3' y 5'-CTGGGTACCT TATTGTTTGCCTCCCTGCTGCG-3' para amplificar al gen *uidA* completo, mientras que se introducía un sitio de reconocimiento NcoI en el extremo 5' y un sitio de reconocimiento KpnI en el extremo 3'. El producto de PCR se digirió con NcoI y KpnI y se ligó en el vector que contiene el sitio de unión ribosómico T7, y se digirió con las mismas enzimas. La secuencia *aadA* de *E. coli* se amplificó a partir del plásmido pFaadAII (COP *et al.*, 1996) con los cebadores modificantes 5'-GGATCCATGCGTGAAGCGGTTATCGCCG-3' y 5'-GGTGATGATGATCCTTGC CAACTACCTTAGTGATCTC-3'. El producto de PCR se volvió a amplificar con los cebadores modificantes 5'-GGGGTACCAGTTGTAGGGAGGGATCCATGCGTGAAGC-3' y 5'-GCTCTAGATTAGTGATGATGGTGATGAT GATCCTTGCC-3' para introducir una etiqueta His y un sitio de reconocimiento XbaI en el extremo 3' y un sitio de unión ribosómico sintético en el sitio de reconocimiento KpnI en el extremo 5'. El producto de PCR se purificó y digirió con KpnI y XbaI. La región flanqueante derecha se amplificó a partir del ADN del plastidio de tabaco (complementario a las pares de bases 155370 hasta las pares de bases 533 del plastoma para *N. tabaco*) con el cebador modificante 5'-CTAATCTAGAGAGCTCGTCTATAGGAGGTTTTGAAAAG-3' que incluía un sitio de reconocimiento XbaI en el extremo 5' y el cebador exacto 5'-CCAGAAAGAAGTATGCTTTGG-3', que se unió detrás de un sitio de restricción HindIII en el plastoma de tabaco. El producto de PCR se purificó y digirió con XbaI y HindIII. El vector que contenía el sitio de unión ribosómico T7 y el gen para *uidA* se digirieron con KpnI y HindIII y después se ligaron con los dos productos de PCR (digeridos con KpnI/XbaI resp. XbaI/HindIII), lo que resultó en el vector pICF1034.

Se mezclaron 12.5 µg del vector pICF1033 y 12.5 µg del vector pICF1034, se cargaron en partículas de oro y se transformaron en plastidios de *N. tabaco* mediante bombardeo de partículas, como se describe en Mühlbauer *et al.*, 2002. La selección de transformantes se basó en la resistencia a los antibióticos espectinomicina/estreptomicina, conferida por el producto del gen *aadA*. Con el fin de amplificar los genomas de los plastidios transformados y para eliminar los genomas de tipo silvestre, los transformantes primarios (ciclo-0) se sometieron a varias rondas adicionales de regeneración (a partir de explantes de hojas pequeñas) sobre medios selectivos que contenían espectinomicina (aquí designado como ciclo-I, ciclo-II etc). La integración correcta de ambos vectores que resultó en región integrada continúa dentro del plastoma de tabaco que se confirmó mediante PCR.

Ejemplo 4

Transformación de plastidios de Solanum tuberosum utilizando vectores modulares

Además del tabaco, el sistema de vector modular también se puede utilizar con otras especies de cultivos importantes. Este ejemplo ilustra la transformación eficaz de plastidios en la patata (*Solanum tuberosum*), posterior al bombardeo con partículas de microcolonias derivadas de protoplastos utilizando los vectores que se describen en el ejemplo 2. Debido al alto grado de homología entre los plastomas de tabaco y patata, los vectores que contienen secuencias flanqueantes de tabaco también se pueden utilizar para tabaco.

Se cultivaron *in vitro* plantas de *S. tuberosum*, variedad Walli, como cultivos de brotes estériles (20±1°C, 16 h al día, intensidad de luz de 75 ± 10 µmoles/m²/seg). Cultivos nuevos fueron iniciado cada 2 meses transfiriendo las puntas de los brotes (aproximadamente 2 cm de largo) a un medio MS (Murashige and Skoog, 1962) en tubos de vidrio (2.5 x 20 cm). De las plantas de 3-4 semanas de edad, se seleccionaron las hojas jóvenes completamente expandidas y se utilizaron para el aislamiento de protoplastos. Las hojas se cortaron en tiras de 1 mm con un bisturí y se preplasmolisaron en 10 ml de medio MMM-550. El medio MMM-550 contiene 4.066 g/l de MgCl₂·6H₂O, 1.952 g/l de ácido 2-(N-morfolino)etansulfónico (MES) y ~86 g/l de manitol (ajustado a 550 mOsm y pH 5.8). Después de 1 hora de incubación en la oscuridad, el MMM-550 se eliminó y se sustituyó con 10 ml de medio MMS-550 que contiene 0.4% de p/v Macerozyme R10 y 0.4% de Cellulase R10. El medio MMS-550 contiene 4.066 g/l de MgCl₂·6H₂O, 1.952 g/l de MES y ~150 g/l de sacarosa (ajustado a 550 mOsm y pH 5.8). Los explantes de hoja en solución de enzimas se incubaron durante 16 horas en la oscuridad a 25°C, sin agitación. Al siguiente día, la digestión se filtró a través de tamiz de 100 µm en un tubo de centrífugo, y después se recubrió cuidadosamente con 2 ml de medio MMM-550 y se centrifugó (10 min, 70 X g). Los protoplastos intactos se recolectaron de la banda en la interfase y se lavaron una vez mediante resuspensión en 10 ml de medio de cultivo de protoplasto de patata seguido por centrifugación (10 min, 59xg). El medio de cultivo de protoplasto contiene 133.75 mg/l de NH₄Cl, 950 mg/l de KNO₃, 220 mg/l de CaCl₂·2H₂O, 185 mg/l de MgSO₄·7H₂O, 85 mg/l de KH₂PO₄, microelementos B5 (Gamborg *et al.* 1968), MS Fe-EDTA (Murashige and Skoog, 1962), 100 mg/l de mio-inositol, 100 mg/l de glutamina, 100 mg/l de hidrolizado de caseína, 1 mg/l de ácido nicotínico, 10 mg/l de clorhidrato de tiamina, 1 mg/l de clorhidrato de piridoxina, 250 mg/l de xilosa, 975 mg/l de MES, 2 mg/l de ácido naftalenacético (NAA), 02. mg/l de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 0.5 mg/l de 6-bencilaminopurina (BAP) y ~94 g/l de glucosa (ajustado a 550 mOsm y

pH 5.8). Los protoplastos se contaron y resuspendieron a 2x de la densidad de siembra en placa final requerida en medio de cultivo de protoplastos ($2.0 \times 10^5/\text{ml}$) y se mezclaron con un volumen igual de 1.2% p/v de ácido algínico preparado en medio MMM-550. El cultivo de la capa de alginato delgada en rejillas de polipropileno se realizó como se describe en Dovzhenko *et al* (1998). Después de la solidificación de la matriz de alginato, las rejillas se cultivaron en placas de petri de 5 cm que contenían 2 ml de medio de cultivo de protoplastos. Los protoplastos se incubaron durante un día en la oscuridad ($26 \pm 1^\circ\text{C}$) y después se transfirieron a un cultivo estándar en condiciones ambientales para desarrollo adicional ($26 \pm 1^\circ\text{C}$, 16 h de día intensidad de luz $75 \pm 10 \mu\text{moles}/\text{m}^2/\text{seg}$).

De 12 a 15 días después de remojar las rejillas que contenían microcolonias de patatas (aproximadamente 8 células) se transfirieron a cajas de 9 cm que contenían medios SH-1 solidificado con Gelrite 0.4% p/v. El medio SH-1 contiene 267.5 mg/l de NH_4Cl , 1900 mg/l de KNO_3 , 440 mg/l de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 370 mg/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 170 mg/l de KH_2PO_4 , microelementos MS y Fe-EDTA (Murashige and Skoog, 1962), vitaminas Nitsch (Nitsch and Nitsch, 1969), 40 mg/l de sulfato de adenina, 100 mg/l de hidrolizado de caseína, 975 mg/l de MES, 0.1 mg/l de NAA, 05 mg/l de BAP, 10 mg/l de sacarosa y 50 g/l de manitol (ajustado a pH 5.8). Dos días después de realizar el recubrimiento sobre el medio sólido, se bombardeó a las colonias derivadas de protoplastos con alícuotas de oro cargadas con 12.5 μg de vector pICF742 y 12.5 μg de vector pICF743 utilizando las condiciones de recubrimiento con partículas y bombardeo descritas en Mühlbauer *et al.* (2002). La construcción de los vectores modulares pICF742 y pICF743 han sido descrita previamente (ejemplo 2). La selección de transformantes se basó en la resistencia al antibiótico espectinomicina, conferida por el producto del gen *aadA*. Un día después del bombardeo, las rejillas se transfirieron a recipientes que contenían medio SH-1 solidificado con Gelrite + 500 mg/l de espectinomicina y se subcultivaron cada 3 semanas a placa de selección nuevas. Los plastidios transformantes se observaron como microcolonias verdes después de 8-12 semanas de selección (los tejidos no transformados se blanquearon en medio SH-1 que contenía espectinomicina). Se transfirieron colonias individuales (aproximadamente 1 mm de diámetro) a recipientes de 5 cm que contenían medio SH-1 + 100 mg/l de espectinomicina. Para la generación de los callos (de aproximadamente 5 mm de diámetro) se transfirieron a medio SH-2 solidificado con Gelrite 0.4% p/v que contenían 100 mg/l de espectinomicina. El medio SH-2 es idéntico al medio SH-1 (véase antes), excepto que el NAA se sustituye por 0.1 mg/l de ácido indol-3-acético (IAA), BAP se sustituye por 1 mg/l de zeatina y el contenido de manitol se reduce de 50 g/l a 36 g/l. Los brotes se retiraron de los callos regeneradores después de 6-8 semanas de cultivo en medio SH-2 y estos se transfirieron a medio Ms libre de antibiótico para la generación de raíces y desarrollo posterior.

Los brotes de patata resistente a espectinomicina se analizaron por PCR para verificar la transformación correcta de los plastidios. Se utilizaron tres pares de cebadores diferentes como se describe para el análisis de transformantes de tabaco (ejemplo 2):

A) 5'-CAGACTAATACCAATCCAAGCC-3' (unión fuera la región flanqueante izquierda dentro del plastoma de *S. tuberosum*) y 5'-CTATCAGAGGTAGTTGGCGTC-3' (unión dentro del gen marcador *aadA*).

B) 5'-CACTACATTTGCTCATCGCC-3' (unión en el gen marcador *aadA*) y 5'-TATTCCGACTTCCCCAGAGC-3' (unión fuera de la región flanqueante derecha dentro del plastoma de *S. tuberosum*)

C) 5'-CATCAATACCTCGGTCTAG-3' (unión dentro de la región flanqueante izquierda) y 5'-ACACATAGTATGCCGGTGC-3' (unión dentro de la región flanqueante derecha).

La integración correcta de ambos vectores resultante en una región integrada continúa dentro del plastoma de patata se demostró mediante PCR utilizando tres pares de los cebadores antes descritos.

Referencias

- Koop *et al.*, 1996, *Planta* 199, 193-201 [0120]
- Galvin S. B., 1998, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 9, 227-232.
- Dovzhenko, A. Bergen, U & Koop, HU Thin-alginate-layer technique for protoplast culture of tobacco leaf protoplasts; shoot formation in less than two weeks. *Protoplasma* 204, 114-118 (1998).
- Galvin S.B., 1998, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 9, 227-232.
- Gamborg, O.L., Miller, R.A. & Ojima, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell. Res.* 50, 151-158 (1968).
- Gray M. W., Origin and Evolution of Plastid Genomes and Genes, in: Bogorad L. and Vasil I. [0122] K. (eds.), Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Volumen 7A, *Academic Press*, San Diego, 1991.
- Heifetz, P., 2000, *Biochimie*, 82, 655-666.

ES 2 311 116 T3

Huang F.-C., Klaus S., Herz S., Koop H-U., Golds T., 2002, MGG, in press. lamtham and Day, 2000, *Nat. Biotechnol.*, 18, 1172-1176.

Nitsch, J.P. y Nitsch, C., Haploid plants from pollen grains, *Science* 169, 85 (1969).

Marechal-Drouard L., Kuntz M., Weil J. N., tRNAs and tRNA Genes of Plastids, en: Bogorad L. and Vasil I. K. (eds.), Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Volume 7A, *Academic Press*, San Diego, 1991.

Mühlbauer S., Lössl A., Tzekova L, Zhou Z., Koop N.-U., 2002, *Plant J.* 32, 175-184 (2002).

Murashige, T. & Skoog, F.A., A revised medium for rapid growth and bisassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15, 473-497 (1962).

Palmer J. D., Plastid Chromosomes: Structure and Evolution, in: Bogorad L. and Vasil I. K. (eds.), Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Volume 7A, *Academic Press*, San Diego, 1991. The Arabidopsis Genome Initiative, 2000, *Nature*, 408, 796-815.

Svab, Z., Hajdukiewicz, P., y Maliga, P., 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 8526-8530.

Zou Z., 2001, Tesis doctoral, Ludwig-Maximilians-Universität, München, Alemania.

US5877402

US5451513

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para generar plantas transgénicas o células vegetales transformadas en su plastoma, que comprende:

(a) introducir en plastidios vegetales una primera molécula de ADN y una segunda molécula de ADN,

en donde dicha primera molécula de ADN contiene una primera región homóloga a una región del plastoma para dirigir la integración del plastoma en un primera secuencia de interés, y

dicha segunda molécula de ADN contiene una segunda región homóloga a una región del plastoma para dirigir la integración del plastoma y una segunda secuencia de interés,

siendo un segmento de secuencia de dicha primera secuencia de interés homólogo a un segundo segmento de dicha segunda secuencia de interés, y

(b) seleccionar transformantes que tengan una secuencia de integración integrada establemente en el plastoma, en tanto que dicha secuencia de integración contiene por lo menos una porción de dicha primera y por lo menos una porción de dicha segunda secuencia de interés, como una secuencia continua.

2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha primera y dicha segunda molécula de ADN se introducen en los plastidios vegetales por cotransformación.

3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en donde dicha primera y dicha segunda secuencia de interés son diferentes.

4. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde cada una de dicha primera y dicha segunda secuencia de interés contiene una secuencia adicional además de dicho segmento de secuencia.

5. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde se introducen una o más moléculas de ADN adicionales dentro de los plastidios vegetales además de dicha primera y dicha segunda molécula de ADN, en tanto que dicha(s) molécula(s) de ADN adicional(es) una(s) secuencia(s) adicional(es) de interés.

6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en donde dicha una molécula de ADN adicional contiene un segmento de secuencia homólogo a un segmento de secuencia de dicha primera secuencia de interés y un segmento de secuencia homólogo a dicha segunda secuencia de interés.

7. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicha primera y/o dicha segunda y/o una secuencia adicional de interés contiene uno o más genes de interés o fragmentos de un gen de interés.

8. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde un gen de interés se divide en dos o más fragmentos y en donde dicha primera y/o dicha segunda y/o una secuencia adicional de interés contiene un fragmento de dicho gen de interés, en tanto que dicho gen de interés es ensamblado a partir de dos o más fragmentos al formarse dicha secuencia de integración.

9. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicha primera secuencia de interés contiene una parte 5' de un gen de interés y dicha segunda secuencia de interés contiene una parte 3' de un gen de interés, y dicha secuencia de integración contiene un gen de interés de manera tal que pueda ser expresado.

10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la expresión de dicho gen de interés incluye empalme trans de ARN.

11. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en donde dicha primera secuencia de interés contiene en sentido ascendente de dicha parte 5' de dicho gen de interés un elemento de secuencia homólogo a un elemento de secuencia que se localiza en sentido descendente de dicha parte 3' de dicho gen de interés de dicha segunda secuencia de interés, en tanto que los dichos elementos de secuencia la escisión por recombinación homóloga de una parte de la secuencia de integración que comprende a la escisión parte 5' y/o dicha parte 3' de dicho gen de interés.

12. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, en donde dicho gen de interés es un gen marcador seleccionable.

13. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde dicha primera o dicha segunda molécula de ADN contiene un gen marcador seleccionable fuera de una unidad de secuencia que consiste de la región homóloga a una región del plastoma y la secuencia de interés, para permitir la pérdida de dicho gen marcador.

ES 2 311 116 T3

14. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde un gen marcador seleccionable se divide en un primero y un segundo fragmento, en tanto que

dicho primer fragmento se incorpora en dicha primera molécula de ADN fuera de una primera unidad de secuencia,

dicho segundo fragmento se incorpora en dicha segunda molécula de ADN fuera de una segunda unidad de secuencia,

en tanto que dicha primera unidad de secuencia consiste de dicha primera región homóloga y dicha primera secuencia de interés, y

dicha segunda unidad de secuencia consiste de dicha segunda región homóloga y dicha segunda secuencia de interés.

15. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en donde dicho gen marcador seleccionable es aphA-6.

16. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde dicha primera molécula de ADN contiene únicamente una región homóloga a una región del plastoma para dirigir la integración del plastoma.

17. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde dicha primera y dicha segunda molécula de ADN contienen cada una sólo una región homóloga a una región del plastoma para dirigir la integración del plastoma.

18. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en donde dicha primera y dicha segunda región homóloga juntas corresponden a una secuencia continua del plastoma que se va a transformar.

19. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en donde las plantas transgénicas homoplastómicas se regeneran a partir de dichos transformantes.

20. Un equipo de partes, que comprende una primera y una segunda molécula de ADN, como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19.

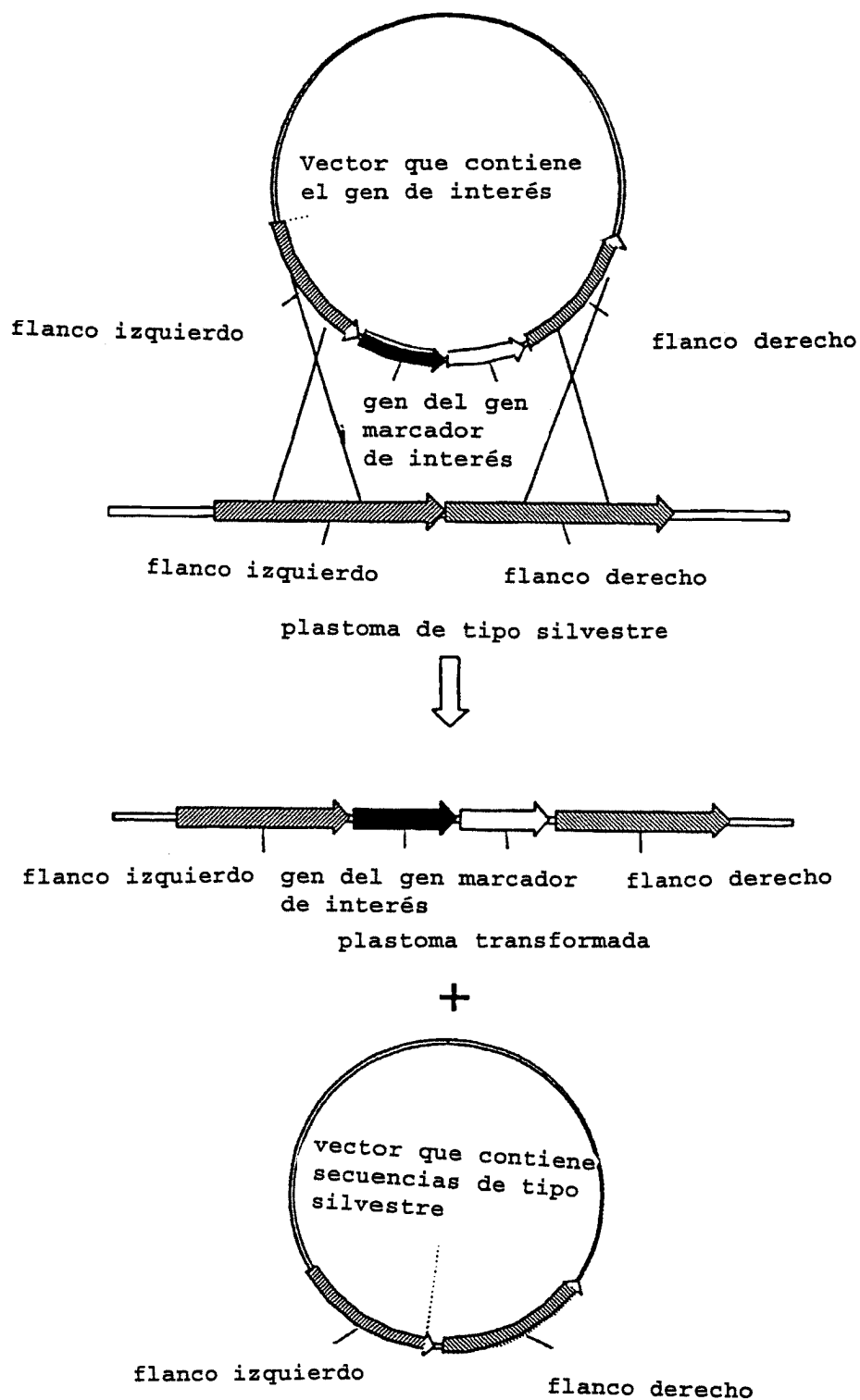


Fig. 1

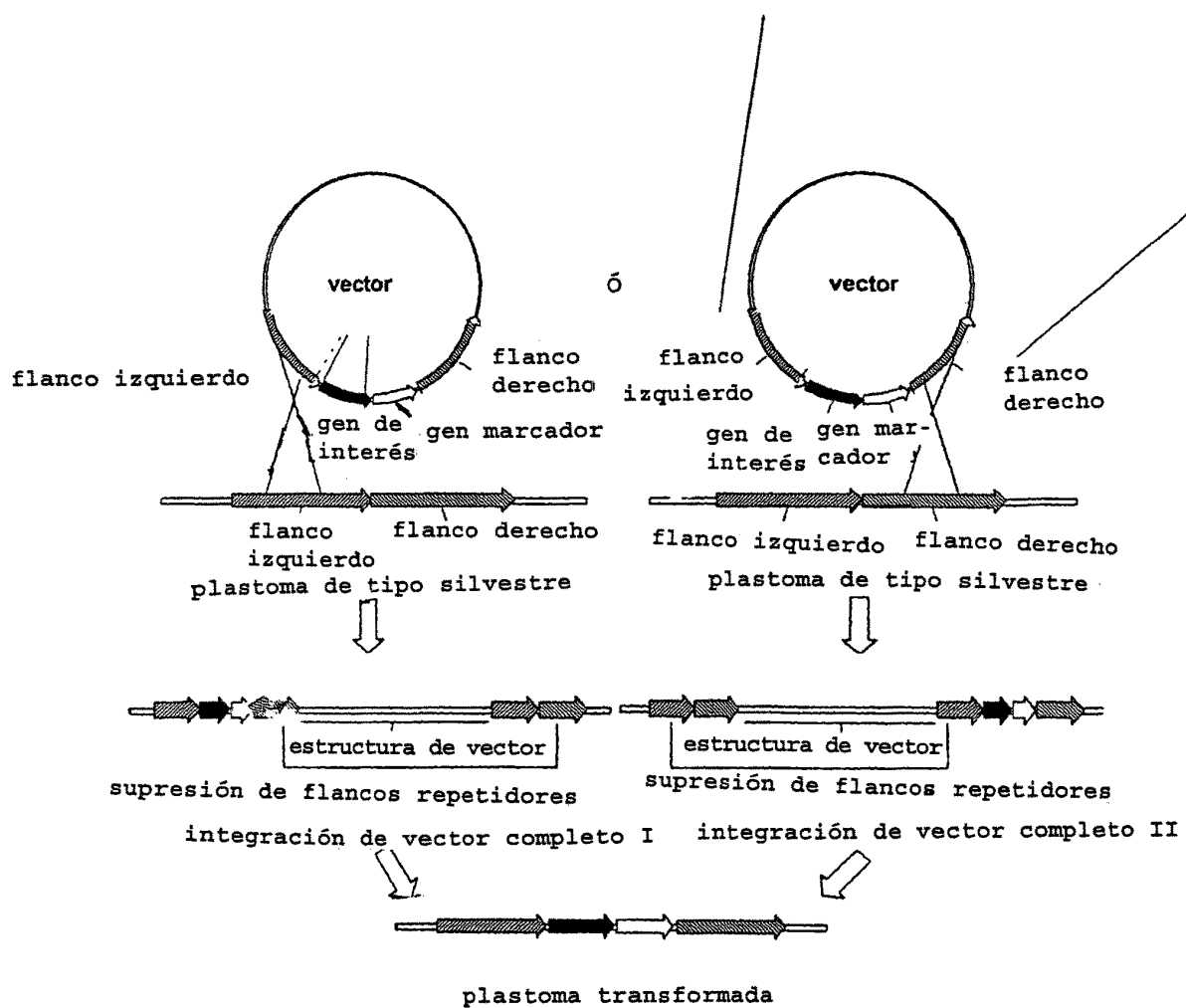


Fig. 2

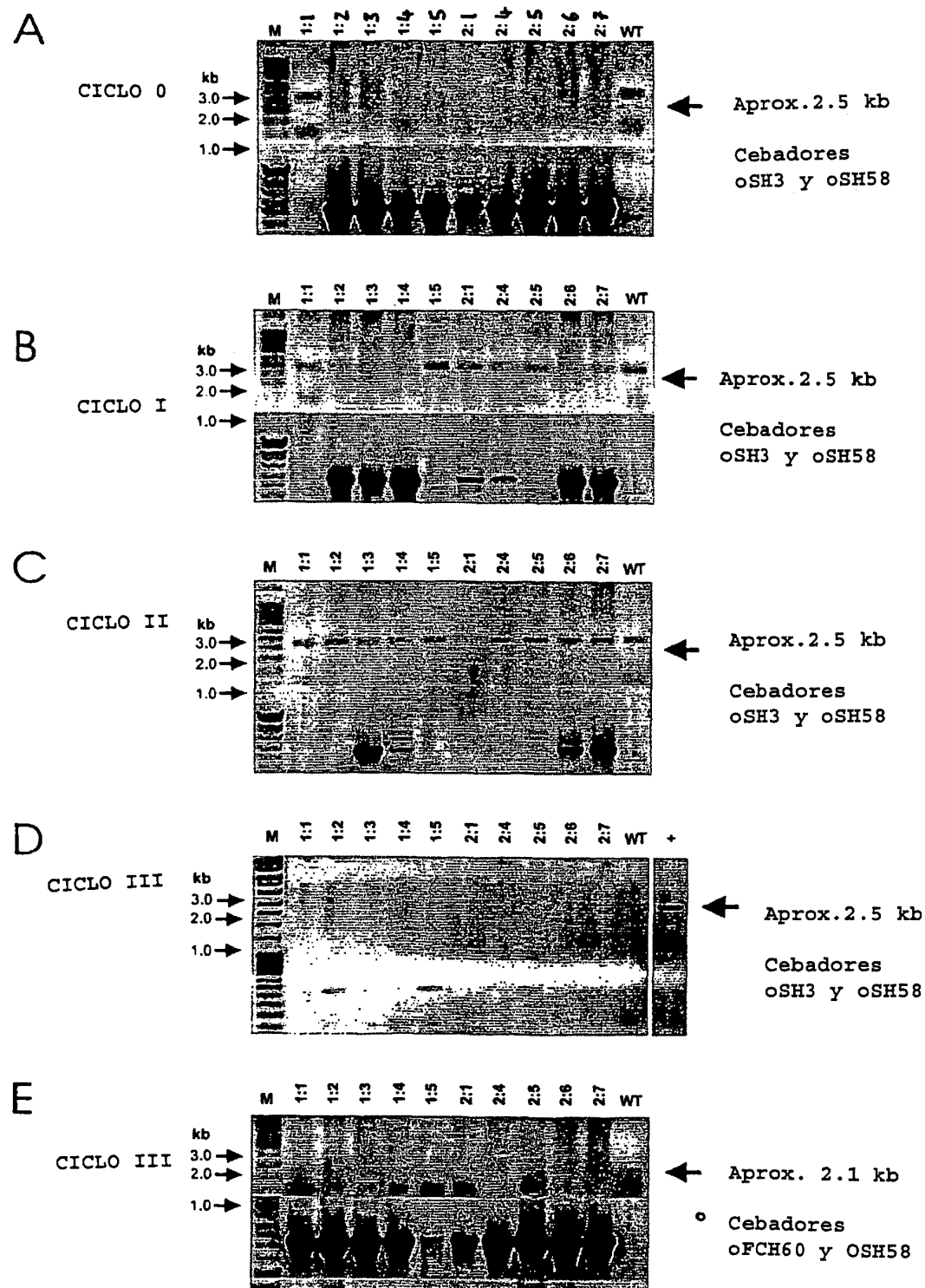


Fig. 3

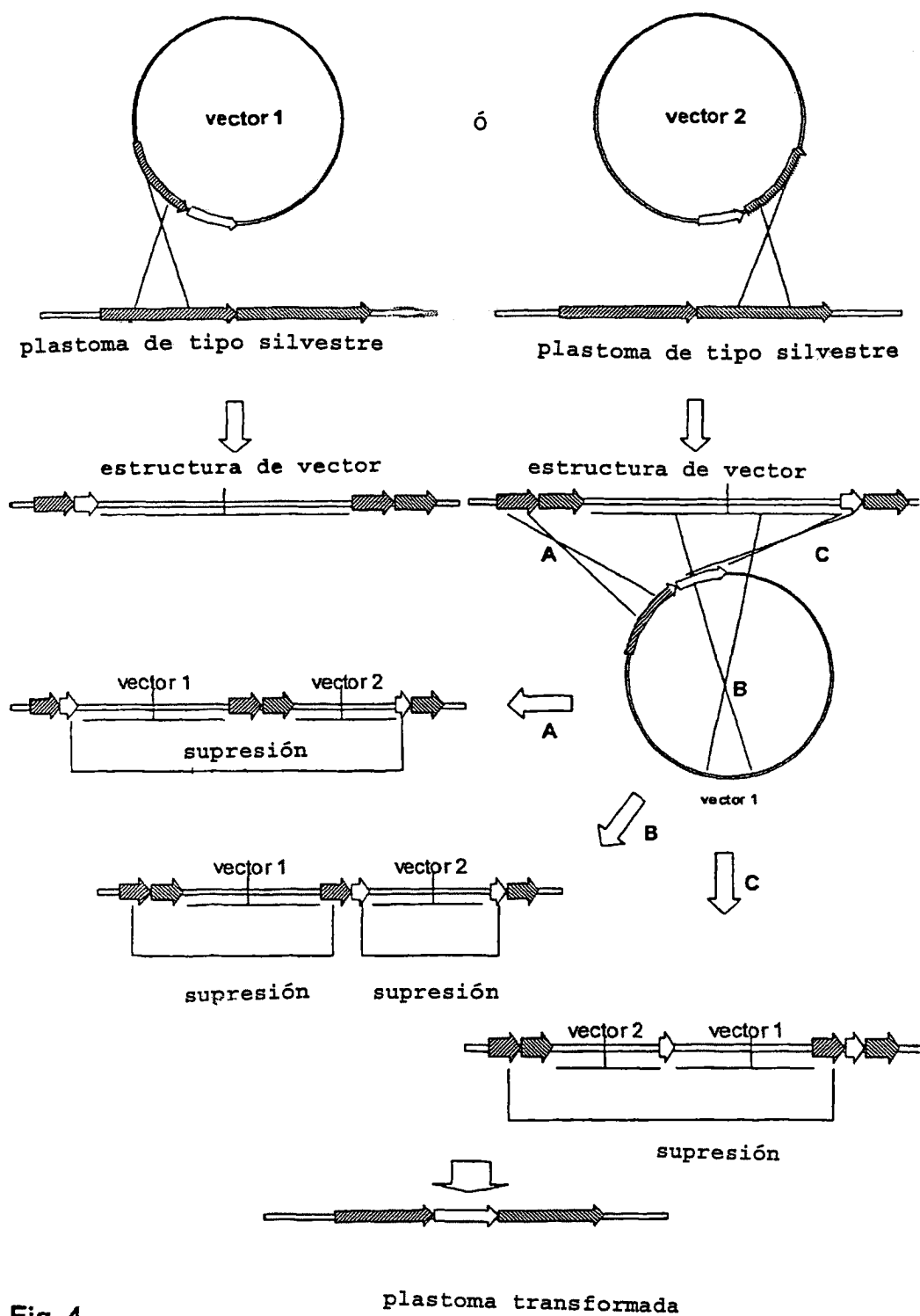


Fig. 4

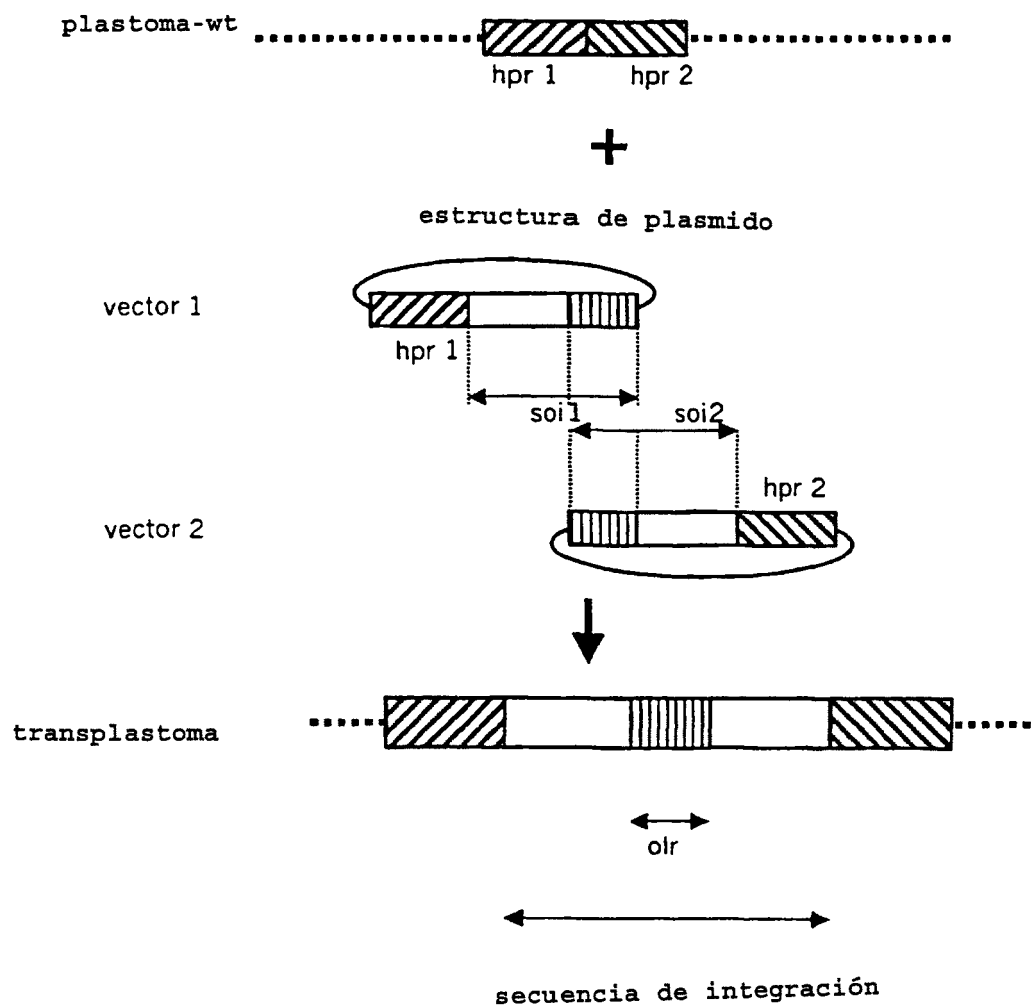


Fig. 5

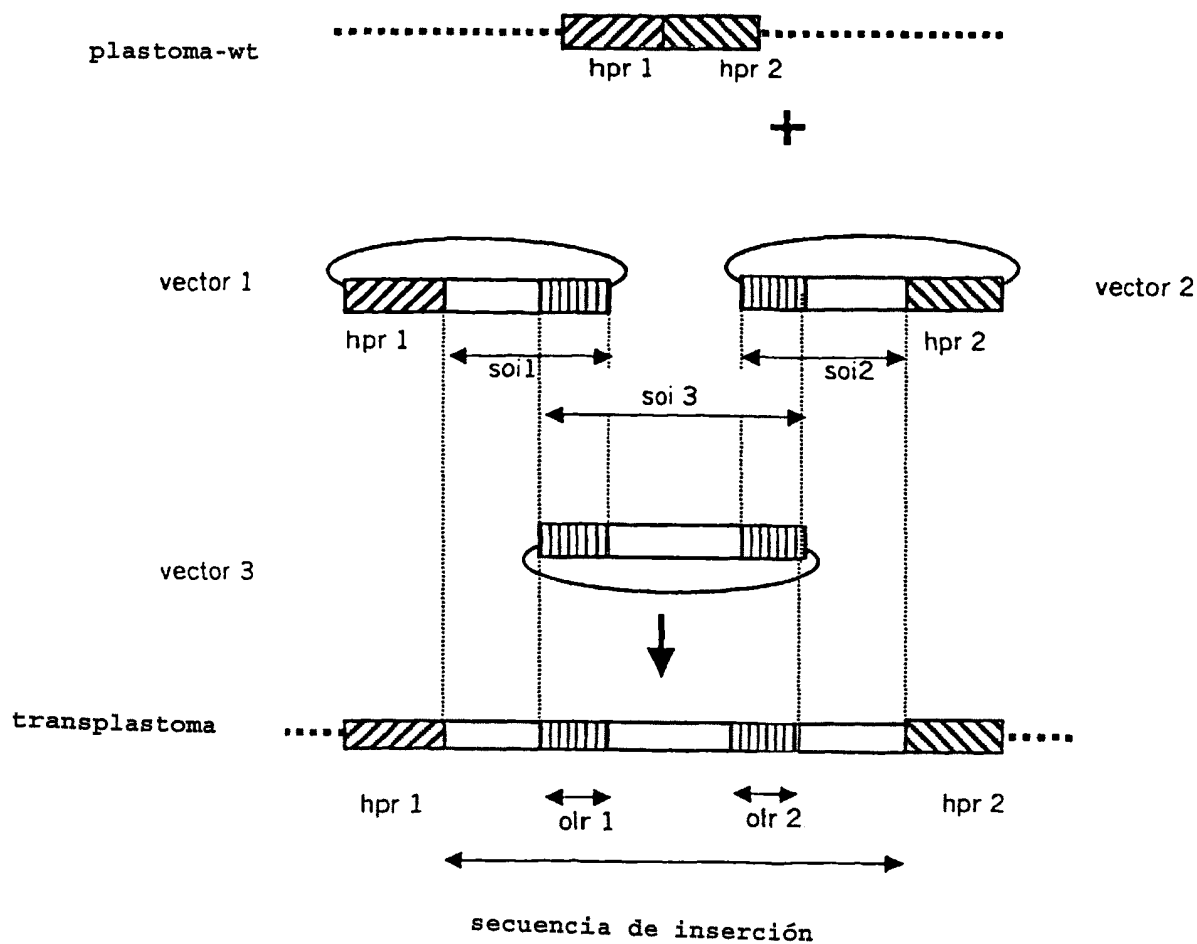


Fig. 6

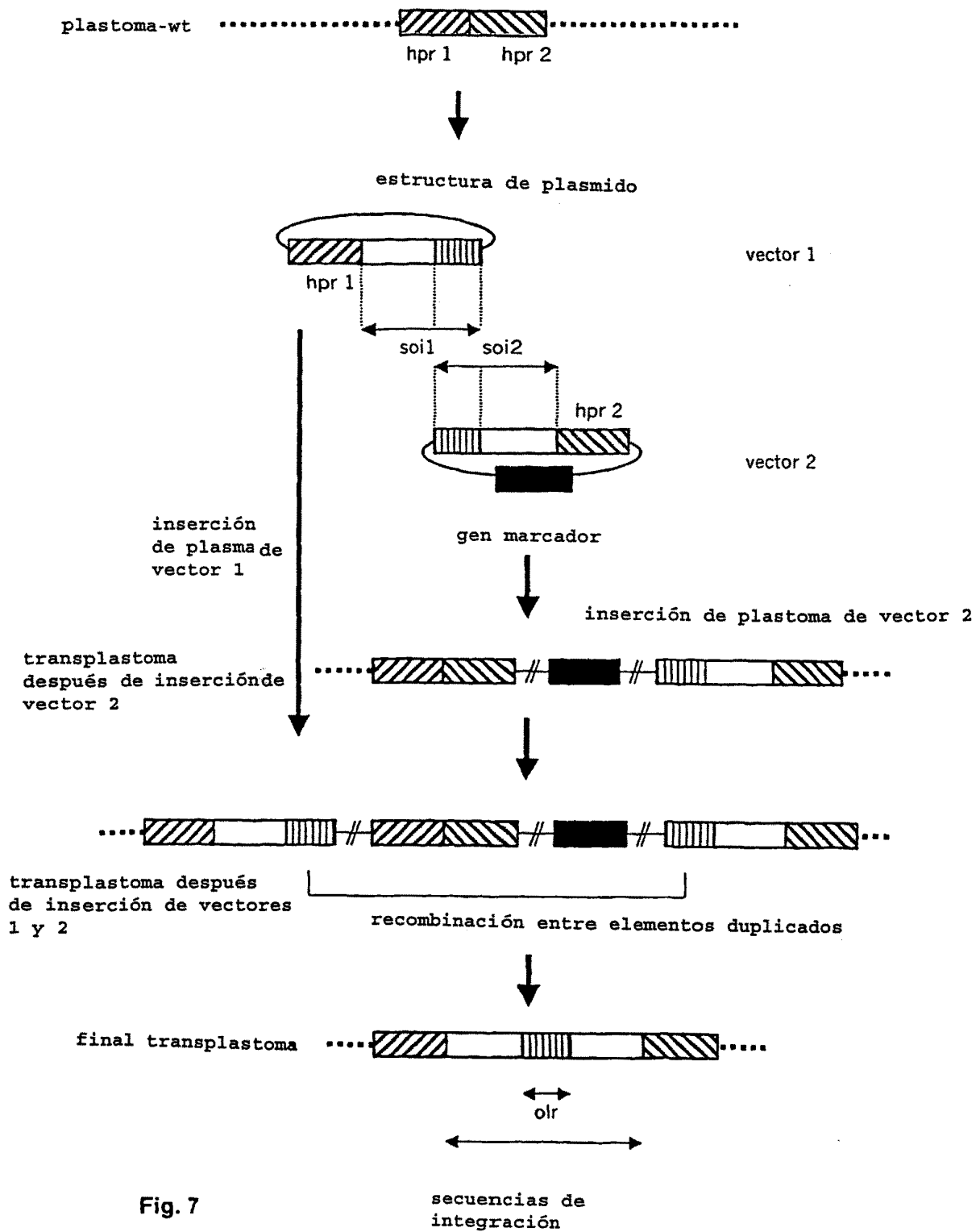


Fig. 7

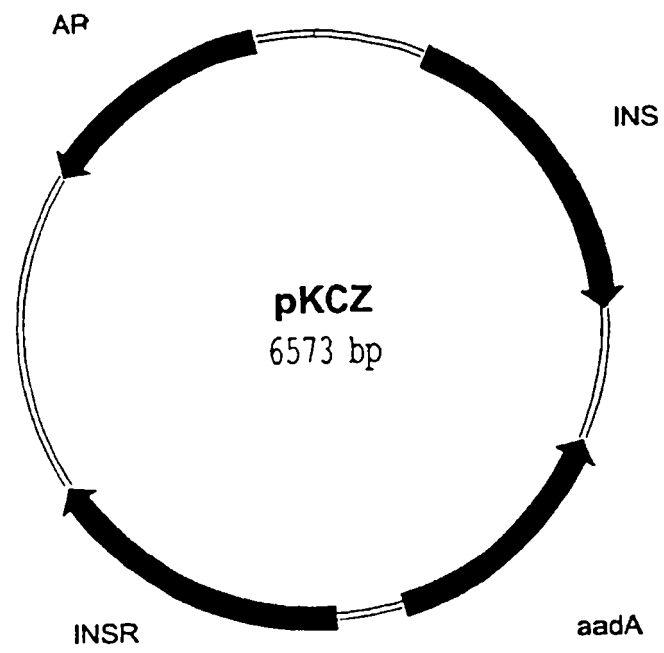


Fig. 8

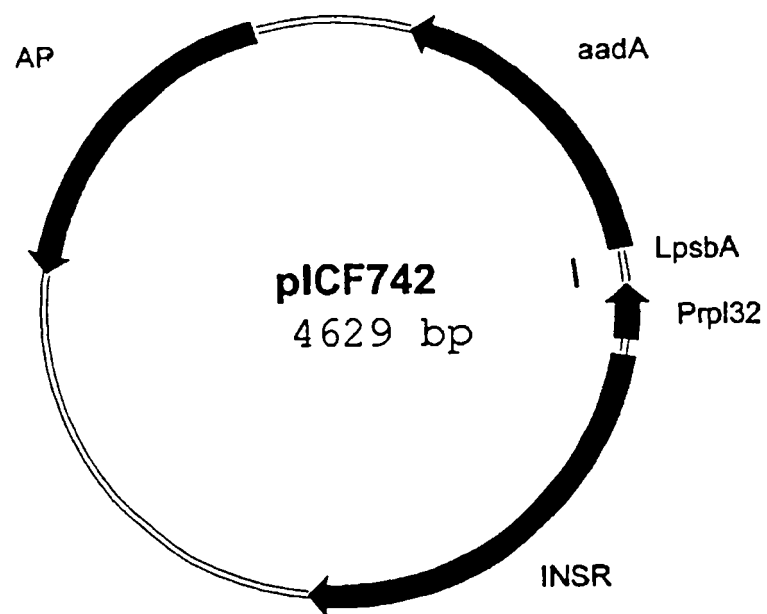


Fig. 9

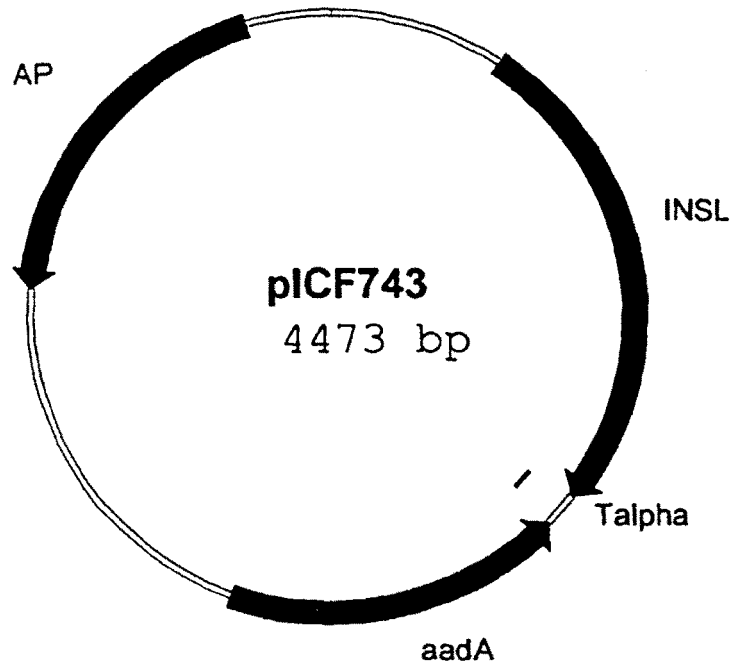


Fig. 10

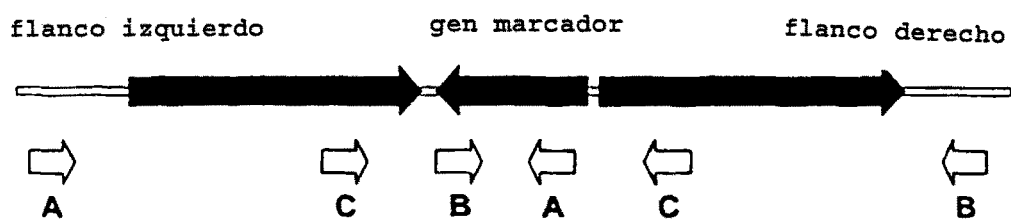


Fig. 11

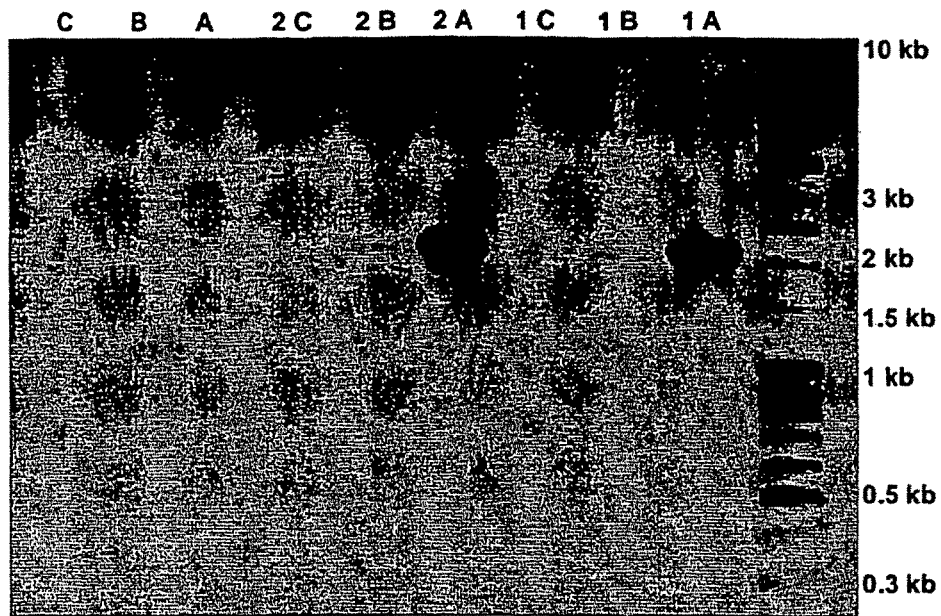


Fig. 12

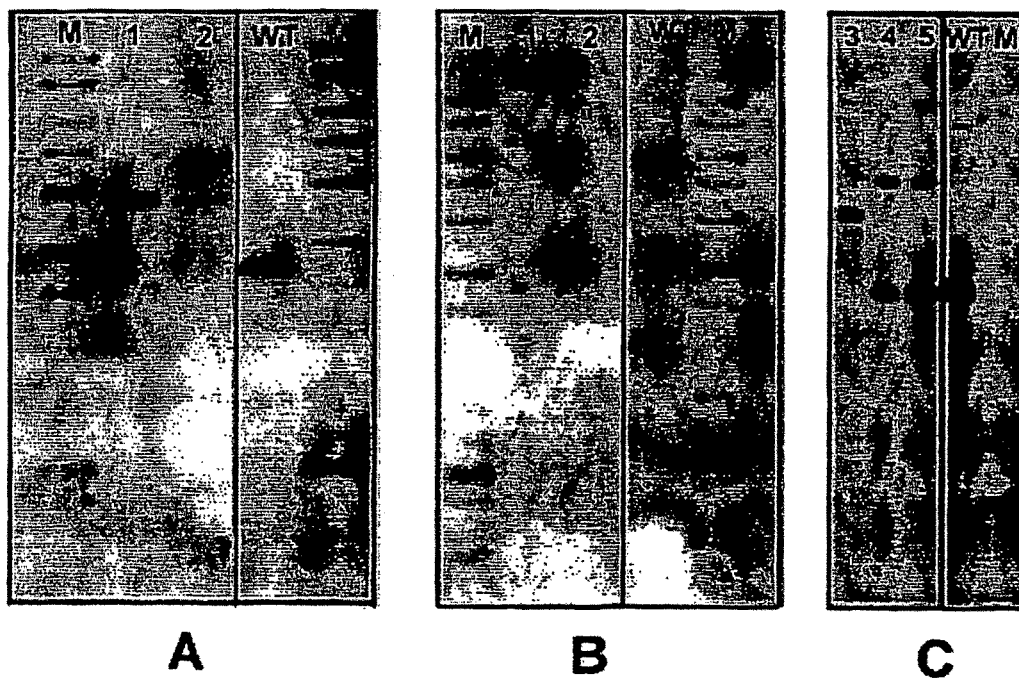


Fig. 13

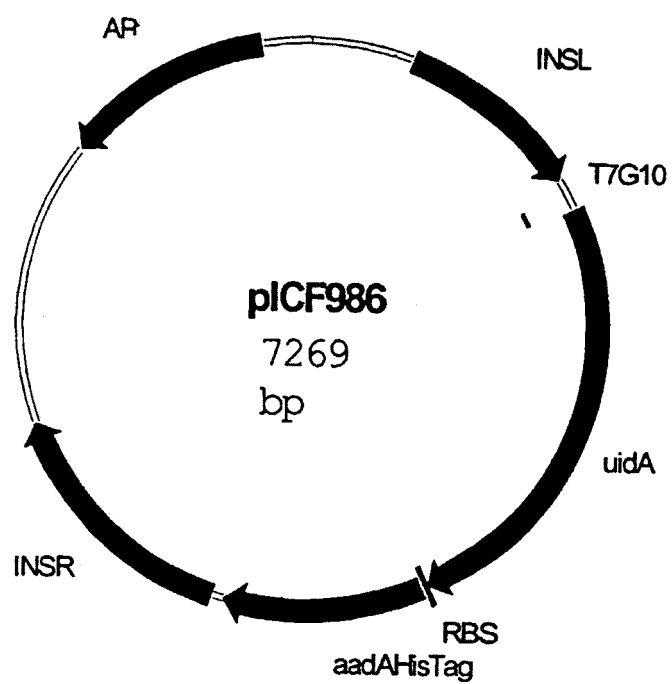


Fig. 14

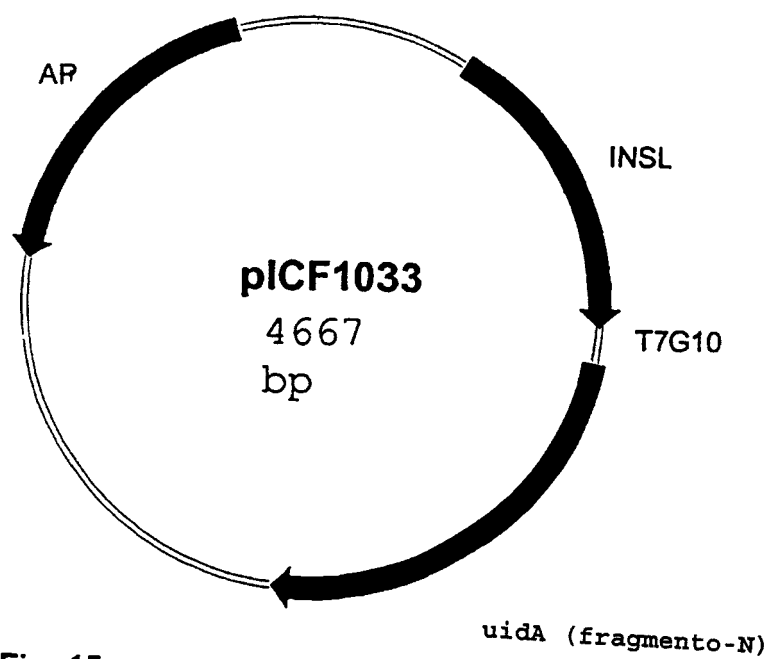


Fig. 15

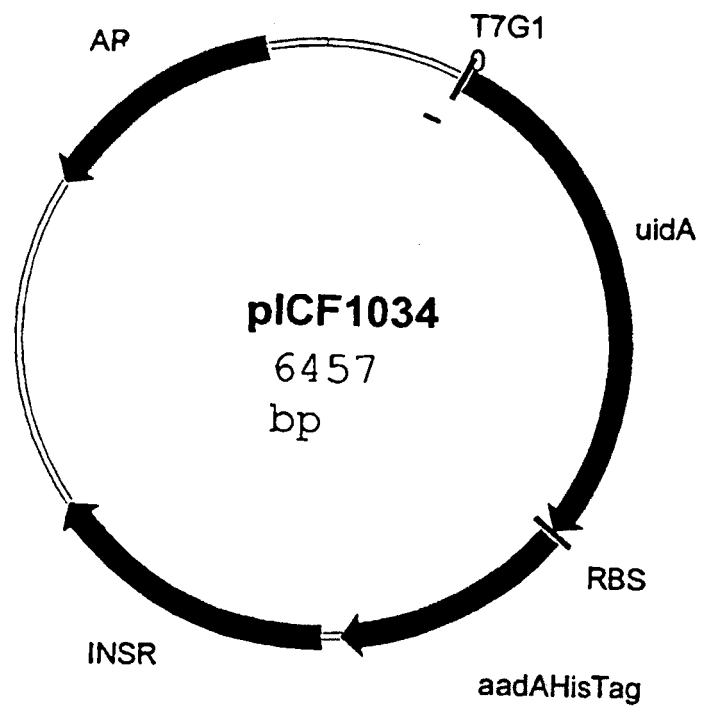


Fig. 16

ES 2 311 116 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Icon Genetics AG	
5	<120> Transformación de plastidios utilizando vectores modulares	
	<130> PCT-12361	
10	<140> PCT/EP03/08549	
	<141> 2003-08-01	
	<150> DE 102 36 001	
15	<151> 2002-08-06	
	<160> 39	
20	<170> Versión Patentin 3.1	
	<210> SEQ ID N°: 1	
	<211> 21	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Iniciador PCR	
	<400> 1	
35	cactacattt cgctcatcgc c	21
	<210> SEQ ID N°: 2	
	<211> 20	
40	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> Iniciador PCR	
	<400> 2	
50	tattccgact tccccagagc	20
	<210> SEQ ID N°: 3	
	<211> 21	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Iniciador PCR	
	<400> 3	
65	ctatcagagg tagttggcgt c	21

ES 2 311 116 T3

	<210> SEQ ID N°: 4	
	<211> 17	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador PCR	
10	<400> 4	
	ggcatcagag cagattg	17
15	<210> SEQ ID N°: 5	
	<211> 35	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador PCR	
25	<400> 5	
	tggagctcga attgccgcga gcaaagatat taatg	35
30	<210> SEQ ID N°: 6	
	<211> 30	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador PCR	
40	<400> 6	
	tacgaattca agagaaggtc acggcgagac	30
45	<210> SEQ ID N°: 7	
	<211> 30	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador PCR	
55	<400> 7	
	gaccctgcag gcaaaaaatc tcaaatagcc	30
60	<210> SEQ ID N°: 8	
	<211> 28	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	

ES 2 311 116 T3

	<220>		
	<223> Iniciador PCR		
5	<400> 8		
	cgggatccga ttttcttta gactcgg		28
10	<210> SEQ ID N°: 9		
	<211> 28		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> Iniciador PCR		
20	<400> 9		
	cgggatccga ttttcttta gactcgg		28
25	<210> SEQ ID N°: 10		
	<211> 49		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
30	<220>		
	<223> Iniciador PCR		
35	<400> 10		
	cgagatccac cgcggtggcg gcccgtcgac cctgcaggca aaaaatctc		49
40	<210> SEQ ID N°: 11		
	<211> 31		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> Iniciador PCR		
50	<400> 11		
	cgggatccaa aaagccttcc attttctatt t		31
55	<210> SEQ ID N°: 12		
	<211> 29		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
60	<220>		
	<223> Iniciador PCR		
65	<400> 12		
	ttgcagccat ggtaaaatct tggtttatt		29

ES 2 311 116 T3

	<210> SEQ ID N°: 13	
	<211> 25	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador PCR	
10	<400> 13	
	tgaattccca tggctcgtga agcgg	25
15	<210> SEQ ID N°: 14	
	<211> 37	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador PCR	
25	<400> 14	
	ggtgatgatg atccttgcca actaccttag tgatctc	37
30	<210> SEQ ID N°: 15	
	<211> 25	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador PCR	
40	<400> 15	
	tgaattccca tggctcgtga agcgg	25
45	<210> SEQ ID N°: 16	
	<211> 38	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador PCR	
55	<400> 16	
	gctctagatt agtgatgatg gtgatgatga tccttgcc	38
60	<210> SEQ ID N°: 17	
	<211> 29	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	

ES 2 311 116 T3

	<220>		
	<223> Iniciador PCR		
5	<400> 17		
	gatggatcct tgctgttgca tcgaaagag		29
10	<210> SEQ ID N°: 18		
	<211> 37		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> Iniciador PCR		
20	<400> 18		
	cactggtacc cgggaattgt gacctctcgg gagaatc		37
25	<210> SEQ ID N°: 19		
	<211> 77		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
30	<220>		
	<223> ligación oligo		
35	<400> 19		
	gatgtctaga agcaacgtaa aaaaacccgc cccggcgggt ttttttatac ccgtagtatac		60
40	cccagcggcc gcggtac		77
	<210> SEQ ID N°: 20		
45	<211> 22		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
50	<220>		
	<223> Iniciador PCR		
	<400> 20		
55	cagactaata ccaatccaag cc		22
	<210> SEQ ID N°: 21		
60	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
65	<220>		
	<223> Iniciador PCR		

ES 2 311 116 T3

	<400> 21	
	ctatcagagg tagttggcgt c	21
5	<210> SEQ ID N°: 22	
	<211> 21	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador PCR	
15	<400> 22	
	cactacattt cgctcatgc c	21
20	<210> SEQ ID N°: 23	
	<211> 20	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador PCR	
30	<400> 23	
	tattccgact tccccagagc	20
35	<210> SEQ ID N°: 24	
	<211> 19	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador PCR	
45	<400> 24	
	catcaatacc tcggtctag	19
50	<210> SEQ ID N°: 25	
	<211> 19	
	<212> ADN	
55	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador PCR	
60	<400> 25	
	acacatagta tgcccggtc	19
65	<210> SEQ ID N°: 26	
	<211> 34	

ES 2 311 116 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Iniciador PCR	
	<400> 26	
10	tatagggccc agctataggt ttacatttt accc	34
	<210> SEQ ID N°: 27	
15	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Iniciador PCR	
	<400> 27	
25	gtcctgcagt tatccatttg tagatggagc ttcg	34
	<210> SEQ ID N°: 28	
30	<211> 125	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> sitio de clonación múltiple modificado	
	<400> 28	
40	gaattcggggc ccgtcgaccc tgcaggcccg gggatccata tgccatgggc tagatgatca	60
	tcatcaccat catcactaat ctagagagct cctcgaggcg gccgcggtac catgcatgca	120
45	agctt	125
	<210> SEQ ID N°: 29	
50	<211> 97	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
60	<400> 29	
	ctgcaggatc ctatagggag accacaacgg tttccctcta gtaataattt tgtttaactt	60
65	taagaaggag atatacatat ggctagcatt tccatgg	97

ES 2 311 116 T3

	<210> SEQ ID N°: 30	
	<211> 24	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador PCR	
10	<400> 30	
	catgccatgg tccgtcctgt agaa	24
15	<210> SEQ ID N°: 31	
	<211> 34	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador PCR	
25	<400> 31	
	gccaagettg tacagttctt tcgcttggt gcc	34
30	<210> SEQ ID N°: 32	
	<211> 24	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador PCR	
40	<400> 32	
	catgccatgg tccgtcctgt agaa	24
45	<210> SEQ ID N°: 33	
	<211> 32	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador PCR	
55	<400> 33	
	ctgggtacct tattgttgc ctcctgctg cg	32
60	<210> SEQ ID N°: 34	
	<211> 27	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	

ES 2 311 116 T3

	<220>		
	<223> Iniciador PCR		
5	<400> 34		
	ggatccatgc gtgaageggt tatcgcc		27
10	<210> SEQ ID N°: 35		
	<211> 37		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> Iniciador PCR		
20	<400> 35		
	ggtgatgatg atccttgcca actaccttag tgatctc		37
25	<210> SEQ ID N°: 36		
	<211> 37		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
30	<220>		
	<223> Iniciador PCR		
35	<400> 36		
	ggggtaccag ttgtagggag ggatccatgc gtgaagc		37
40	<210> SEQ ID N°: 37		
	<211> 38		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> Iniciador PCR		
50	<400> 37		
	gctctagatt agtgatgatg gtgatgatga tccttgcc		38
55	<210> SEQ ID N°: 38		
	<211> 38		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
60	<220>		
	<223> Iniciador PCR		
65	<400> 38		
	ctaattctaga gagctcgtct ataggaggtt ttgaaaag		38

ES 2 311 116 T3

<210> SEQ ID N°: 39

<211> 21

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Iniciador PCR

10

<400> 39

ccagaaagaa gtatgctttg g

15

21

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65