



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 312 561**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02722036 .7**
96 Fecha de presentación : **03.01.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1364036**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.11.2003**

54 Título: **Resistencia al estrés como marcador seleccionable para plantas transgénicas.**

30 Prioridad: **04.01.2001 GB 0100105**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2009

73 Titular/es: **Vlaams Interuniversitair Instituut voor
Biotechnologie v.z.w. (VIB)
Rijvisschestraat 120
9052 Gent, BE**

72 Inventor/es: **Thevelein, Johan;
Leyman, Barbara;
Van Dijck, Patrick;
Avonce, Nelson y
Iturriaga, Gabriel**

74 Agente: **Aragonés Forner, Rafael Ángel**

ES 2 312 561 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

Resistencia al estrés como marcador seleccionable para plantas transgénicas.

5 La presente invención se refiere a la producción de plantas y semillas transgénicas. Con mayor exactitud, la presente invención se refiere a un método mejorado para producir plantas y semillas transgénicas, así como nuevas plantas y semillas transgénicas que se pueden obtener con este método, vectores y kits biológicos para dicha producción.

Antecedentes de la invención

10 Bajo la influencia de unas condiciones de estrés abiótico, tales como sequía, frío, salinidad y calor, muchos organismos vivos ajustan su potencial osmótico acumulando solutos compatibles con su metabolismo, como sorbitol, manitol, glicina-betaína, prolina, sacarosa o trehalosa. Este último compuesto es un disacárido no reductor (α - α -1,1-diglucosa) que tiene una función osmoprotectora en condiciones de estrés, interaccionando con las membranas y las proteínas, evitando así la separación de fases y la desnaturalización irreversible de dichos organismos. La trehalosa está presente en muchos organismos vivos como por ejemplo, bacterias, hongos, animales y plantas. En la mayoría de ellos, la trehalosa se sintetiza en dos etapas enzimáticas: en una primera etapa, a partir de glucosa-6-fosfato y uridin-difosfoglucosa en trehalosa-6-fosfato catalizado por la trehalosa-6-fosfato sintasa (de ahora en adelante TPS, expresada por el gen *TPS 7*), después en una segunda etapa de trehalosa-6-fosfato a trehalosa, catalizado por la trehalosa-6-fosfato fosfatasa (de ahora en adelante TPP, expresada por el gen *TPS 2*).

25 El mutante *tps1Δ* de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* no sintetiza trehalosa y puede crecer en glucosa como única fuente de carbono, según Van Aelst *et al.*, en *Mol. Microbiol.* (1993) 8:927-943. Este fenotipo se debe a una entrada ilimitada de glucosa en glucólisis que provoca un agotamiento del adenosin-5'-trifosfato (de ahora en adelante ATP) intracelular y de los fosfatos inorgánicos. Las pruebas experimentales de Thevelein *et al.*, en *Trends Biochem. Science* (1995) 2:410-418 sugieren que la trehalosa-6-fosfato controla a la hexoquinasa (de ahora en adelante HXK) II, por lo tanto la ausencia de este intermediario provoca una alta actividad de la actividad HXK II y por lo tanto a una sobrecarga metabólica de la glucosa-6-fosfato. Además, la entrada de azúcar también podría estar regulada por la propia proteína TPS1, según Van Vaeck *et al.*, en *Biochem. J.* (2001) 353:157-162.

30 Los dos enzimas, TPS y TPP, están codificados por genes diferentes en bacterias, como *E. coli*, levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* y en plantas como *Arabidopsis thaliana* y *Selaginella lepidophylla*. En las dos primeras especies, el enzima TPS está codificado por un polipéptido de 56 kD, mientras que en las plantas está codificado por una proteína de 100 a 109 kD. Existe una gran similitud en la secuencia de las proteínas en la región común entre todos estos enzimas TPS; salvo en las regiones aminoterminal y carboxiterminal presentes en las proteínas TPS de las plantas, como indicaron Blazquez *et al.*, en *Plant J.* (1998) 13:685-689 y Zentella *et al.*, en *Plant Physiol.* (1999) 119:1473-1482. La solicitud de patente internacional publicada como WO 00/22141 describe un método para preparar un organismo eucariota, como una planta, animal u hongo, que muestre una expresión constitutiva, inducible y/o específica de órgano de un gen *TPS* específicamente modificado, que comprende las etapas de:

- 40 (a) suministrar un gen *TPS*,
- (b) diseñar una modificación del gen *TPS* alineando el gen con el gen correspondiente de levadura y determinando la parte del gen que se extiende más allá del extremo terminal 5' del gen de levadura.
- 45 (c) eliminar o inactivar una parte de la región aminoterminal del gen *TPS* para aumentar la actividad *TPS*.
- (d) clonar el gen modificado en un vector de expresión bajo el control de un promotor constitutivo, inducible y/o específico de órgano,
- 50 (e) transformar una célula o tejido vegetal con el vector de expresión obtenido,
- (f) regenerar una planta completa a partir de la célula o tejido vegetal transformado.

55 Dicho documento describe también plantas con un aumento de la tolerancia al estrés y que incluían en su genoma dicho gen *TPS* específicamente modificado.

Existen abundantes pruebas de que la HXK es un componente principal en la respuesta al azúcar en levaduras y vegetales, según Sheen *et al.*, en *Curr. Op. Plant Biol.* (1999) 2: 410-418. En los primeros organismos, un mutante *hvk2Δ* puede crecer normalmente en un medio con mucha glucosa, además un doble mutante *hvk2Δtps1Δ* recupera la incapacidad de un mutante *tps1Δ* de crecer en un medio con glucosa, lo que sugiere que HXKII es un factor anterior en esta ruta. Las plantas transgénicas *Arabidopsis thaliana* (abreviatura: At) que expresan AtHXK1 o AtHXK2 en la cadena complementaria, presentaron un fenotipo insensible a la glucosa, es decir, germinación, desarrollo y procesos de virescencia en medios con mucha glucosa con un 6% (peso por volumen) de glucosa, mientras que las semillas naturales detenían el crecimiento y tenían un aspecto albino, en parte como resultado de la represión por glucosa de los genes fotosintéticos que codifican ciertas proteínas, según Jang *et al.*, en *Plant Cell* (1997) 9:5-19. Por el contrario, la superexpresión de los genes *AtHXK* en *Arabidopsis thaliana* provoca un fenotipo hipersensible a la glucosa que es más grave marcado que en un tipo natural al crecer en un medio rico en glucosa.

ES 2 312 561 T3

Los marcadores actualmente conocidos para la selección de plantas transformadas pertenecen a una de las siguientes clases principales, teniendo todas ellas varios inconvenientes.

Los marcadores de resistencia a antibióticos se conocen como herramientas de selección. Se ha expresado alguna preocupación sobre estos marcadores, considerando que podrían expandirse por transferencia genética horizontal a patógenos bacterianos del intestino humano o del entorno. Aunque no se ha demostrado jamás que esto ocurra en la práctica, los enormes problemas asociados al aumento de la resistencia a los antibióticos en los patógenos microbianos permite recordar que en el pasado se han pasado por alto ciertos problemas y que esto podría volver ocurrir con la introducción de las plantas transgénicas.

También han surgido críticas similares contra los otros tipos de marcador de selección, tales como genes de resistencia a herbicidas, que se podrían expandir en el entorno a las malas hierbas haciéndolas posteriormente más difíciles de erradicar. Los marcadores de resistencia a antibióticos o herbicidas sólo son necesarios para la construcción de plantas transgénicas, y después permanecen en la planta como entidades totalmente inútiles. Por lo tanto, la sustitución de los marcadores de resistencia a antibióticos por otros tipos de marcadores no supone un problema fundamental para el desarrollo de plantas transgénicas. Por lo tanto, aunque los posibles riesgos asociados con el uso de marcadores de resistencia a antibióticos podrían ser puramente teóricos, desempeñan un papel importante en las críticas contra el uso de organismos modificados genéticamente. La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), en un reciente informe (http://www.who.int/fsf/GMfood/FAO-WHO_Consultation_report_2000.pdf), llegaron a la conclusión de que no existían evidencias de que los marcadores actualmente utilizados implicaran ningún riesgo para la salud humana o de los animales domésticos. Sin embargo, dicho informe agrega que la posibilidad de transferencia y expresión de estos genes es un riesgo que justifica que su uso deba evitarse en el genoma de plantas modificadas genéticamente ampliamente distribuidas. Además, una reciente proposición de la Comisión Europea (julio de 2000) sugiere una norma que prohíba todos los genes de resistencia a antibióticos en los cultivos modificados genéticamente. Por lo tanto, el uso de marcadores de resistencia a antibióticos ya no será evidentemente un método de elección para la construcción de plantas transgénicas para su uso en la industria alimentaria.

Una segunda clase de marcadores implica marcadores escindibles. La eliminación de un marcador de resistencia a antibióticos puede lograrse con el sistema llamado Cre-lox descrito por Yoder *et al.*, en *Biotechnology* (1994) 12: 263-267 o a través de recombinación en el genoma de los cloroplastos, como describen Lamtham *et al.*, en *Nature Biotechnology* (2000) 18:1172-1176. En el primer caso, el marcador de resistencia a antibióticos se introduce entre dos repeticiones lox u, después de la inducción de la recombinasa Cre usando un promotor inducible, los sitios lox se recombinan provocando la escisión del marcador. Esta metodología adolece del problema de que aún no se ha demostrado de forma convincente la ausencia del marcador en toda la planta. Por lo tanto, parece preferible eliminar completamente el uso de marcadores de resistencia a antibióticos para la construcción de plantas transgénicas de grado alimenticio.

Pueden realizarse también críticas similares a la eliminación de marcadores por recombinación en plastidios, que presentan además complicaciones adicionales. Dado el gran número de plastidios en una célula, normalmente existen miles de copias de un gen marcador en una célula. La eliminación de un gen marcador no es por lo tanto completa, por lo tanto se producen necesariamente plantas heteroplásmicas que contienen tanto plastidios libres de marcadores como plastidios con marcadores. La generación de plantas sin marcadores requiere una clasificación de los plastidios citoplásmicos durante divisiones celulares consecutivas y el subcultivo de las plantas procedentes de las células embrionarias homoplásmicas. Es difícil garantizar que durante el crecimiento y el subcultivo de las plantas, no se generarán formas inactivas del gen marcador de resistencia que pudieran pasar a otros organismos y volver a activarse por mutación o recombinación. Aunque la ausencia de genes marcadores puede demostrarse de forma convincente usando una hibridación de tipo Southern, la tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) y los controles adecuados, este método siempre adolecerá del inconveniente de que los genes marcadores han estado presentes en algún momento del proceso y que podrían haber provocado problemas desconocidos.

Otro sistema usa el gen de la manosa-6-fosfato isomerasa de *Escherichia coli* como marcador, como describen Miles *et al.*, en *Gene* (1984) 32:41-48. La manosa se transporta dentro las células vegetales por transportadores de hexosas y la HXK vegetal la fosforila en manosa-6-fosfato, pero ya no puede metabolizarse más debido a la falta de manosa-6-fosfato isomerasa. Como resultado, las células vegetales no pueden usar manosa como fuente de carbono para crecer. La transformación con un gen de la manosa-6-fosfato isomerasa, hace que las plantas transgénicas puedan volver a crecer en un medio con manosa como fuente de carbono. Un inconveniente de este método es el uso de un gen bacteriano de una bacteria patógena oportunista para la generación de plantas transgénicas. Otra limitación de este sistema es que ciertas plantas parecen poder usar la manosa con la misma eficiencia que otros azúcares según Stoop *et al.*, en *Plant Physiology* (1993) 103:1001-1008.

Por lo tanto, en la técnica se necesitan marcadores para la transformación de plantas que no codifiquen marcadores de resistencia a antibióticos o biocidas. En la técnica se necesitan también marcadores para la transformación de plantas que se integren en un lugar predeterminado del genoma de la planta. Además, en la técnica se necesitan marcadores para la transformación de plantas basados en genes de plantas obtenidos a partir de la misma planta que se va a transformar o basados en genes que tengan una actividad enzimática idéntica a la de un gen presente en la planta que se va a transformar.

Características de la invención

La presente invención proporciona nuevos marcadores para la selección de plantas transgénicas. Estos marcadores de selección provocan la superexpresión del gen de la trehalosa fosfato sintasa, lo que hace que la planta transgénica sea significativamente más resistente a uno o más factores de estrés medioambientales y/o artificiales. Los marcadores implicados en la presente invención son preferentemente los genes de la trehalosa fosfato sintasa, después de cuya superexpresión en la planta, no se acumulan compuestos tóxicos ni cambia la morfología ni el desarrollo de la planta en la que se expresa dicho gen.

Los marcadores implicados en la presente invención son preferentemente los genes de la trehalosa fosfato sintasa obtenidos a partir de la misma especie que la planta que se va a transformar. Sin embargo, los genes con una función bioquímica similar pero obtenidos a partir de otras especies de plantas, o de una levadura, sirven también como marcador según la presente invención. Los marcadores de la presente invención pueden insertarse perfectamente en el genoma de la planta transgénica de interés, y tendrán la capacidad útil de hacer que la planta transgénica sea más resistente a uno o más factores o condiciones de estrés artificiales o medioambientales que imiten dicho estrés, como sequía (deshidratación), saturación hídrica, calor, frío, congelación, estrés osmótico, salinidad, luz, nutrientes u oligoelementos escasos o en exceso, presión y similares.

La presente invención se refiere más específicamente al uso de la trehalosa fosfato sintasa como un marcador de selección que haga que las plantas transgénicas sean más resistentes al estrés medioambiental como sequía, estrés osmótico y bajas concentraciones de fosfato.

Según la presente invención, la selección de plantas transgénicas se realiza con un método que no se basa en la selección por resistencia de una planta a antibióticos ni a biocidas. La presente invención incluye además vectores y kits biológicos que comprenden los genes de la trehalosa fosfato sintasa que pueden integrarse en el genoma de la planta. La presente invención se refiere también a plantas transgénicas, y semillas, tejidos órganos y cultivos celulares que se pueden obtener de las mismas y/u obtenidas mediante los marcadores de selección de la presente invención.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra dos vectores binarios idóneos para la transformación de plantas mediante *Agrobacterium tumefaciens*. pIBT/01 contiene *35SAAtTPS1* y *NptII* en el ADN-T (figura 1A) y el pTPSM contiene *35SAAtTPS1* como marcador único en el ADN-T (fig. 1B).

La figura 2 muestra una mezcla de plantas *Arabidopsis thaliana* que sobreexpresan *AtTPS1* con las plántulas de *Arabidopsis thaliana* de tipo natural, las flechas indican las plántulas seleccionadas y la barra al fondo representa 5 mm (figura 2A y 2B), la figura 2C muestra un producto de PCR de extractos genómicos usando como promotor directo 35S y como promotor reverso *AtTPS1*, en el que el carril 1 se corresponde con el control homocigótico de *35SAAtTPS1*, el carril 2 se corresponde con el extracto natural y el carril 3 con la planta transgénica seleccionada.

La figura 3 muestra un análisis de PCR de los extractos de once plántulas de *Arabidopsis thaliana* de la invención (calles 1 a 11) seleccionadas en un medio con 6% de glucosa. El promotor directo fue 35S y el reverso *AtTPS1*. El carril 12 corresponde a un extracto de una planta que superexpresaba *AtTPS1* y el carril 13 al extracto natural.

La figura 4 muestra plántulas de *Nicotiana tabacum* de tipo natural y otras que sobreexpresan *35SAAtTPS1* crecidas durante 12 días en un medio MS 1X con un 6% de glucosa, de dos líneas transgénicas independientes: Nt(35SAAtTPS1).05 (figura 4A) y Nt(35SAAtTPS1).19 (figura 4B). Las plántulas Nt de tipo natural aparecen en la figura 4C.

Definiciones

El término “homólogo” como se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere a una secuencia de proteína en la que uno o más aminoácidos están sustituidos, y en la que el nivel de similitud con la proteína de tipo natural es de al menos un 80%, preferentemente al menos un 85% y más preferentemente al menos un 90%.

El término “condiciones de estrés artificiales”, tal como se usa en la presente memoria descriptiva se refiere a condiciones que imitan las condiciones de estrés medioambiental que pueden afectar a la planta de interés. Esto excluye específicamente la resistencia a antibióticos o biocidas.

Descripción detallada de la invención

Los presentes inventores han determinado, en experimentos en los que se analizaron diez líneas transgénicas independientes para cada construcción de la siguiente tabla 1, que se observa un aumento del contenido en trehalosa cuando en plantas transgénicas se expresan determinados alelos truncados de la planta TPS (Δ iNAtTPS1 y Δ NSITPS1 de ahora en adelante se refieren al truncamiento de la región aminoterminal correspondiente a los aminoácidos 100 ó 88 de *Arabidopsis thaliana* (At) y *Selaginella lepidophylla*, respectivamente). La siguiente tabla 1 indica el contenido de trehalosa en las plantas At transgénicas. Como puede observarse, las plantas At, que sobreexpresan el gen *AtTPS1* completo son muy similares o indistinguibles de las de tipo natural. Adicionalmente, el gradiente dependiente de gen

ES 2 312 561 T3

observado de las alteraciones morfológicas (Δ NSITPS1> Δ NAAtTPS1>SITPS1>AtTPS1) está muy relacionado con los niveles de trehalosa de las líneas transgénicas de cada construcción génica.

TABLA 1

Construcción	Trehalosa μ g/g	
	-validomicina	+validomicina
AtTPS1	99 - 261	178 - 358
Δ NAAtTPS1	133 - 934	225 - 5974
SITPS1	122 - 405	373 - 8586
Δ NSITPS1	229 - 3645	369 - 53164
Antisentido AtTPS1	39 - 63	97 - 146
Tipo natural	27 - 47	36 - 77

En una forma de realización, la presente invención se refiere a proteínas de trehalosa fosfato sintasa que, cuando se superexpresan en una planta, aumentan la resistencia o la tolerancia de dicha planta a factores medioambientales tales como la temperatura (frío o calor), la presión osmótica (sequía, salinidad) y similares, así como otras condiciones de estrés artificiales. Los genes correspondientes se utilizan de este modo como marcadores de selección para la transformación de una planta con un gen foráneo. Preferentemente, los genes de resistencia al estrés de la trehalosa fosfato sintasa, después de su superexpresión no provocan ningún efecto fenotípico. Sin embargo, las diferencias fenotípicas pueden tolerarse cuando las plantas transformadas después de su recogida se procesen de modo que el fenotipo modificado no sea apreciable. El gen de resistencia al estrés usado como marcador de selección puede obtenerse a partir de la misma especie de planta que se va a producir o transformar. Sin embargo, también se pueden usar los genes de otras especies de plantas, p. ej., que hacen que la planta sea más resistente después de su superexpresión. Los genes procariotas como por ejemplo los genes bacterianos, tengan o no un homólogo funcional en los organismos superiores como las plantas, no entran dentro del alcance de la presente invención. Preferentemente, el gen de tolerancia al estrés que se vaya a utilizar como marcador de selección codifica la trehalosa fosfato sintasa no troncada, sin embargo otras muchas secuencias nucleotídicas pueden estar incluidas en el alcance de la presente invención tal como se explicará más adelante. En otra forma de realización, la presente invención se refiere a los vectores y kits biológicos para la producción o transformación de plantas que contengan una secuencia nucleotídica que codifique una proteína de resistencia al estrés trehalosa fosfato sintasa. Preferentemente, estos vectores son para la transfección de *Agrobacterium tumefaciens*. Los métodos de transfección, así como otros métodos biológicos aplicables, resultan muy conocidos para los expertos en la materia y están descritos, por ejemplo por E. Galun en *The manufacture of Medical and Health Products by Transgenic Plants* (Imperial College Press, 2001).

Muy específicamente, la presente invención se refiere al uso de un gen homólogo de la trehalosa-6-fosfato sintasa o un fragmento con el extremo aminoterminal del mismo troncado como marcador de selección para la transformación de plantas. La presente invención se refiere también al uso de un gen heterólogo de la trehalosa-6-fosfato sintasa natural o un fragmento del mismo como marcador de selección para la transformación de plantas. La presente invención se refiere también al uso del extremo aminoterminal de un gen homólogo o heterólogo de la trehalosa-6-fosfato sintasa como marcador de selección para la transformación de plantas.

Según una forma de realización, la presente invención se refiere a la producción de una planta transgénica o una célula vegetal transgénica con un aumento de la resistencia al estrés bajo unas condiciones de estrés medioambientales o artificiales, con un método que comprende las etapas de:

- a) transformación de una parte de una planta o una población de células vegetales con una secuencia nucleotídica que comprende (i) una primera secuencia nucleotídica que codifica una trehalosa fosfato sintasa o una homóloga de la misma, o un parte catalíticamente activa de dicha proteína, estando dicha secuencia unida operativamente a un promotor y (ii) uno o más sitios de restricción que comprenden una segunda secuencia nucleotídica,
- b) aplicación de las condiciones de estrés medioambientales o artificiales a la planta transformada o a la población celular vegetal obtenida en la etapa (a), o su descendencia, y
- c) selección, de la planta o de la población celular vegetal transformada colocada bajo las condiciones de estrés medioambientales o artificiales de la etapa (b), la parte de la planta o de la población celular vegetal transformada que presenta un aumento a la resistencia al estrés bajo dichas condiciones de estrés medioambientales o artificiales.

ES 2 312 561 T3

Preferentemente, dicha trehalosa fosfato sintasa, su homóloga o una parte catalíticamente activa de la misma, se selecciona como proteína que no altera el fenotipo de la planta transformada respecto a las propiedades o características que nos sean las de resistencia al estrés.

5 La segunda secuencia nucleotídica que se usará en el método anterior no es un parámetro crítico de la presente invención. Por ejemplo, puede ser una secuencia nucleotídica que codifique un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo (como un fragmento variable de cadena sencilla, un fragmento F_{ab} y un $F_{(ab)'}_2$), o una región determinante de complementariedad), un antígeno, una proteína terapéutica, un inhibidor enzimático, una citocina, un factor de crecimiento, una hormona peptídica, una proteasa, un enzima o un producto enzimático de los mismos.

10 Como se describe anteriormente en la presente memoria descriptiva, la presencia de la primera secuencia nucleotídica actúa como un marcador para (es decir, indicativo de) la presencia de una segunda secuencia nucleotídica en la planta transgénica o célula vegetal transgénica con un aumento de la resistencia al estrés. Preferentemente, la primera secuencia nucleotídica y la segunda secuencia nucleotídica se integran en el genoma de dicha planta transgénica o célula vegetal transgénica con un aumento de la resistencia al estrés.

20 Cuando en el método de la presente invención se usa una parte activa de una proteína trehalosa fosfato sintasa, puede ser el extremo aminoterminal truncado o el extremo carboxiterminal truncado de dicha proteína. Según una forma de realización preferida de la invención, dicha proteína eucariótica de resistencia al estrés es un enzima que cataliza la producción de un fosfato de azúcar, un fosfato de glicerol o un fosfato de azúcar-alcohol, como la trehalosa-6-fosfato sintasa (TPS). Más preferentemente, la primera secuencia nucleotídica usada en el método de la presente invención es una que codifica una trehalosa-6-fosfato sintasa truncada.

Sólo a título ilustrativo, se incluyen otros ejemplos de proteínas eucarióticas de resistencia al estrés:

- 25 - la proteína NHX1 revisada por Zhang *et al.*, en Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU (2001) 98:12832-6,
- proteínas de choque térmico como las revisadas por Sun *et al.*, en Plant J. (2001) 27:407-15,
- 30 - la proteína AVPI1 revisada por Gaxiola *et al.*, en Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. (2001) 98:11444-9,
- la proteína NCED revisada por Luchi *et al.*, en Plant J. (2001) 27:325-333,
- 35 - la proteína APX1 revisada por Shi *et al.*, en Gene (2001) 273:23-7,
- la proteína APX3 revisada por Wang *et al.*, en Plant Cell Physiol. (1999) 40:725-32,
- la proteína BiP (proteína de unión) revisada por Alvimetal. en Plant Physiol. (2001) 126:1042-54,
- 40 - la proteína OASTL revisada por Youssefian *et al.*, en Plant Physiol. (2001) 126:1001-11,
- la proteína DREB1 revisada por Yamaguchi-Shinozaki *et al.*, en Novartis Found. Symp. (2001) 236: 176-86,
- 45 - la proteína SCOF1 (una proteína de dedos de zinc inducible por frío) revisada por Kim *et al.*, en Plant J. (2001) 25: 247-59,
- la proteína GST/GPX revisada por Roxas *et al.*, en Plant Cell Physiol. (2000) 41:1229-34,
- 50 - la proteína GS2 revisada por Hoshida *et al.*, en Plant Mol. Biol. (2000) 43:103-11,
- la proteína HAL1 revisada por Gisbert *et al.*, en Plant Physiol. (2000) 123:393-402,
- la proteína PRP2 revisada por Winicov en Planta (2000) 210:416-22, y
- 55 - la proteína SAT revisada por Blaszczyk *et al.*, en Plant J. (1999) 20:237-243.

60 La primera secuencia nucleotídica puede codificar también una proteína quimérica que combine dominios de las proteínas trehalosa fosfato sintasa de resistencia al estrés de dos o más especies vegetales diferentes.

65 Para un rendimiento satisfactorio del método de la presente invención, por ejemplo cuando la proteína eucariótica de resistencia al estrés es un enzima que cataliza la producción de un fosfato de azúcar, un fosfato de glicerol o un fosfato de azúcar-glicerol, más particularmente, la trehalosa fosfato sintasa, las condiciones de estrés aplicadas en la etapa (b) del método son preferentemente condiciones de estrés inducidas poniendo en contacto la planta transformada o la población celular vegetal obtenida en la etapa (a), o su progenie, con un medio con un alto contenido de un azúcar, un azúcar-alcohol o un glicerol, como por ejemplo sacarosa (o sucrosa), es decir, de aproximadamente 3 a 8% en peso y más preferentemente de 4 a 7% en peso.

La primera secuencia nucleotídica usada en el método de la invención puede proceder de una planta o una levadura. La elección de la planta o levadura pertinente para este propósito no es un parámetro crítico de la presente invención. Las plantas idóneas para este propósito incluyen, entre otras, plantas dicotiledóneas como el tabaco (*Nicotiana tabacum*), soja (*Glycine max*), manzana, remolacha azucarera, *Arabidopsis thaliana*, alfalfa, petunia, algodón, zanahoria, apio, col, pepino, pimienta, canola, tomate, patata, lenteja, lino, brócoli, frijol, lechuga, colza, coliflor, espinaca, col de bruselas, alcachofa, guisante, quingombó, calabacín, col rizada, berza, té, café y *Selaginella lepidophylla*. Se incluyen también las plantas monocotiledóneas como arroz *Oryza sativa*, cereales, cebada, maíz, girasol (*Helianthus annuus*), trigo, avena, mijo, sorgo, amaranto, cebolla, espárrago y caña de azúcar. Una levadura original idónea para la primera secuencia nucleotídica es *Saccharomyces cerevisiae*.

El promotor al que se une funcionalmente la primera secuencia nucleotídica no es un parámetro crítico de la presente invención. Puede ser un promotor constitutivo, un promotor inducible o un promotor específico de tejido, siendo estas categorías muy conocidas para los expertos en la materia con ventajas particulares en determinados casos. Un ejemplo preferente comercialmente disponible de promotor constitutivo idóneo es el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV). Un ejemplo muy conocido de un promotor vegetal que cause una expresión específica en órganos de reserva es el promotor de la patatina. Algunos ejemplos de promotores vegetales inducidos por estrés incluyen el promotor LTI78 (descrito por Nordin *et al.*, en *Plant Mol. Biol.* (1993) 21: 641-653) y el promotor RAB18 (descrito por Lang *et al.*, en *Plant Mol. Biol.* (1992) 20: 951-962).

Ahora abordaremos más detalladamente algunos aspectos de la selección del promotor, en referencia al caso específico en el que la primera secuencia nucleotídica codifica una trehalosa-6-fosfato sintasa. Aunque se espera que la acumulación de trehalosa en determinados momentos (p. ej., durante la exposición a estrés o en una planta madura) y en determinados tejidos (p. ej., órganos de reserva o, en momentos apropiados, tejidos sensibles al frío) que sea beneficioso, o al menos que no sea perjudicial para la planta, existe la posibilidad de que otras veces y en otros tejidos, la acumulación de trehalosa pueda ser perjudicial para la planta, tal y como se describen Veluthambi *et al.*, en *Plant Physiol.* (1981) 68: 1369-1374. Puede que sea ventajoso usar un promotor vegetal que no permita una expresión total del gen que causa la síntesis de la trehalosa, hasta que la planta sea madura o se encuentre en las condiciones medioambientales, incluyendo sequía y baja temperatura, en las que los beneficios de la trehalosa superen a las posibles desventajas para la planta. Algunos ejemplos de dichos promotores no constitutivos son muy conocidos para los expertos en la materia, e incluyen el promotor de la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa (Rubisco), descrito por Krebbers *et al.*, en *Plant Mol. Biol.* (1988) 11:745-759. Por otro lado, el uso de promotores inducidos por estrés evitará la acumulación de trehalosa hasta que sea necesario. En plantas que pueden crecer con un contenido de trehalosa, la presente invención se puede llevar a cabo sin recurrir a un promotor inducido por estrés, sin embargo, el uso de promotores inducidos por estrés para evitar la producción de trehalosa hasta que sea necesaria tiene la ventaja adicional de evitar las consecuencias de la producción que en caso contrario ocurrirían por la desviación de la capacidad fotosintética a la síntesis de trehalosa.

Existen diferentes formas, todas conocidas por los expertos en la materia, de realizar la etapa (a) de transformación del método de la invención, que incluyen la práctica de la transformación genética en la que interviene *Agrobacterium tumefaciens* y el método de transformación biolística, descritas brevemente ambas por, *E. Galun* (citado anteriormente).

La planta o la población celular vegetal que se transforma en la etapa (a) del método de la presente invención no es un parámetro crítico de la presente invención. Puede ser por ejemplo una planta dicotiledónea como el tabaco (*Nicotiana tabacum*), soja (*Glycine max*), manzana, remolacha azucarera, *Arabidopsis thaliana*, alfalfa, petunia, algodón, zanahoria, apio, col, pepino, pimienta, canola, tomate, patata, lenteja, lino, brócoli, frijol, lechuga, colza, coliflor, espinaca, col de bruselas, alcachofa, guisante, quingombó, calabacín, col rizada, berza, té, café y *Selaginella lepidophylla*. Puede ser también una planta monocotiledónea como el arroz *Oryza sativa*, cereales, cebada, maíz, girasol (*Helianthus annuus*), trigo, avena, mijo, sorgo, amaranto, cebolla, espárrago y caña de azúcar.

Según otra forma de realización, la presente invención se refiere a una planta transgénica o una parte de la misma, una semilla de una planta transgénica o una célula de una planta transgénica que se puede obtener mediante el método de producción descrito anteriormente. En términos de producto, puede describirse en líneas generales como una planta transgénica o una parte de la misma, una semilla de una planta transgénica o una células de una planta transgénica que tiene integrado en su genoma (i) una primera secuencia nucleotídica que codifica una trehalosa fosfato sintasa o una homóloga de la misma, o un parte catalíticamente activa de dicha proteína, estando dicha secuencia unida operativamente a un promotor y (ii) una segunda secuencia nucleotídica. Sus diversos componentes, es decir, la primera secuencia nucleotídica que codifica una proteína trehalosa fosfato sintasa (una homóloga o una parte catalíticamente activa de la misma), el promotor y la segunda secuencia nucleotídica, se han descrito con detalle en lo que respecta al método de producción, por lo que no existe la necesidad de volver a repetir su significado.

En otra forma de realización, el método de producción de la presente invención puede hacer uso de un vector que puede describirse en líneas generales como uno que comprende (i) una primera secuencia nucleotídica que codifica una trehalosa fosfato sintasa o una homóloga de la misma, o un parte catalíticamente activa de dicha proteína, estando dicha secuencia unida funcionalmente a un promotor y (ii) uno o más sitios de restricción para la inserción de una segunda secuencia nucleotídica. En otra forma de realización adicional, el método de producción de la presente invención puede hacer uso de un kit biológico específico y puede describirse en términos generales como uno que comprende (1) un vector como el previamente descrito y (2) una o más secuencias nucleotídicas a partir de las cuales se puede

ES 2 312 561 T3

analizar la inserción de la primera secuencia nucleotídica y/o la segunda secuencia nucleotídica en el genoma de la planta transgénica o de la célula de la planta transgénica. Dicho análisis puede realizarse mediante métodos como la hibridación por inmunotransferencia de tipo Southern con secuencias de vectores o promotores de PCR, por ejemplo, sitios de restricción flanqueadores en los se clonó el transgen o mediante promotores internos o adyacentes al gen introducido de resistencia al estrés, por ejemplo la SEC. ID. N° 1 o la SEC. ID. N° 2 descritas en el ejemplo 4. Los distintos términos que se usan en la definición del vector o del kit biológico de la presente invención se usan en la presente memoria descriptiva con el mismo significado que en la parte de la especificación dedicada al método de producción.

Tal como los expertos en la materia podrán comprender, la presente invención presenta una ventaja significativa en términos de tecnología respetuosa con el medio ambiente al evitar el uso de marcadores de resistencia a antibióticos o biocidas.

A continuación se describirá e ilustrará la presente invención mediante un número limitado de ejemplos que no deben interpretarse sin embargo como una limitación del alcance de la invención.

Ejemplo 1

Superexpresión en A. thaliana del extremo aminoterminal de AtTPS1

Existen varias líneas transgénicas de *A. thaliana* que superexpresan Δ NSITPS1, Δ NAitPS1, SITPS1 o AtTPS1 cuando germinan en presencia de medios ricos en glucosa (es decir un 6% en peso). Además, se generaron varias líneas transgénicas antisentido AtTPS1 y se analizaron consecuentemente. Las plantas se germinaron con una luz constante y a 23°C. Una semana después se observó una diferencia notable entre las plantas de tipo natural y las de cadena complementaria, por un lado y la superexpresión de los alelos TPS1 de la planta por el otro. Estas últimas plantas tienen una germinación normal, elongación del hipocotilo, virescencia y expansión de las hojas cotiledóneas en medios con mucha glucosa. Por el contrario, la planta de tipo natural tenía un aspecto blanco y eran mucho más pequeñas. Las líneas transgénicas que expresaron el AtTPS1 de la cadena complementaria fueron incluso más pequeñas y germinaron a menor velocidad que las de tipo natural. En un medio normal (es decir, 1% en peso de glucosa) todas las plantas que albergaban las diferentes construcciones de planta TPS1 parecían normales y no se observaron diferencias significativas entre las mismas.

El fenotipo insensible a la glucosa fue más destacable en las plantas que superexpresaban el alelo AtTPS1, lo que sugiere que la presencia del extremo aminoterminal cuando el gen TPS1 superexpresado pertenece a la planta homóloga, es un elemento clave en las propiedades de percepción de glucosa de la proteína de planta TPS1. Este fenotipo insensible a la glucosa no está necesariamente asociado a la síntesis de trehalosa, es decir, puede que no exista una correlación entre la acumulación de altos niveles de trehalosa y la severidad del fenotipo de insensibilidad a la glucosa. Una posible explicación puede ser que la propia superexpresión en *A. thaliana* del extremo aminoterminal de AtTPS1 imita parte del fenotipo de insensibilidad a la glucosa. De este modo, estos datos sugieren que la proteína TPS1 como tal, tiene un papel regulador en el control de la percepción de la glucosa en las plantas y una parte importante de este fenómeno está asociado con este extremo aminoterminal.

Ejemplo 2

La planta TPS confiere una adaptación al crecimiento en medios con poco fosfato

La superexpresión de los genes TPS en las plantas provoca la acumulación de trehalosa como resultado de la ruptura de la trehalosa-6-fosfato por una fosfatasa endógena. La manipulación de esta ruta metabólica produce un fosfato inorgánico como subproducto. Por lo tanto, analizamos el comportamiento de plantas transgénicas que albergaban varias construcciones TPS de plantas en medios con altas y bajas concentraciones de fosfato. En los siguientes experimentos, medios con altas concentraciones de fosfato significan un medio MS (es decir con Na₂PO₄ 1 mM) mientras que medios con bajas concentraciones de fosfato sólo tienen Na₂PO₄ 1 µM tal y como describieron Lopez-Bucio *et al.*, en *Nature Biotechnol.* (2000) 18: 450-453. Para observar las diferencias de crecimiento, las plantas crecieron durante tres semanas con 16 horas de luz a 23°C. Las plantas transgénicas que superexpresan homólogos de TPS1 fueron capaces de crecer en medios con bajas concentraciones de fosfato a una tasa normal sin ninguna alteración morfológica evidente, mientras que las plantas de tipo natural mostraron un serio retardo en el crecimiento (tamaño reducido aproximadamente un 25-35% del tamaño normal) y un aumento de la coloración marrón, característica de una privación de fosfato según Raghatoma en *Current Op. Plant Biol.* (2000) 3:182-187. Las líneas transgénicas que expresan el gen AtTPS1 de la cadena complementaria fueron mucho más sensibles a las bajas concentraciones de fosfato que las de tipo natural.

Como en el ejemplo 1, las líneas transgénicas que superexpresan AtTPS1 mostraron un mejor rendimiento en medios con bajas concentraciones de fosfato. Por lo tanto, a partir de estos datos se puede concluir que la proteína TPS1 de planta que contiene preferentemente el extremo aminoterminal intacto está implicada de algún modo en la acumulación del fosfato inorgánico (Pi) a través de un mecanismo regulador que no está necesariamente vinculado a la liberación de Pi por la desfosforilación de la trehalosa-6-fosfato.

ES 2 312 561 T3

Ejemplo 3

Construcción de un vector con un marcador de selección

5 Para usar el gen *AtTPS1* como marcador en un vector binario, se preparó un constructo pTPSM. El vector pTPSM se obtiene a partir del pBIN 19 sin el gen de resistencia a kanamicina (*NptII*). Al igual que el pIBT/01, pTPSM contiene el ADNc de *AtTPS1* bajo el control del promotor 35S en el ADN-T, como se muestra en la figura 1. El vector pTMS se preparó en varias etapas: pBN35 es un vector pBIN19 con el promotor 35S y la secuencia de terminación Nos sin el ADNc entre ellos. El gen *NptII* de pBN35 se eliminó cortando el vector con *ApaI* y *NheI* y después de la actividad polimerasa de T4 religando el resto del vector resultando el pEBN35. Después *AtTPS1* se cortó del vector pIBT/01 usando una doble digestión *KpnI* y *XbaI* y, después de una primera ligación en pBLuscript, *AtTPS1* se subclonó entre los sitios *KpnI* y *XbaI* de pEBN35S, resultando el constructo pTPSM. Este vector puede mejorarse aún más agregando más sitios de restricción únicos en el ADN-T para subclonar un gen de interés específico.

15 Ejemplo 4

Selección de las plantas transgénicas

20 Se transformó *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 con el pIBT/01 o pTPSM por electroporación. Las plantas de *Arabidopsis* crecieron hasta la floración y se transformaron usando el método de inmersión floral descrito por Desfeux *et al.*, en *Plant Phys.* (2000) 23:895. Se recogieron las semillas maduras de las plantas transformadas, se secaron a 23°C durante dos semanas y después se conservaron a 4°C.

25 Para seleccionar las semillas transgénicas de un grupo de semillas no transformadas, primero se esterilizaron con vapor, después se agregó agua estéril a las semillas, y se incubaron con luz constante a 4°C durante 24 horas. El medio de crecimiento estaba formado por Murashige 1X y sales Skoog y una mezcla de vitaminas (comercialmente disponible en Life Technologies); MES 2,5 mM a pH 5,7 ajustado con KOH, fitoagar 0,8% y 6% de glucosa antes de verter en las placas (la glucosa se esterilizó al autoclave por separado a partir del resto del medio). Las semillas se dispersaron en placas en baja densidad (es decir un máximo de 2000 semillas por placa de 145 mm de diámetro) usando 2-3 ml de H₂O (0,1% de agar o agarosa para enmascarar la sensibilidad a la glucosa de las semillas de tipo natural), se puede usar papel de filtro (Whatman N.º 1) para evitar que las semillas se peguen entre sí. Las semillas aisladas percibieron el mismo nivel de glucosa, acentuando la diferencia entre las transgénicas y las de tipo natural. Las condiciones de crecimiento de las plantas fueron 22°C y 24 horas de luz. Las placas de Petri se cerraron para mantener unos niveles de humedad altos. Las semillas se incubaron en dichas condiciones de crecimiento durante 5 a 35 7 días.

Las plantas seleccionadas crecieron durante 2 ó 3 semanas en tierra. Las hojas se usaron para preparar el ADN genómico, el análisis por PCR se realizó usando los siguientes promotores, con una temperatura de hibridación de 56°C.

35S directo: AAGAAGACGTTCCAACCACG [SEC. ID N° 1]

AtTPS1 reverso: CGCTCAGAACAACACTATGGTT [SEC. ID. N° 2]

45 Ejemplo 5

Recuperación de las plantas transformadas a partir de una gran población de semillas

50 Para optimizar las condiciones para la selección de las plantas *Arabidopsis* transgénicas usando el marcador de selección *AtTPS1*, se preparó inicialmente una mezcla con 1000 veces más de semillas naturales que las líneas ya disponibles que superexpresan *35SAAtTPS1* que han sido transformadas con el vector pIBT/01. La mezcla de semillas se esterilizó y se sometió a vernalización durante 24 horas a 4°C con luz constante. El medio con Murashige 1X y Skoog se enriqueció con un 6% de glucosa. La mezcla de semillas se sembró a una concentración de 2000 semillas por placa (145 mm de diámetro) usando agua. Las plantas germinaron a 22°C con luz constante. 6 días después de la siembra, se tomaron fotografías de una fracción de las plantas (figura 2A y 2B). Bajo estas condiciones, las plántulas de *Arabidopsis* de tipo natural continuaron blancas y pequeñas, mientras que las plántulas transformadas con *35SAAtTPS1* presentaba un aspecto sano con cotiledones verdes y más grandes.

60 Se analizó la plántula más grande, tal como se muestra en la figura 2, para comprobar la presencia del casete *35SAAtTPS1* mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando el ADN genómico como molde. El promotor directo situado cerca del extremo del promotor 35S y el promotor inverso en una región específica de la secuencia de *AtTPS1* permite la amplificación de un producto de 2132 pb. Se obtuvo un producto de PCR con el tamaño teórico cuando se uso como molde el ADN de la plántula seleccionada como se muestra en la figura 2C, lo que confirma que 65 la plántula seleccionada incorporaba efectivamente el gen *35SAAtTPS1* en su genoma.

Para evaluar la fiabilidad de la selección realizada, se aumento la escala del experimento. Se sembraron aproximadamente 4000 semillas en un medio MS con un 6% de glucosa. Seis días después, se seleccionaron las plántulas más

ES 2 312 561 T3

grandes con cotiledones verdes de entre las plántulas blancas y pequeñas. El análisis de PCR demostró que más del 80% de las plántulas seleccionadas contenía el casete 35SA t TPS1 tal y como se muestra en la figura 3.

Ejemplo 6

Uso del gen TPS de arabidopsis como marcador de selección para plantas de tabaco transformadas

Las semillas de *Nicotiana tabacum* que tenían el ADNc de 35SA t TPS1 en su genoma, germinaron más rápido en un medio con mucha glucosa siendo por lo tanto menos sensibles a la glucosa que las semillas naturales, tal como se muestra en la tabla 2 siguiente, que indica que el porcentaje de germinación en un medio con un 6% en peso de glucosa, 10, 11 y 12 días después de la siembra, respectivamente. Las plántulas de tipo natural no fueron más blancas, pero si más pequeñas que las plantas transgénicas tal y como se muestra en la figura 4. Incluso aunque pueda necesitarse un protocolo de transformación diferente para *N. tabacum* en comparación con *A. thaliana*, el ajuste de las condiciones también permite seleccionar plantas transgénicas de tabaco en un medio con glucosa.

TABLA 2

	Día 10	Día 11	Día 12
Nt WT	0	13,6	63,6
Nt (35SA t TPS1) .05	23,5	59	82,4
Nt (35SA t TPS1) .19	39	55,5	77,8

Referencias citadas en la descripción

La lista de referencias citadas por el solicitante es sólo para comodidad del lector. No forma parte del documento de patente europea. Incluso aunque se ha dedicado un enorme tiempo para compilar las referencias, no puede excluirse algún error u omisión, y la OEP renuncia a cualquier responsabilidad a este respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- WO 0022141 A [0004]
- GB 0100105 A [0052]

Documentos de patente citados en la descripción

- VAN AELST *et al. Mol. Microbiol.*, 1993, vol. 8, 927-943 [0003]
- THEVELEIN. *Trends Biochem. Science*, 1995, vol. 2, 410-418 [0003]
- VAN VAECK *et al. Biochem. J.*, 2001, vol. 353, 157-162 [0003]
- BLÁZQUEZ *et al. Plant J.*, 1998, vol. 13, 685-689 [0004]
- ZENTELLA *et al. Plant Physiol.*, 1999, vol. 119, 1473-1482 [0004]
- SHEEN *et al. Curr. Op. Plant Biol.*, 1999, vol. 2, 410-418 [0005]
- JANG *et al. Plant Cell.* 1997, vol. 9, 5-19 [0005]
- YODER *et al. Biotechnology*, 1994, vol. 12, 263-267 [0009]
- LAMTHAM *et al. Nature Biotechnology* 2000, vol. 18, 1172-1176 [0009]
- MILES *et al. Gene*, 1984, vol. 32, 41-48 [0011]
- STOOP *et al. Plant Physiology*, 1993; vol. 103, 1001-1008 [0011]
- ZHANG *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001, vol. 98, 12832-6 [0028]
- SUN *et al. Plant J.*, 2001, vol. 27, 407-15 [0028]
- GAXIOLA *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA;* 2001, vol. 98, 11444-9 [0028]

ES 2 312 561 T3

- **LUCHI** *et al. Plant J.*, 2001, vol. 27, 325-333 [0028]
- **SHI** *et al. Gene*, 2001, vol. 273, 23-7 [0028]
- 5 • **WANG** *et al. Cell Physiol.* 1999, vol. 40, 725-32 [0028]
- **ALVIM** *et al. Plant Physiol.*, 2001, vol. 126, 1042-54 [0028]
- **YOUSSEFIAN** *et al. Plant Physiol.*, 2001, vol. 126, 1001-11 [0028]
- 10 • **YAMAGUCHI-SHINOZAKI** *et al. Novartis Found. Symp.*, 2001, vol. 236, 176-86 [0028]
- **KIM** *et al. Plant J.* 2001, vol. 25 247-59 [0028]
- 15 • **ROXAS** *et al. Plant Cell Physiol.*, 2000, vol. 41, 1229-34 [0028]
- **HOSHIDA** *et al. Plant Mol. Biol.*, 2000, vol. 43, 103-11 [0028]
- **GISBERT** *et al. Plant Physiol.* 2000, vol. 123, 393-402 [0028]
- 20 • **WINICOV**. *Planta*, 2000, vol 210, 416-22 [0028]
- **BLASZCZYK** *et al. Plant J.* 1999, vol 20, 237-243 [0028]
- 25 • **NORDIN** *et al. Plant Mol Biol.*, 1993, vol. 21.641-653 [0032]
- **LANG** *et al. Plant Mol Biol.*, 1992, vol. 20, 951-962 (0032)
- **VELUTHAMBI** *et al. Plant Physiol.*, 1981, vol 68, 1369-1374 [0033]
- 30 • **KREBBERS** *et al. Plant Mol. Biol.*, 1988, vol 11, 745-759 [0033]
- **LÓPEZ-BUCIO** *et al. Nature Biotechnol.*, 2000, vol. 18, 450-453 [0042]
- 35 • **RAGHATOMA**. *Current Op. Plant Biol.*, 2000, vol. 3, 182-187 [0042]
- **DESFEUX** *et al. Plant Phys.*, 2000, vol. 23, 895 [0045].

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Método para obtener una planta transgénica o una célula de una planta transgénica que comprende una segunda secuencia nucleotídica, comprendiendo dicho método las etapas de:

- 10 a) transformación de una parte de una planta o una población de células vegetales con una secuencia nucleotídica que comprende (i) una primera secuencia nucleotídica que codifica una trehalosa fosfato sintasa, un homólogo, o un parte catalíticamente activa de dicha trehalosa fosfato sintasa, estando dicha primera secuencia nucleotídica unida funcionalmente a un promotor y (ii) uno o más sitios de restricción que comprenden dicha segunda secuencia nucleotídica,
- 15 b) aplicación de las condiciones de estrés medioambientales o artificiales a la planta transformada o a la población celular vegetal obtenida en la etapa (a), o su descendencia, y
- c) selección, a partir de la planta o de la población celular vegetal transformada colocada en las condiciones de estrés medioambientales o artificiales de la etapa (b), la parte de la planta o de la población celular vegetal transformada que presenta un aumento a la resistencia al estrés en dichas condiciones de estrés medioambientales o artificiales.

20 en el que las condiciones de estrés artificiales excluyen la utilización de antibióticos o biocidas.

2. Método según la reivindicación 1, en el que la expresión de dicha primera secuencia nucleotídica no altera el fenotipo de la planta transformada respecto a las propiedades o características que no sean las de resistencia al estrés.

25 3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicha segunda secuencia nucleotídica codifica un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un antígeno, una proteína terapéutica, un inhibidor enzimático, una citocina, un factor de crecimiento, una hormona peptídica, una proteasa, un enzima o un producto enzimático de la misma.

30 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha primera secuencia nucleotídica y dicha segunda secuencia nucleotídica están integradas en el genoma de dicha planta transgénica o célula vegetal transgénica con un aumento de la resistencia al estrés.

35 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha primera secuencia nucleotídica codifica un fragmento truncado del extremo aminoterminal que comprende la parte catalíticamente activa de dicha trehalosa fosfato sintasa.

40 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dichas condiciones de estrés aplicadas en la etapa (b) son condiciones de estrés artificiales inducidas al poner en contacto la planta transformada o la población de células vegetales obtenidas en la etapa (a), o su descendencia, con un medio que contiene aproximadamente del 3 al 8% en peso de un azúcar, un azúcar-alcohol o un glicerol.

7. Método según la reivindicación 6, en el que dicho azúcar es glucosa.

45 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicha primera secuencia nucleotídica codifica una trehalosa-6-fosfato sintasa no truncada.

9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicha primera secuencia nucleotídica procede de una planta.

50 10. Método según la reivindicación 9, en el que dicha primera secuencia nucleotídica procede de la misma planta que la especie de planta que se está transformando en la etapa (a) o de una especie vegetal diferente de la especie de planta transformada en la etapa (a).

55 11. Método según la reivindicación 9, en el que dicha primera secuencia nucleotídica procede de una planta dicotiledónea.

60 12. Método según la reivindicación 11, en el que dicha planta dicotiledónea se selecciona entre el grupo formado por el tabaco (*Nicotiana tabacum*), soja (*Glycine max*), manzana, remolacha azucarera, *Arabidopsis thaliana*, alfalfa, petunia, algodón, zanahoria, apio, col, pepino, pimienta, canola, tomate, patata, lenteja, lino, brócoli, frijol, lechuga, colza, coliflor, espinaca, col de bruselas, alcachofa, guisante, quingombó, calabacín, col rizada, berza, té, café y *Selaginella lepidophylla*.

65 13. Método según la reivindicación 9, en el que dicha primera secuencia nucleotídica procede de una planta monocotiledónea.

14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicha primera secuencia nucleotídica procede de una levadura.

ES 2 312 561 T3

15. Método según la reivindicación 14, en el que dicha levadura es *Saccharomyces cerevisiae*.

16. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que dicho promotor se selecciona entre el grupo formado por los promotores constitutivos, los promotores inducibles y los promotores específicos de tejido.

5

17. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicha primera secuencia nucleotídica codifica una proteína quimérica que combina diferentes dominios de dicha trehalosa fosfato sintasa de al menos dos especies vegetales diferentes.

10

18. Planta transgénica o una parte de la misma, una semilla de una planta transgénica o una célula de una planta transgénica que se puede obtener mediante el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, **caracterizado** porque dicha trehalosa fosfato sintasa, homóloga o parte catalíticamente activa de la misma, es el único marcador de selección transformado en dicha parte de planta o población celular vegetal.

15

19. Utilización de un gen homólogo de la trehalosa-6-fosfato sintasa o un fragmento con el extremo Aminoterminal truncado del mismo o un gen heterólogo de la trehalosa-6-fosfato sintasa o un fragmento del mismo o el extremo aminoterminal de un gen homólogo o heterólogo de la trehalosa-6-fosfato sintasa como marcador de selección para la transformación de la planta.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1 A

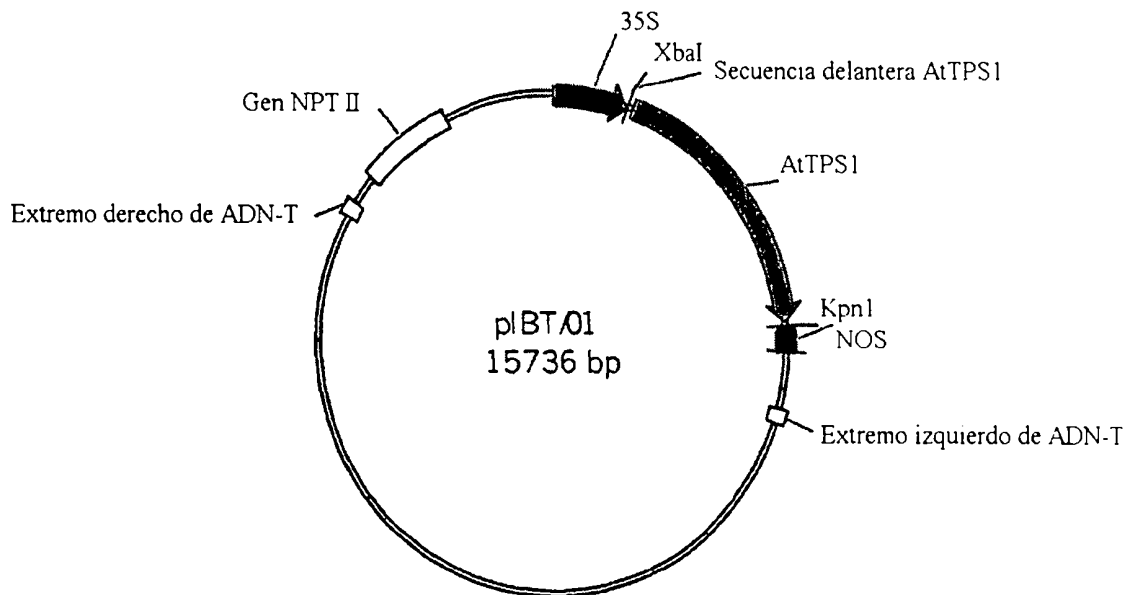
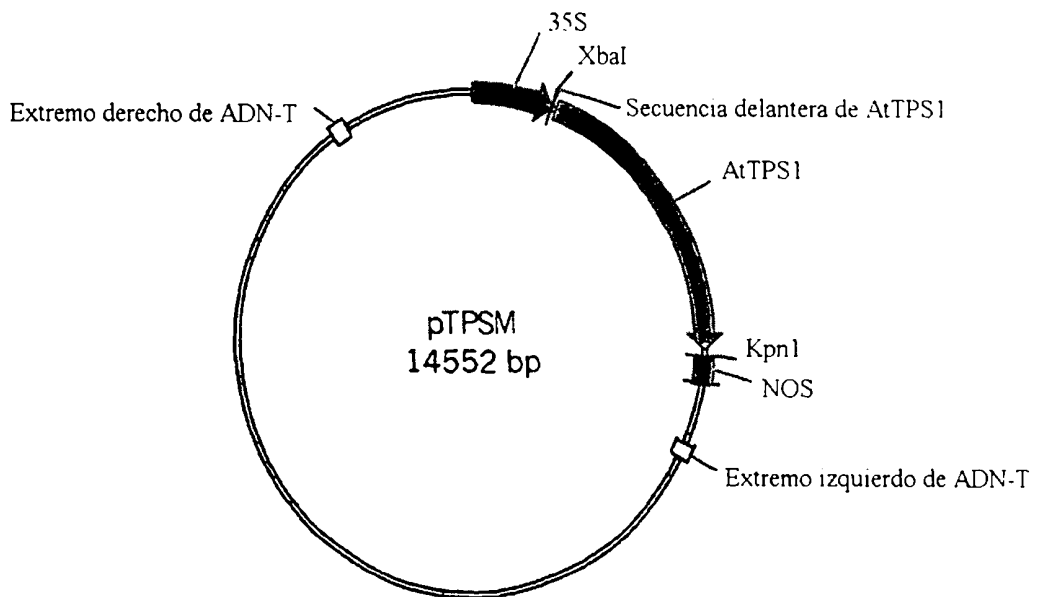


Figura 1 B



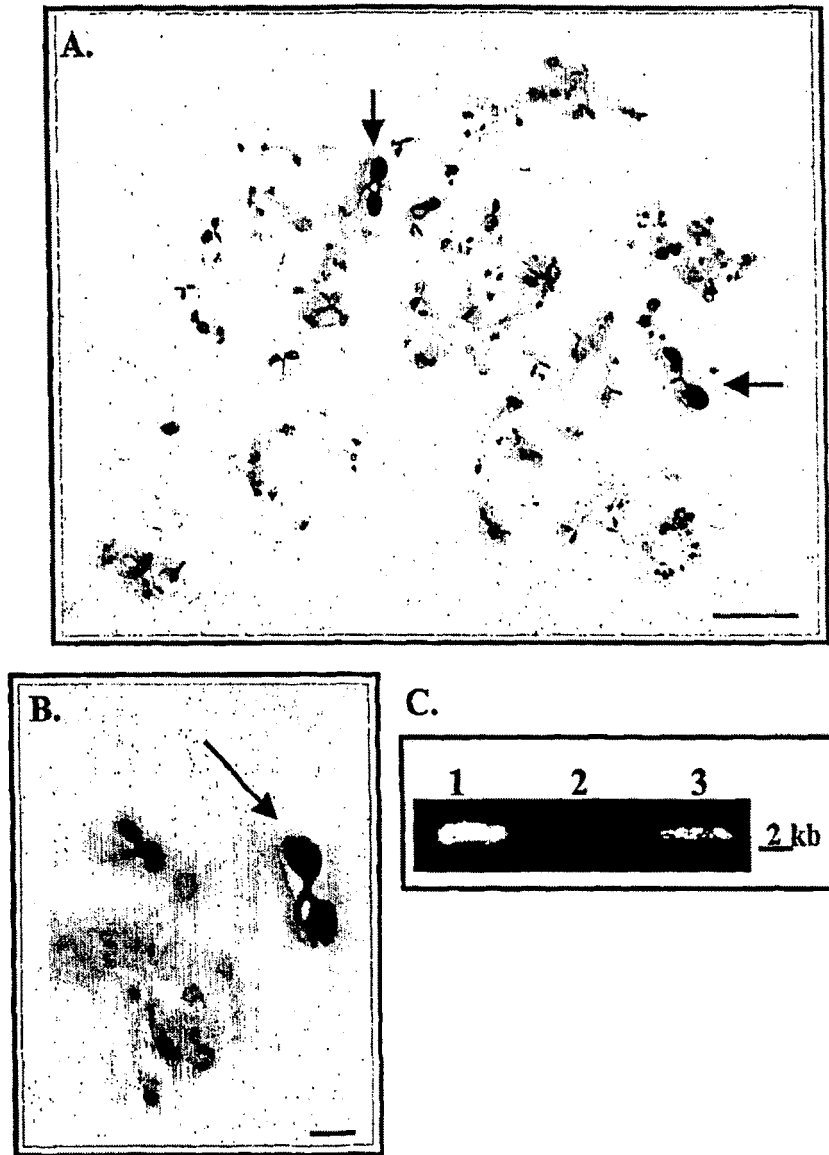


Figura 2

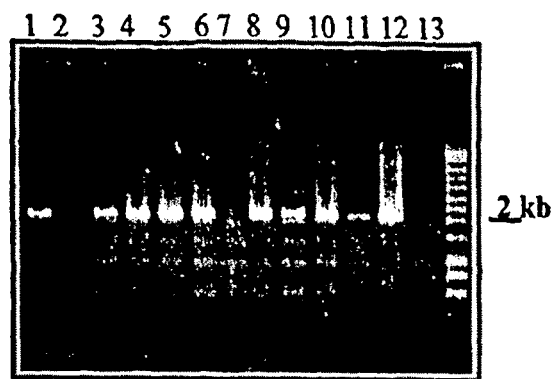


Figura 3

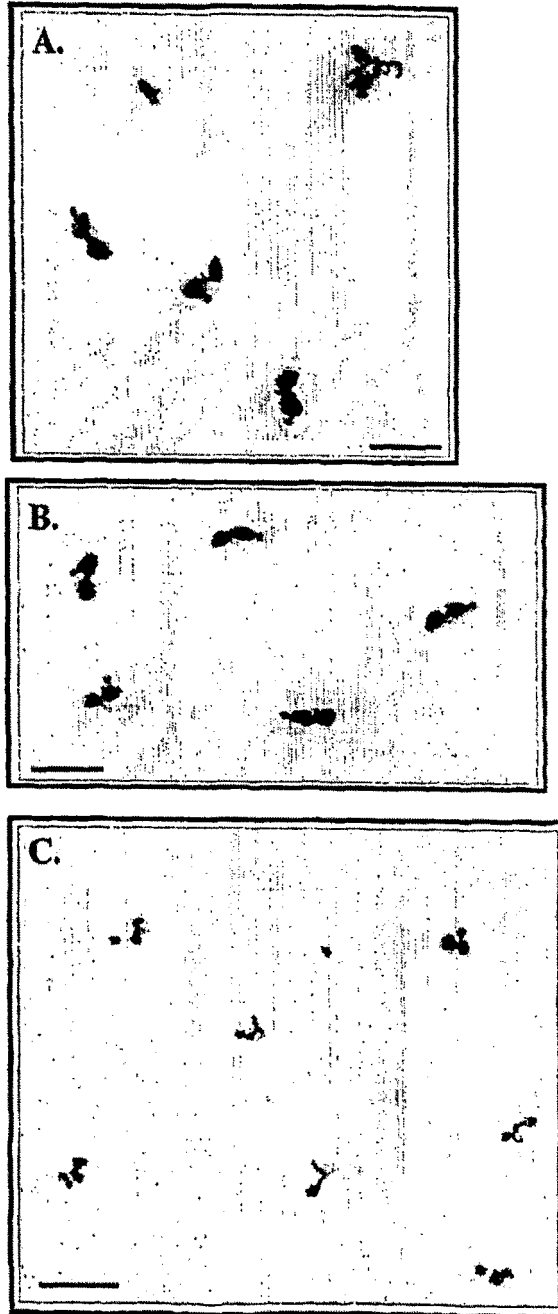


Figura 4

ES 2 312 561 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> K.U.Leuven R&D
Thevelein, Johan
5 Leyman, Barbara
Van Dijck, Patrick
Avonce, Nelson
Iturriaga, Gabriel

<120> producción de plantas transgénicas

<130> K-1932-PCT

<150> UK 0100105.6
15 <151> 2000-01-04

<160> 2

20 <170> Versión de PatentIn 3.1

<210> 1
<211> 20
25 <212> ADN
<213> Virus del mosaico de la coliflor

<220>
30 <221> misc_feature
<223> 35S promotor de PCR

35 <400> 1

aagaagacgt tccaaccacg

20

40 <210> 2
<211> 20
<212> ADN
45 <213> *Arabidopsis thaliana*

<220>
<221> misc_feature
50 <223> AtTPS1 promotor de PCR

<400> 2

55 **cgctcagaac aactatggtt**

20

60

65