



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 079 647**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

C12N 15/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA

T5

96 Número de solicitud europea: **91906203 .4**

96 Fecha de presentación : **01.03.1991**

97 Número de publicación de la solicitud: **0517833**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.12.1992**

54 Título: **Transformación genética y regeneración de la remolacha azucarera.**

30 Prioridad: **02.03.1990 FR 90 02686**
02.03.1990 FR 90 02687

45 Fecha de publicación de la mención y de la
traducción de patente europea: **16.01.1996**

45 Fecha de la publicación de la mención de la
patente europea modificada BOPI: **16.01.2009**

45 Fecha de publicación de la traducción de patente
europea modificada: **16.01.2009**

73 Titular/es: **Bayer BioScience N.V.**
Technologiepark 38
9052 Gent, BE

72 Inventor/es: **Gerentes, Denise;**
Perez, Pascual;
Kallerhoff, Jean;
Ben Tahar, Sophie y
Perret, Joël

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 079 647 T5

DESCRIPCIÓN

Transformación genética y regeneración de la remolacha azucarera.

5 La invención se refiere a un procedimiento de transformación genética de células vegetales que pertenecen a la especie *Beta vulgaris*, seguida eventualmente por una etapa de regeneración de células transformadas en planta entera.

La invención se refiere también a las células transformadas, a los brotes, a las plantas y las semillas transgénicas susceptibles de ser producidas por este procedimiento.

10 La invención se refiere además, a las plantas transgénicas que pertenecen a la especie *Beta vulgaris*, resistentes a la infección por el virus de las nervaduras amarillas y necróticas de la remolacha azucarera (BNYW), que expresa la proteína de la cabeza del BNYVV, o un derivado de esta proteína.

15 Las referencias bibliográficas que aparecen en la descripción de la invención están repertoriadas en forma de bibliografía.

La obtención de plantas transgénicas utiliza la transferencia del fragmento de ADN seleccionado en la célula vegetal, la selección de las células transformadas de forma estable y la regeneración de plantas enteras a partir de las células seleccionadas transformadas.

25 El problema técnico que se planteaba en el momento de la elaboración de la presente invención era encontrar un método de transformación de células de remolacha que presentara una frecuencia de transformación elevada que pudiera ser asociada con éxito a un método de regeneración de planta transgénica. Actualmente, dicho método de transformación y de regeneración no ha sido descrito, impidiendo la producción de remolachas transgénicas que presentan unas características agronómicamente interesantes, tal como la resistencia a la rizomanía.

Actualmente, existen dos grandes vías de transferencia de ADN en las células vegetales.

30 La primera vía es una vía fisicoquímica (electroporación, microinyección, policones, cañón de partículas). En la remolacha, unas células transformadas de manera estable han sido seleccionadas después de electroporación de un gen que codifica para la resistencia a la kanamicina en los protoplastos (Lindsey *et al.*, 1989).

35 Sin embargo, este procedimiento no ha podido conducir nunca a la creación de remolachas transgénicas puesto que la regeneración de plantas a partir de protoplastos no ha podido obtenerse en esta especie.

La segunda vía de transferencia de ADN es una vía biológica que utiliza como vector una bacteria del suelo: *Agrobacterium tumefaciens* o *rhizogenes*.

40 Diferentes cepas de estas dos especies han sido utilizadas con éxito para la transformación de células de remolachas. Estas células transformadas han dado origen o bien a unos tumores con *Agrobacterium tumefaciens* (Krens *et al.*, 1988) o bien a unas raíces con *Agrobacterium rhizogenes* (Yacoub *et al.*, 1987). Estos tejidos transformados (raíces y tumores) no han permitido nunca hasta el presente la regeneración de plantas en la remolacha. Esto viene del hecho de que estos dos fenotipos son los resultados de la integración en el genoma de la célula no solamente del fragmento de ADN deseado sino también de un fragmento de ADN de la bacteria que perturba el equilibrio hormonal de la célula (Akiyoshi *et al.*, 1983). Para paliar estos problemas, estos genes han sido desarmados, dando nuevas cepas de *Agrobacterium* llamadas cepas desarmadas.

45 La utilización de las cepas de *Agrobacterium* desarmadas implica la asociación de un sistema selectivo para la transformación de células vegetales. El éxito en la obtención de transformantes está estrechamente ligado a la puesta a punto de un buen sistema selectivo. El gen selectivo más utilizado en este campo es el que proviene del transposon Tn5 de *Escherichia coli* (Rothstein *et al.*, 1981) que codifica para la neomicina fosfotransferasa (NPT II) que confiere la resistencia a la kanamicina (An *et al.*, 1985).

55 La mayor parte de los vectores plasmídicos utilizados en estas cepas desarmadas contienen en el ADN transferible, además del gen deseado, el gen NPT II, bajo el control de señales de transcripción vegetales (Bevan, 1984; An, 1986). El sistema de selección comprende por una parte el gen que confiere la resistencia, y por otra parte, el agente selectivo. Esto implica determinar las concentraciones de agente selectivo que permiten a la vez matar las células no transformadas y dejar crecer las células transformadas. Los únicos trabajos publicados que se refieren a la selección de células de remolacha después de transformación de explantes pluricelulares por *Agrobacterium* recurren a otro sistema selectivo: higromicina B/higromicina B fosfotransferasa (Harpster *et al.*, 1988).

60 La transformación por *Agrobacterium* necesita en un primer tiempo la elección de un tipo de célula o de un tipo de explante que constituirá el objeto de la transformación. Por ejemplo, unos explantes tales como unos hipocótilos, unos pedazos de hojas (Krens *et al.*, 1988) pueden ser transformados por *Agrobacterium*.

La frecuencia de transformación puede variar según el tipo de célula que haya sido objeto de la transformación, siendo esta variabilidad a menudo de una naturaleza imprevisible.

Cuando tiene lugar la producción de una planta transgénica, la transformación es seguida por un procedimiento de regeneración.

La eficacia de obtención de las plantas transgénicas depende de la frecuencia de regeneración de plantas a partir de células transformadas por una parte, y la frecuencia de transformación de las células por otra parte.

Por ejemplo, la transformación de porciones de peciolo de remolacha ha dado unos callos transformados seleccionados sobre kanamicina. Sin embargo, no ha sido nunca posible regenerar unas plantas a partir de estos callos transformados salidos de peciolo, aunque haya sido referida la regeneración de embriones somáticos y de brotes a partir de este tipo de callo en estado no transformado (Tetu *et al*, 1987). Este fracaso no es sorprendente si se tiene en cuenta la baja frecuencia de regeneración descrita.

Esto traduce bien los problemas de regeneración, a partir de explantes, de plantas no transformadas, encontrados desde hace largo tiempo en la remolacha azucarera (Ritchie *et al*, 1989). Varios autores han descrito la regeneración directa de brotes adventicios a partir de fragmentos de peciolo de plantas en multiplicación vegetativa (Detrez *et al*, 1988; Freytag *et al*, 1988). Aunque este fenómeno haya resultado reproducible en unas condiciones aplicadas por los inventores, la frecuencia ha resultado demasiado baja para estar asociada a la transformación. Por otra parte, parece que estas neoformaciones provienen de macizos celulares no accesibles a la bacteria y aparentemente poco sensibles a un agente selectivo.

Otra técnica de regeneración de plantas no transformadas a partir de células de remolachas azucareras es la descrita por Saunders *et al* (1986). La misma utiliza en un primer tiempo, la inducción de callos friables independientes de hormonas e iniciadas probablemente a partir de las células epidérmicas del limbo, y después en un segundo tiempo, la regeneración de brotes y de embriones somáticos a partir de estos callos. Esta técnica ha sido fácilmente reproducible sobre varias variedades de remolachas azucareras. Uno de los intereses de este proceso es la posibilidad de obtener fácilmente unas suspensiones celulares a partir de callos friables cuyo potencial organógeno puede ser mantenido durante algunos meses.

Los inventores han descubierto que este material organógeno, es decir los callos friables, puede ser utilizado, en condiciones precisas, para la transformación por *Agrobacterium tumefaciens*.

Hace poco tiempo la transformación de suspensiones celulares no parecía concebible según el dogma establecido de que la transferencia de ADN por *Agrobacterium* en una célula vegetal necesitaba lesiones celulares. Sin embargo, unos autores han referido la transformación de células en suspensión en el tabaco y la zanahoria (AN, 1985; Scott y Draper, 1987). Hasta el presente, la transformación de células en suspensión en la remolacha no ha sido descrita. Por otra parte, debe observarse que los métodos de transformación que se aplican con éxito a una especie vegetal no pueden ser extendidos sistemáticamente a otras especies. Las condiciones de transformación, los materiales de partida y los medios de cultivo son unos parámetros variables específicos de cada especie.

En lo que concierne a la transformación y a la regeneración de remolachas transgénicas resistentes a la rizomanía, cualquier progreso ha sido impedido por la falta de un procedimiento de producción fiable.

El virus de las nervaduras amarillas y necróticas de la remolacha azucarera (BNYVV) es un virus con componentes múltiples, constituido por partículas virales de simetría helicoidal, que contienen cuatro tipos de RNA de rama simple, de polaridad positiva (Putz, 1987). Este virus es diseminado por un hongo del suelo, *Polymixa betae*, que parasita las células superficiales de las raicillas de quenopodiáceas, de las cuales forma parte la remolacha azucarera. Esta quenopodiácea bisanual permanece en estado de roseta el primer año dando una raíz carnosa y azucarada, y sube a semilla el segundo año después de vernalización. La persistencia de la enfermedad en el suelo es debida a los quistes formados por el hongo (Tamada, Baba, 1973).

Es conocido que el virus se desarrolla esencialmente en la parte radical (pivote y raíces secundarias). El síntoma principal de la enfermedad consiste en una proliferación de la cabellera radical (de lo que proced el nombre de rizomanía). Pero el nombre del virus proviene de hecho de síntomas mas tardíos visibles en la parte vegetativa a saber: necrosis y amarilleo de las nervaduras debidas al hecho de que el virus se desarrolla sobre todo a nivel de los vasos radicales, perturbando así el metabolismo de toda la planta (Salle *et al*, 1986).

Varios autores han referido que el virus es detectado en la parte aérea sólo muy raramente, mientras que está presente en gran cantidad a nivel de las raíces y del pivote (Putz, 1977; Ziegler *et al.*, 1985).

El control de las enfermedades virales de los vegetales resulta problemática, a pesar del advenimiento de la ingeniería genética vegetal.

Abel *et al* (1986) han introducido un gen que codifica para la proteína de cabeza del virus del mosaico del tabaco (VMT) en el genoma de las plantas naturalmente sensibles a este virus. Esta manipulación genética ha provocado un retardo del desarrollo de la enfermedad en las plantas transgénicas. Otras realizaciones del mismo tipo han sido referidas con otros virus;

- Alfalfa Mosaic Virus, y Tobacco Rattle Virus, en el tabaco (Van Dun *et al*, 1987),

- Alfalfa Mosaic Virus en el tabaco (Loesch Fries *et al*, 1987),
- Alfalfa Mosaic Virus sobre tabaco y tomate (Tumer *et al*, 1987).

5

Dos equipos han creado unas plantas transgénicas que expresan unos genes que codifican para unos ARN antisentido, complementarios del ARN que codifica para la proteína de cabeza, y muestran que la resistencia es mucho menos importante que la conferida por la proteína de cabeza (Cuozzo *et al*, 1988; Hemenway *et al*, 1988).

10

Finalmente, otros laboratorios han creado unas plantas transgénicas que expresan unos genes que codifican para los ARN satélites. Esta estrategia ha sido adoptada por Gerlach *et al* (1987) para el virus de las manchas anulares del tabaco, y por Harrison *et al* (1987) para el virus del mosaico del pepino (CMV).

15

No siendo conocido ningún satélite para el BNYYV, los inventores han previsto hacer producir a las células vegetales transformadas o bien unos ARN antisentido, o bien unos ARN sentido que codifican para unas proteínas virales normales, mutada o delecionadas, susceptibles de inhibir el desarrollo del virus.

El procedimiento de transformación de la invención implica:

20

- la transformación de callos friables en dispersión que dan unos callos, unas suspensiones celulares y unas plantas transformadas.

25

Más particularmente, la presente invención se refiere a un procedimiento de transformación de células vegetales que pertenecen a la especie *Beta vulgaris* caracterizado porque comprende la puesta en contacto de una dispersión de callos blancos friables en un medio de cultivo celular vegetal líquido que contiene 0 a aproximadamente 3,0 mgL⁻¹ de una citoquina, con *Agrobacterium tumefaciens* que contiene un vector que lleva un gen destinado a ser introducido en las células vegetales, seguida de cocultivo de las células vegetales y de las bacterias para dar lugar a unos callos friables transformados. Según un modo de realización preferido de la invención, este procedimiento de transformación comprende las etapas sucesivas siguientes:

30

I) inducción de callos blancos friables a partir de explantes;

35

II) dispersión de los callos en un medio de cultivo celular vegetal líquido que contiene de 0 a aproximadamente 3,0 mgL⁻¹ de una citoquinina;

III) puesta en contacto de la dispersión con *Agrobacterium tumefaciens* que contiene un vector que lleva un gen destinado a ser introducido en las células vegetales, seguida de cocultivo de las células vegetales y de las bacterias;

40

IV) lavado de las células vegetales para eliminar las bacterias y selección de las células transformadas sobre un medio selectivo;

V) cultivo de las células transformadas seleccionadas para obtener unos callos friables transformados.

45

La primera etapa de la transformación es la inducción de callos blancos friables a partir de explantes de remolacha. Los explantes que pueden servir en esta etapa pueden ser por ejemplo unos discos de hojas, unas porciones de peciolo, etc. Preferentemente, los explantes son unos trozos de hojas jóvenes extraídos de una planta que tenga una edad de menos de tres meses.

50

Por ejemplo, después de germinación de las semillas de remolacha de aproximadamente un mes, se extraen unas hojas jóvenes de 3 a 5 cm de longitud de cada planta y se someten a una etapa de desinfección y aclarado. Cada hoja es a continuación cortada en pequeñas porciones de 0,25 cm² a 1,0 cm². Las hojas pueden ser extraídas de la planta hasta dos meses aproximadamente después de las primeras extracciones. Después de este período, la aptitud de regeneración de las hojas disminuye. Los discos de hojas son a continuación puestos en cultivo sobre un medio de cultivo celular vegetal que contiene de 0,1 a 5,0 mgL⁻¹ de citoquinina. Preferentemente, la citoquinina está presente a razón de aproximadamente 1,0 mgL⁻¹ y puede ser, por ejemplo, la 6-bencilaminopurina (BAP), la zeatina, o la kinetina. La BAP es la particularmente preferida. El medio de cultivo celular vegetal es ventajosamente el medio de Murashige y Skoog (1962), llamado medio M.S.. Los explantes son cultivados a 30°C aproximadamente durante 30 días en la oscuridad, y a continuación son sacados de la cámara de cultivo con un fotoperíodo de 18/24 H por ejemplo a aproximadamente 25°C de día y 20°C por la noche.

60

De 4 a 10 semanas después de la puesta en cultivo, aparecen unos callos blancos friables alrededor, sobre o debajo de los explantes foliares.

65

La etapa siguiente del procedimiento de transformación es la producción de una dispersión de los callos en un medio de cultivo líquido. Esta dispersión será utilizada ulteriormente para la transformación.

La producción de una dispersión de los callos se efectúa por dispersión de los callos aparecidos después de 2 a 6 semanas en los explantes, en un medio de cultivo líquido que contiene 0 a 3,0 mg l⁻¹ de citoquinina, por ejemplo el medio MSB1. Dos tipos celulares, habituado y noduloso, pueden ser observados en las dispersiones, en particular:

- tipo habituado (A): suspensión fina, verde con crecimiento rápido, y que regenera puntualmente unas formaciones vitrificadas que se desarrollan difícilmente;
- tipo noduloso (C): suspensión de agregados compactos amarillentos, de crecimiento más lento, regenera más frecuentemente que la primera, desarrollándose bastante bien unas estructuras embrionarias compactas.

Este tipo es asimismo conocido con el nombre “tipo regenerante”. Los callos en dispersión pueden ser examinados antes de la transformación con el fin de separar los dos tipos celulares, es decir noduloso y habituado. Un examen visual de los callos permite detectar los dos tipos que son a continuación extraídos del medio con una pinza y redispersados. Las suspensiones celulares cuidadosamente iniciadas a partir de dispersiones de callos blancos friables nodulosos han resultado ser el material ideal para optimizar la eficacia de la transformación.

Cada uno de los dos tipos celulares puede ser sometido a la transformación pero es preferible transformar el tipo noduloso si se desea ulteriormente la regeneración de la planta.

La dispersión de los callos es a continuación puesta en contacto con la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*.

El protocolo de transformación es efectuado sobre las dispersiones. Una muestra de las bacterias en medio fresco es adicionada a la dispersión de las células de remolacha. El cocultivo de las células vegetales y de las bacterias se realiza en la oscuridad durante tres días aproximadamente, en cámara de cultivo.

El *Agrobacterium tumefaciens* utilizado en la transformación contiene un vector que lleva un gen destinado a ser introducido en las células de remolacha. Las cepas utilizadas por los inventores contienen unos vectores binarios que llevan el gen que interesa. Las tres cepas de *Agrobacterium tumefaciens* desarmadas utilizadas en el trabajo descrito aquí son LBA 4404 (Hoekema *et al*, 1983); EHA 101 (Hood *et al* 1986); C58'3 (Dale *et al*, 1989). Muy evidentemente, el gen interesante está colocado bajo el control de las señales reguladoras apropiadas, por ejemplo un promotor que permite su expresión en la célula vegetal y, en caso necesario, en la planta transgénica regenerada. El promotor puede elegirse para permitir la expresión específica del gen en una cierta parte de la planta, o en una cierta fase de su desarrollo. En contrapartida, puede ser utilizado un promotor constitutivo, que de lugar a la expresión ubicuitaria del gen introducido.

Como gen, se pueden citar unos genes codificantes para unos caracteres agronómicos interesantes, por ejemplo la resistencia a los herbicidas, a los insectos y a los virus, o también un gen que induzca la esterilidad macho. La resistencia a los herbicidas puede ser conferida, por ejemplo, por el tipo de gen descrito por De Block *et al* (1987) y por Bedbrook *et al* (1988). Un gen susceptible de conferir una resistencia a los insectos es el gen de la proteína cristalina de *B. thuringiensis* (Perlak *et al*)(1990); Vaeck *et al* (1987); Fischhoff D, *et al* (1987)). La esterilidad macho puede ser inducida por un gen codificante para una ribonucleasa, tal como el descrito por Mariani *et al* (1990). La resistencia a los virus puede a veces ser inducida por el gen que codifica para la proteína de la cabeza del virus en cuestión. Por ejemplo, la resistencia al virus BWYV puede ser conferida por el gen descrito por Gielen *et al* (1990). Por otra parte, una protección contra el BNYYV, responsable de la rizomanía, puede también ser inducida por este mismo tipo de gen. Según el procedimiento de la invención, este gen que codifica para esta proteína de cabeza puede ser introducido en unas células de remolachas, confiriendo así la resistencia a la rizomanía. Los vectores descritos en estos ejemplos pueden ser utilizados para la introducción de estos genes.

El vector lleva también un gen codificante para una proteína que permite la selección de los transformantes, por ejemplo la neomicina fosfotransferasa (NPT II) que confiere la resistencia a la kanamicina. Además, un gen “informador” puede ser introducido en el vector a fin de poder confirmar el carácter transformado del tejido vegetal. Un ejemplo de dicho gen informador es el gen *uid* A de *E. coli* que codifica para la enzima β -glucuronidasa. La dosificación de la actividad enzimática de esta proteína se realiza fácilmente con unos sustratos cromógenos o fluorescentes.

Después del cocultivo de las células de remolachas y de las bacterias, se efectúa una etapa de lavado con un agente bacteriostático para eliminar las bacterias. Como agente bacteriostático, puede ser utilizada la cefotaxima. El lavado puede efectuarse en dos etapas, por ejemplo una primera vez con el medio MSB1 que contiene 600 mg l⁻¹ cefotaxima, y después una segunda vez en medio MSB1 que contiene 300 mg l⁻¹ cefotaxima.

A continuación, la selección de las células transformadas se efectúa gracias al gen codificante para la resistencia al agente selectivo. Las células lavadas son después puestas en cultivo durante una quincena de días en un medio que contiene el agente selectivo, por ejemplo la kanamicina y el agente bacteriostático. Las células vegetales son a continuación trasplantadas sobre medio fresco.

Tres a ocho semanas después del cocultivo, aparecen unos callos blancos. Estos callos transformados presentan los dos tipos celulares, noduloso y habituado.

Los callos transformados así obtenidos tienen, como característica física principal, que pueden ser dispersados en líquido por una agitación relativamente suave y ello, desde que tienen un tamaño de 3 a 5 mm. De manera sorprendente, estos callos transformados conservan la naturaleza blanca, friable y regenerante que poseían antes de la transformación, y resultan por tanto ser un material apropiado para la regeneración de plantas transgénicas. Debe observarse que la transformación efectuada sobre explantes, y no sobre callos (Harpster *et al.*, 1988), da lugar a unos callos transformados muy compactos que no presentan carácter friable y que no son regenerantes.

Cuando están suficientemente desarrollados, los callos transformados de la invención son trasplantados sobre un medio MSB1 con cefotaxima y eventualmente kanamicina.

De manera sorprendente, se ha constatado que un mes después del clonado de los callos transformados, la kanamicina y la cefotaxima pueden ser suprimidas del medio sin que la bacteria se desarrolle. Esto puede representar una ventaja para la etapa de regeneración, no estando ya las células en contacto con los antibióticos.

Después de la obtención de los callos friables transformados, puede ser iniciada la regeneración de la planta transgénica, empezando por la regeneración de brotes y/o de embriones transgénicos.

El procedimiento de regeneración de brotes y/o embriones transgénicos según la invención está caracterizado por la obtención de callos friables transformados según el procedimiento descrito anteriormente, seguido de un trasplante de los callos friables transformados sobre un medio de cultivo, por ejemplo el medio M.S., que contiene 0 a 3,0 mg l⁻¹ de una citoquinina y eventualmente un agente bacteriostático y un agente selectivo. Como citoquinina, se pueden citar la zeatina, la kinetina y la BAP, por ejemplo a una concentración de 1 mg l⁻¹. La BAP es la particularmente preferida.

Unos brotes y/o embriones que regeneran sobre algunos de los callos después de unos plazos que varían de una semana a varios meses.

A partir de estos brotes y/o embriones transgénicos, es posible, según la invención, regenerar unas plantas por trasplante de los brotes y/o embriones sobre un medio de cultivo tal como el medio M.S. que contiene una citoquinina a baja concentración, por ejemplo entre 0,05 y 0,15 mg l⁻¹, preferentemente de 0,1 mg l⁻¹. La BAP es la preferida en esta etapa. Las estructuras regeneradas empiezan entonces a desarrollar unas hojas y son puestas de nuevo en multiplicación vegetativa en macetas o cajas. Los brotes más desarrollados son entonces puestos en un medio de enraizado tal como el medio MS que contiene ácido naftalenacético, por ejemplo 1 mg l⁻¹. Las raíces aparecen de 2 a 6 semanas después. Las plantas pueden entonces ser aclimatadas en invernadero.

La invención se refiere también a la producción de semillas a partir de las plantas transgénicas por vernalización de estas plantas transgénicas y recolección de las semillas después de floración.

La invención se refiere también a los callos friables transformados, los brotes y/o embriones transformados, las plantas transgénicas y las semillas transgénicas de estas plantas susceptibles de ser producidas según los procedimientos descritos anteriormente.

La invención se refiere también a unas semillas de plantas transgénicas que comprenden unas semillas transgénicas.

La presente invención se refiere también a la transformación genética y la regeneración de la remolacha azucarera (*Beta vulgaris ssp saccharifera*) con el fin de crear unas plantas resistentes a la rizomanía.

Más particularmente, los inventores han transformado unas células vegetales por unas secuencias que codifican para la proteína de cabeza del BNYVV, o para unas variantes de ésta.

La realización de este aspecto de la invención ha consistido en:

- construir por las técnicas de recombinación genética *in vitro*, unos genes artificiales, potenciales de resistencia al virus de las nervaduras amarillas y necróticas de la remolacha azucarera (BNYVV: Beet Necrotic Yellow Vein Virus) que provoca la rizomanía,
- transferir de forma estable estos genes de resistencia a las remolachas azucareras.

El gen codificante para la proteína de cabeza de BNYVV ha sido localizado y secuenciado (Bouzoubaa *et al.*, 1986). Sin embargo, no podía ser previsto que la expresión de esta proteína en las células de remolacha inhibiera el desarrollo del virus. Siendo el virus transmitido por el hongo del suelo *Polymixa betae*, la vía de infectabilidad no es comparable con la de los virus para los cuales la proteína de cabeza se ha mostrado protectora. Por otra parte, la proteína de cabeza del BNYVV es codificada por el extremo 5' del ARN2, lo que quiere decir que la proteína puede ser traducida en la célula infectada inmediatamente después de la infección. Para otros virus, la proteína de cabeza es codificada por un ARN subgenómico y es por tanto producida más tarde en el ciclo de la infección. Por estas razones, el efecto protector presentado por la proteína de cabeza para otros virus vegetales no podía ser previsto en el BNYVV.

Además, los inventores han constatado varios fenómenos inesperados: primera- mente, se ha observado que unas células transformadas por una misma secuencia codificante para la proteína de cabeza de 22 Kd (nucleótidos 145 a

708) y por lo menos una parte de la proteína de 75 Kd que está compuesta por la proteína de 22 Kd fusionada con la proteína 54 Kd (nucleótidos 709 a 2218), da lugar a la expresión de dos proteínas en la misma célula, es decir la proteína de 22 Kd y una proteína quimérica compuesta por la proteína de 22 Kd adicionada con la parte de la proteína de 75 Kd codificada por la secuencia transformante. Esta expresión es el resultado del fenómeno de “readthrough”,
 5 siendo el codón “stop” al final de la proteína de 22 Kd a veces suprimido en la célula por unos tRNA supresores. Se ha constatado que el porcentaje de expresión de la proteína quimérica de “readthrough” es particularmente elevado, y podría desempeñar una función en la resistencia conferida a la célula que expresa las dos proteínas a la vez.

En segundo lugar, los inventores han observado que en unas plantas transgénicas las proteínas expresadas según la invención son expresadas específicamente en las raíces, y ello a pesar de la utilización de promotores constitutivos.

Este fenómeno es totalmente inesperado y presenta varias ventajas para la planta. En principio, las células blanco del BNYVV están específicamente protegidas. Además, la ausencia de expresión de la proteína de cabeza y de sus derivados en las partes aéreas de la planta, parte que no es susceptible de ser infectada por el BNYVV, representa una
 15 economía energética importante para la planta. Por otra parte, la expresión en las raíces, con exclusión de cualquier expresión en otras partes de la planta, es un fenómeno que no habría podido ser obtenido utilizando un promotor llamado “específico” para las raíces. Este tipo de promotor conduce, de hecho, a una expresión más importante en las raíces, y una expresión débil en las otras partes de la planta. Unas experiencias, efectuadas por los inventores, utilizando un gen marcador (GUS) han demostrado que la expresión específica no es debida a un mal funcionamiento
 20 del promotor, puesto que el producto de expresión del gen GUS es expresado en todas las partes de la planta, cuando está bajo control de estos mismos promotores. La expresión específica podría ser el resultado de la inestabilidad de la proteína en las partes aéreas de la planta, o a una mala traducción. Estas experiencias muestran que el promotor no parece desempeñar ninguna función en la expresión específica.

Se ha constatado también que el promotor 35S tiene una eficacia de transcripción de 30 a 50 veces más elevada que el promotor Nos en unas células de remolacha. La invención se refiere a unas plantas transgénicas que producen:

- la proteína de cabeza del BNYVV,
- 30 - unas proteínas de cabeza modificadas definidas a continuación (ácidos aminados suplementarios, ácidos aminados permutados, ácidos aminados delecionados), que conservan el efecto protector con respecto al BNYVV,
- unos ARN de sentido y unos ARN antisentido de diferentes tamaños y dirigidos contra diferentes regiones del ARN2 del BNYVV.

Más particularmente, este aspecto de la invención se refiere a una planta transgénica que pertenece a la especie *Beta vulgaris* y resistente a la infección por el virus de las nervaduras amarillas y necróticas de la remolacha azucarera (BNYVV), siendo dicha planta transformada de una manera estable por un fragmento de ácido nucleico, cuyo pro-
 40 ducto de expresión es capaz de conferir dicha resistencia, siendo dicho fragmento derivado del extremo 5' del ARN2 genómico o subgenómico del BNYVV, o del cADN correspondiente, codificando este fragmento para por lo menos una parte de las proteínas codificadas por los nucleótidos 145 a 3285 de la secuencia salvaje del ARN2, y estando bajo el control de un promotor que permite la expresión del fragmento en las células de la planta y estando en la orientación sentido o antisentido.

En el contexto de la invención, un fragmento “derivado del extremo 5' del ARN2 del BNYVV” significa el cADN correspondiente, o una variante capaz de hibridar con este en unas condiciones no estrictas, o cuyo producto de expresión presente por lo menos 80% de homología. Es importante que las variantes presenten la propiedad de poder
 45 inhibir la infección por el BNYVV en unas células que lo expresan. Por “inhibir”, es preciso comprender una reducción y un retardo significativos de la aparición de síntomas de la infección y de la multiplicación del virus. En condiciones óptimas, los síntomas de la multiplicación del virus son eliminados totalmente.

Como ejemplo de fragmento de ácido nucleotídico preferido, se citará un fragmento del extremo 5' del ARN2 genómico del BNYVV o del cDNA correspondiente, que codifica para por lo menos una parte de la proteína codificada
 55 por los nucleótidos 145 a 2218 del ARN2 o para una variante de esta proteína que presenta una homología de por lo menos 80% y que comprende la inserción, la sustitución o la delección de ácido(s) aminado(s) y que confiere una resistencia a la rizomanía a las células que la expresan.

Otro ejemplo de una planta transgénica según este aspecto de la invención es aquella en el cual dicho fragmento codifica para la proteína codificada por los nucleótidos 145 a 708 y, además, para una parte de la proteína codificada por
 60 los nucleótidos 709 a 2218 del ARN2 del BNYVV. Dicha planta transgénica puede comprender, según la invención, un fragmento que codifica para la proteína codificada por los nucleótidos 145 a 871 del ARN2 del BNYVV, pudiendo este fragmento estar compuesto, por ejemplo, por los nucleótidos 91 a 871 del ARN2 del BNYVV.

El fragmento transformante puede también codificar para por lo menos una parte de una variante de la proteína codificada por los nucleótidos 145 a 2218, distinguiéndose dicha variante de la secuencia salvaje por la presencia de la secuencia Glu Asp Leu Pro que reemplaza los ácidos aminados His Ala codificados por los nucleótidos 253 a 258 de la secuencia salvaje. Por secuencia salvaje, debe entenderse la secuencia del ARN2 publicada por Bouzoubaa *et al*

(1986), en particular la de la figura 2 de dicha publicación. Esta figura indica la secuencia nucleotídica así como la secuencia de ácidos aminados. La numeración de las bases utilizadas en esta solicitud es la misma que la aplicada por Bouzoubaa *et al.*

Como ejemplos de parte de este tipo de variante, se puede citar un fragmento que está compuesto por los nucleótidos 91 a 871 de la secuencia salvaje, estando los nucleótidos 253 a 258 de la secuencia salvaje reemplazados por los que codifican para Glu Asp Leu Pro. La parte de la variante puede también corresponder a la codificada por los nucleótidos 145 a 255 en la secuencia salvaje, siendo los nucleótidos 253 a 255 de la secuencia salvaje reemplazados por los que codifican para Glu.

Otro ejemplo aún de una planta transgénica según este aspecto de la invención es aquella en la cual dicho fragmento codifica para por lo menos una parte de una variante de la proteína codificada por los nucleótidos 145 a 2218, distinguiéndose dicha variante de la secuencia salvaje por la presencia de la secuencia Arg Ser Ser Gly en lugar de los ácidos aminados codificados por los nucleótidos 637 a 651 de la secuencia salvaje, formando la secuencia Arg Ser Ser Gly el carboxi terminal de la proteína.

Más particularmente, las plantas transgénicas, según estos aspectos de la invención, expresan unos fragmentos de ácido nucleico que consisten en los nucleótidos 91 a 871 del ARN2 del BNYVV o de la secuencia cADN correspondiente, en la cual los nucleótidos 253 a 258 están eventualmente reemplazados por GAA, GAT, CTT, CCT, o en la cual la secuencia GA AGA TCT TC ha sido insertada en la posición 638, inmediatamente después del C en posición 637, o también los fragmentos BglIII de estas secuencias.

Según otro modo de realización de la invención, el fragmento transformante puede consistir en los nucleótidos 2078 a 2774 del ARN2 subgenómico del BNYVV. La proteína así expresada corresponde al NH₂ terminal de la proteína de 42 kDa del BNYVV.

Unos ejemplos de fragmentos de ácido nucleico transformantes particularmente preferidos y las proteínas codificada por estos fragmentos están ilustrados en la tabla I (ver ejemplo 6).

Entre estas secuencias particularmente preferidas, se citará la secuencia de bases consecutivas que codifican para por lo menos una parte de la proteína de cabeza de 22 Kd (codificada por los nucleótidos 145 a 708) y, además, para una parte de la proteína de 75 Kd (codificada por los nucleótidos 709 a 2218). Un ejemplo de dicha secuencia es la compuesta por los nucleótidos 91 a 871 del ARN2. Este tipo de secuencia, que incluye el codón stop del 22 Kd, da lugar al fenómeno de "readthrough" y la célula expresa así dos proteínas a la vez.

La invención se refiere también a las proteínas producidas por la expresión de estas secuencias, y en particular la proteína de 29 Kd que resulta de la expresión de los nucleótidos 91 a 871 del ARN2, que es expresada al mismo tiempo que la proteína de cabeza de 22 Kd.

Los promotores que pueden ser utilizados en las plantas transgénicas resistentes a la rizomanía son todos los que permiten la expresión de la secuencia que confiere la resistencia en la planta. Los promotores 35S y Nos que son, respectivamente, el promotor del gran transcrito 35S del virus del mosaico de la coliflor y el promotor del gen de la nopalina sintasa son los particularmente preferidos. La utilización de estos promotores constitutivos, y en particular el p35S, da lugar de una manera sorprendente a una expresión específica de la proteína protectora en las raíces.

Otras señales de transcripción a utilizar con el promotor son unos terminadores, por ejemplo Nos.

Las semillas transgénicas de las plantas transgénicas resistentes a la rizomanía forman también parte de este aspecto de la invención.

Las secuencias utilizadas en la transformación de las plantas de la invención pueden ser utilizadas como sonda nucleica, en combinación con unos medios que permiten una detección de la hibridación, para detectar la presencia de las secuencias en unas células transformadas. Esto puede ser útil para verificar el estado transformado de las células.

Este aspecto de la invención se refiere también a un procedimiento de producción de plantas transgénicas que pertenecen a la especie *Beta vulgaris* y resistentes a la infección por el BNYVV, expresando dicha planta, específicamente en las raíces, una proteína capaz de conferir dicha resistencia, comprendiendo dicho procedimiento la transformación, por medio de *Agrobacterium tumefaciens*, de células que provienen de *Beta vulgaris* con uno de los fragmentos tales como los descritos anteriormente, estando la transcripción de dicho fragmento bajo el control de un promotor constitutivo tal como el p35S o el pNos, seguida de la regeneración de una planta transgénica a partir de las células transformadas.

Los ejemplos no limitativos siguientes ilustran en particular:

- la producción de fragmentos de mensaje genético modificado o no del virus del BNYVV, por la planta,
- la expresión de estos fragmentos de ADN de origen viral bajo unos promotores constitutivos (35S; Nos),

- la verificación de esta expresión por la puesta en evidencia de los ARN mensajeros correspondientes en unas suspensiones celulares habituadas y transformadas,
- la confirmación de la producción en la misma célula de dos proteínas de tamaños diferentes codificadas por el mismo gen:
 - * la proteína de cabeza del BNYVV de 22 Kd (188, ácidos aminados)
 - * la proteína quimérica derivada de la proteína de cabeza de 29 Kd (252 ácidos aminados),
- la utilización de las tres cepas desarmadas de *Agrobacterium tumefaciens* para la transformación de suspensiones celulares y de callos friables de remolacha (comparativo)
- la obtención de suspensiones celulares transformantes, inducidas a partir de callos seleccionados sobre kanamicina después de transformación de suspensiones celulares habituadas (comparativo)
- la utilización de estas suspensiones celulares transformadas como modelo para probar la expresión de cualquier fragmento de ADN dispuesto bajo el control de promotores apropiados (comparativo)
- la utilización de estas suspensiones celulares para probar la inhibición de la multiplicación viral para un gen dado (comparativo)
- la inhibición de la multiplicación del BNYVV en unos protoplasmos salidos de suspensiones celulares transformadas y que producen las dos proteínas de 22 Kd y 29 Kd, sirviendo unos protoplastos como modelo para probar la infectabilidad de la célula, no pudiendo las células ser infectadas directamente por los virus, (comparativo)
- la transformación de callos jóvenes friables organógenos,
- la obtención de callos transformados organógenos seleccionados sobre kanamicina después de transformación de callos jóvenes friables organógenos,
- la posibilidad de suprimir muy pronto a la vez el agente selectivo (kanamicina) y el agente bacteriostático (cefotaxima) del medio de cultivo de los callos,
- el desarrollo de los brotes o embriones iniciados a partir de los callos transformados, en plantas transformadas, enraizadas,
- la expresión en la planta de los genes transferidos,
- la puesta en evidencia de la producción de las proteínas 22 y 29 Kd específicamente en las raíces de remolachas transformadas,
- la ausencia de la producción de proteínas 22 y 29 Kd en la parte aérea de las plantas transformadas,
- la producción de semillas transgénicas a partir de transformantes primarios,
- la puesta en evidencia de la resistencia a la rizomanía de las plántulas salidas de las semillas transgénicas.

Las figuras 1 a 11 y las tablas 1 a 3 ilustran diferentes aspectos de la invención, en particular:

Figura 1: Organización genética del ARN2 del BNYVV según Bouzoubaa *et al*, (1986);

Figura 2: construcción de los vectores de expresión pBIOS1 y pBIOS3.

pBIOS1 contiene el promotor (pNos) y el terminador (Nos 3') del gen de la nopalina sintetasa separados por un puesto de restricción BamHI (B) y encuadrados por dos puestos EcoRI (E).

pBIOS3 es un derivado de pBIOS1 en el que el promotor Nos ha sido reemplazado por el promotor del transcrito 35S (p35S) del Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) aislado del plásmido PJE25 (donación de T. Michael).

Abreviaturas: B, BamHI, E, EcoRI - H, Hind III - Hp, HphI - P, Pst - S, SmaI - Sst, SstI - X, XhoII - T4 DNA pol, T4 DNA polimerasa - K, Klenow polimerasa - E Met, EcoRI Metilasa - Ap, Ampicilina - bp, par de base.

Figura 3: genes quiméricos que codifican para la proteína de cabeza del BNYVV y para la proteína quimérica derivada.

A partir del plásmido pBC2 que contiene el ADN copia del extremo 5' del RNA2, se ha aislado un fragmento DraI-Bgl I de 780 bp (posición 91 a 871). Este fragmento ha sido tratado con la T4 DNA polimerasa y han sido adicionados unos linkers BamHI que permiten su clonado en el puesto BamHI de los vectores de expresión pBIOS1 y pBIOS3. Los dos plásmidos pBIOS1-1B y pBIOS3-1B obtenidos tienen un fragmento del ADN en orientación sentido.

Abreviaturas: B, BamHI, D, Dra I - E, EcoRI - P, PstI - Sst, Sst 1 - T4 DNA poi, T4 DNA polimerasa - CAP, partida teórica del transcrito - A+, señal de poliadenilación - ATG, codón de partida - TGA, TAA, codones stop.

Figura 4: construcción de pBIO1-2B y pBIO1-5B.

Figura 5: construcción de los vectores de transferencia.

Las diferentes entidades genéticas funcionales derivadas de pBIOS1 y pBIOS3 son insertadas en el vector binario pGA492. Los derivados pBIOS1 son clonados en el puesto EcoRI y solamente son retenidos los construidos orientados en el sentido de transcripción idéntico al gen de la neomicina fosfotransferasa (npt), mientras que los derivados de pBIOS3 son insertados entre el puesto SstI y el puesto EcoRI, y se encuentran obligatoriamente en la buena orientación. Se han obtenido 32 plásmidos derivados de pGA492.

Abreviaturas: E, EcoRI - Sst, SstI - npt, neomicina fosfotransferasa-cat, cloramfenicol acetiltransferasa - BR y BL, bordes derecho e izquierdo del T-DNA - Tet, resistencia a la tetraciclina - Kb, quilobase.

Figura 6: Vector binario pGA- β -3-1B.

Leyenda: 35S, promotor 35S del Cauliflower Mosaic Virus - 5'Nos, promotor del gen de la nopalina sintetasa - Nos, terminador del gen de la nopalina sintetasa. NPT, gen de la neomicina fosfotransferasa - UID A, gen de la β -glucuronidasa de *E. coli* - BR y BL, bordes derecho e izquierdo del T-DNA de pTiT 37 - amp, gen de resistencia a la ampicilina -tet., gen de resistencia a la tetraciclina - Kana., gen de resistencia a la kanamicina - E, EcoRI - H, Hind III - S, Sst I - ●, origen de réplica del RK2.

Figura 7: análisis por Western blot de las suspensiones celulares transformadas por el vector binario pGA- β -3-1B.

Leyenda: CP, proteína de cabeza - WT, suspensión no transformada - 20 ng y 2 ng, reconstrucciones con las cantidades indicadas de BNYVV- β -Glu, β -glucuronidasa-MW, marcador de peso molecular.

Está representada en un encuadrado, la estructura del gen quimérico que codifica para la proteína de cabeza.

p35S, promotor 35S del Cauliflower Mosaic Virus - Nos, terminador del gen de la nopalina sintetasa; tag, codon de terminación del BNYVV: readthrough - tag, codon de terminación situado en el terminador - atg, codon de iniciación.

Figura 8: infección de protoplastos de remolacha con BNYVV F13 ($\square$, $\circ$) y S2 (∇) por el método con PEG. ($\blacktriangle$) representa los resultados obtenidos con virus desactivado.

Figura 9: infección de protoplastos de remolacha por electroporación en presencia ($\circ$) y en ausencia (Δ) de CaCl_2 5 mM. Los símbolos abiertos correspondientes representan el porcentaje de protoplastos viables en presencia (∇) y en ausencia ($\square$) de CaCl_2 5 mM.

Figura 10: perfiles densitométricos de análisis de RNA extraídos de protoplastos infectados aislados de cepas que expresan (----) o que no expresan (--) la proteína de cabeza de BNYVV.

Figura 11: análisis por Western blot de extractos proteínicos de 3 remolachas transgénicas con la ayuda de dos sueros: un suero anti-BNYVV y un suero anti- β -glucuronidasa.

Abreviaturas: L, limbo; P, peciolo; R, raíz; Te, testigo; S, suspensión celular transformadas; 2ng, 2ng de BNYVV purificado; 14-3, 22-1 y 68-1 se refieren a 3 remolachas transgénicas diferentes.

Tabla 1: los 16 genes de resistencia potenciales al BNYVV con sus productos teóricos.

N.B.: las cifras entre paréntesis se refieren a la posición de los puestos de restricciones según la secuencia del BNYVV; Δ representa el linker BglII adicionado. El tamaño de los transcritos corresponde a la parte del mensajero complementario del BNYVV.

Tabla 2: infección por el BNYVV de protoplastos salidos de las células transformadas y no transformadas. 1×10^6 protoplastos han sido inoculados con 5 μg de BNYVV (F13 ó S2) salvo para la experiencia 4 en la que el inóculo consistía en 30 μg de BNYVV, las cifras representan el porcentaje de protoplastos fluorescentes detectados 30 horas después de la inoculación. CP+ y CP- son unas cepas celulares transformadas que expresan y no expresan la proteína de cabeza del BNYVV.

Tabla 3: diferentes medios de cultivo utilizados en el procedimiento de transformación y de regeneración según la invención.

Ejemplo 1

Extracción del ARN viral

5 La multiplicación del virus BNYVV se realiza sobre *Chenopodium quinoa* después de inoculación manual, y la extracción se realiza a partir de hojas virosas de ocho días según la técnica de Putz (1977). La suspensión viral así obtenida es ajustada con 100 mM de NaCl y después sometida a dos extracciones con fenol seguidas de dos lavados con éter de la fase acuosa. Los RNA virales son precipitados por adición de dos volúmenes de etanol destilado y conservados a -20°C. El número y el tamaño de los RNA ha sido referido por Richards *et al* (1985).

10

Ejemplo 2

Fabricación del cDNA del RNA2

15

Richards *et al* han mostrado en 1985 que el RNA2 era un mensajero eficaz para la síntesis de la proteína de cabeza. Un ADN complementario de una parte del RNA2 ha sido sintetizado por el método de Van der Werf *et al* (1981) y clonado en el puesto Pst 1 del plásmido pBR322 (Bolívar *et al.*, 1977). El plásmido resultante pBC2 contiene un ADN copia correspondiente a los 2938 bases del extremo 5' del RNA2 (Richards *et al*, 1985).

20

Ejemplo 3

Determinación de la secuencia del extremo 5' del RNA2

25

Gracias a la técnica de Maxam y Gilbert (1980), y a la de Sanger (1977), la secuencia del clon pBC2 ha sido determinada. La secuencia detallada es representada en la publicación de Bouzoubaa *et al* (1986) con la organización genética del RNA2 esquematizada. El examen de esta secuencia ha confirmado la presencia de la proteína de cabeza a nivel del primer cistron situado en 5', estando el codon ATG de partida colocado a 144 nucleótidos del extremo 5'. Esta proteína de un peso molecular de 22 Kd comprende 188 codones y termina por un codon ambar UAG. La composición de ácidos aminados deducida de la secuencia es idéntica a la de la proteína de cabeza del BNYVV determinada por C. Putz (1977). El codon stop (UAG) está inmediatamente seguido de una fase abierta que tiene una capacidad codificante correspondiente a un polipéptido de 54 Kd. Por la supresión del codón UAG, se puede por tanto obtener una fase de lectura abierta capaz de codificar para una proteína de 75 Kd. Estos datos están de acuerdo con los resultados obtenidos por Ziegler *et al* (1985) que muestran que el RNA2 es un mensajero eficaz para la síntesis de dos proteínas inmunoprecipitadas con suero anti BNYVV y cuya síntesis está aumentada en presencia de un t.RNA supresor. Todos estos resultados son discutidos en la publicación de Bouzoubaa *et al* (1986), y se precisa también que una tercera fase de lectura capaz de codificar *in vitro* para una proteína se realiza a partir de un ARN subgenómico del RNA2 que ha sido puesto en evidencia y que puede ser encapsulado.

40

Ejemplo 4

Construcción de los vectores de expresión

45

En primer lugar, han sido utilizadas las señales de transcripción del gen de la nopalina sintasa de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* T 37. A partir del plásmido pNopneoΔ 18 construido por Bevan (1983) cuya estructura está representada en la figura 2, éste contiene la secuencia del vector de clonado pUC9 (Vierra *et al.*, 1982) con un fragmento EcoRI-BamHI de 260 bp y de un fragmento HindIII-XhoII (BaHI-BglII) de 310 bp. Estos dos fragmentos que provienen del plásmido tumorígeno pTiT37 de *Agrobacterium tumefaciens* T 37 contienen respectivamente la señal de poliadenilación y el promotor del gen de la nopalina sintasa. Estas dos señales de transcripción encuadran un fragmento BglII-Bam HI de 1000 bp que contiene el gen que codifica para la aminoglicósido fosfotransferasa II; a partir de este plásmido, el fragmento de 1000 bp ha sido extraído por digestión controlada con el enzima de restricción XhoII, y las moléculas de tamaño de 3300 bp aproximadamente son recuperadas después de emigración sobre gel de agarosa. Después de ligado y transformación en *E. coli* HB101 (Bolívar *et al*, 1979) han sido seleccionados unos transformantes resistentes a la ampicilina. La mayoría de estas técnicas están descritas en "Molecular Cloning. A laboratory manual" (Maniatis *et al*, 1982). Gracias a la cartografía con la ayuda del enzima de restricción, los inventores han retenido el plásmido pNoSΔNeo, que poseía un fragmento EcoRI-BamHI de 260 bp y un fragmento BamHI-HindIII de 310 bp. Para comodidad de utilización de este plásmido, los inventores han reemplazado el puesto de restricción HindIII por un puesto EcoRI (detalles no presentados) y así han obtenido el vector de expresión pBIOS1 (figura 2).

50

Se ha construido otro vector de expresión en el marco de la invención. Tiene la misma estructura que pBIOS1, comprendiendo el mismo fragmento la señal de poliadenilación, pero el fragmento promotor ha sido cambiado. En efecto, el fragmento PstI-BamHI que comprende el promotor del gen de la nopalina sintasa ha sido reemplazado por un fragmento EcoRI-BamHI de 400 bp que contiene el promotor del gran transcrito 35S del virus del mosaico de la coliflor (Ca.m.v.). Este fragmento ha sido obtenido a partir del plásmido pUC35S que derivaba del clonado de un fragmento BamHI-HphI en el puesto Sma I del vector de clonado pUC13 (Messing, 1983). La fuente del fragmento

65

BamHI-HphI era el plásmido pJEA25 construido por T. Michael y que había extraído un fragmento Dde I que se extiende de la posición 7069 a la posición 7569 del CaMV aislado de BJ1 descrito por Franck *et al* (1980). Después de haber modificado los extremos de este fragmento gracias a unos linkers BamHI, T. Michael lo había clonado en el puesto BamHI del plásmido pAT153 (Twigg *et al*, 1980). En la figura 2, están esquematizadas las diferentes etapas de la construcción del vector de expresión pBIOS3. Para los dos vectores de expresión pBIOS1 y pBIOS3, el puesto de restricción BamHI está presente entre los dos fragmentos de ADN que contienen el promotor para uno y para el otro la señal de poliadenilación; esta situación es ideal para la inserción de cualquier ADN extraño que será un sustrato para la transcripción.

Ejemplo 5

Inserción de fragmentos cDNA del BNYVV en el puesto BamHI de los vectores de expresión

El plásmido pBC2 ha sido digerido por los enzimas de restricción BglII y DraI y a continuación el extremo saliente del puesto de BglII ha sido suprimido por la utilización de la DNA polimerasa del bacteriófago T4. Este fragmento ha sido purificado por elución a partir de un gel de agarosa, después de separación electroforética. Unos linkers BamHI han sido adicionados a los extremos de este fragmento, y después una digestión con un gran exceso del enzima de restricción BamHI; este fragmento de 780 bp es así incubado con los vectores pBIOS1 y pBIOS3 abierto en el puesto BamHI. Después de ligado, la mezcla ha servido para transformar *E. coli* HB101. Después de una selección efectuada sobre los clones resistentes a la ampicilina, se han retenido 4 plásmidos. Los plásmidos denominados *pBIO1-1B* y *pBIO3-1B* que tienen el fragmento cDNA que contiene la secuencia codificante de la proteína de cabeza bajo el control del promotor Nos para el primero y para el otro bajo el control del 35S (figura 3).

Estos plásmidos pueden dirigir la fabricación de RNA mensajeros que, una vez traducidos, producirán a la vez la proteína de cabeza del BNYVV y una proteína quimérica de 29 Kd que proviene de la supresión del codón stop (fenómeno de readthrough). Esta proteína de 252 ácidos aminados está compuesta como sigue:

- los 188 ácidos aminados de la proteína de cabeza,
- 53 ácidos aminados de la proteína de 75 Kd que van de la posición 189 a 241 incluidas,
- de 11 ácidos aminados codificados por la secuencia del terminador de la nopalina sintasa que son respectivamente: treonina, glicina, serina, prolina, isoleucina, leucina, glutamina, treonina, fenilalanina, glicina, glutamina. Se han obtenido otros dos plásmidos, estos plásmidos denominados pBIO1-1A y pBIO3-1A tienen el fragmento cDNA del BNYVV en orientación inversa bajo el control de los dos promotores. Estos plásmidos podrán dirigir la fabricación de RNA mensajeros llamados antisentido, que serán unos mensajeros complementarios de la parte 5' del RNA2.

Ejemplo 6

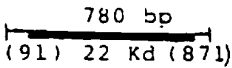
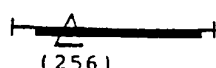
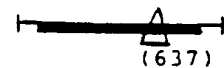
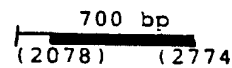
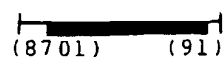
Construcción de una familia de genes que permiten la fabricación de proteínas de cabeza del BNYW modificadas y de RNA antisentido de tamaño variable

Han sido construidos dos plásmidos derivados de pBIO1-1 B, el plásmido pBIO1-2B y el plásmido pBIO1-5B. Las diferentes etapas de la construcción de estos plásmidos están representadas en la figura 4. Brevemente, para la construcción de pBIO1-2B, el plásmido pBIO1-1B ha sido abierto en el puesto SphI (posición 256 del RNA2) los extremos "pegajosos" han sido extraídos por la utilización de la DNA polimerasa del bacteriófago T4 (deleción de 4 bp) y de los linkers BglII de 10 bp han sido ligados en los extremos francos así producidos. Después de una digestión exhaustiva con BglII, el plásmido es religado. Después de transformación en *E. coli*, ha sido obtenido el plásmido pBIO1-2B; éste no contiene ya puesto SphI y en esta posición se encuentra ahora el puesto BglII. Esta manipulación ha permitido dos cosas: primeramente, la obtención de un puesto de restricción útil para otras construcciones (extremos compatibles con los producidos por BamHI) y en segundo lugar la obtención de una secuencia codificante modificada que codifica para una proteína de cabeza que posee dos ácidos aminados suplementarios y de la que dos ácidos aminados son cambiados. El plásmido pBIO1-5B se ha obtenido por el mismo tipo de manipulación pero en su caso es el puesto SmaI de pBIO1-1B (posición 637 del RNA2) que ha sido modificado por unos linkers BglII. Este plásmido codifica para una proteína de cabeza acortada en 19 ácidos aminados y de los cuales los 4 últimos están modificados.

Utilizando los puestos BglII y Bam HI de estos dos plásmidos, los inventores han podido aislar y clonar en los dos vectores de expresión pBIOS1 y pBIOS3 diferentes porciones de cDNA que recubren el extremo 3' o el extremo 5' de la proteína de cabeza y esto en unas longitudes variables. Una familia de genes susceptibles de hacer resistente al BNYVV una célula o una planta que fabrica el producto de uno o varios de estos genes se ha obtenido de esta manera. Todos estos diferentes fragmentos de cDNA están representados en la tabla 1 con los productos esperados (transcrito y proteína); refiriendo la letra B una orientación de sentido y A una orientación antisentido.

ES 2 079 647 T5

TABLA 1

CODIGO	FRAGMENTO cDNA	TRANSCRIPCION	PROTEINA
1B		ARN buen sentido 780bp	proteína de cabeza de 22 kd (188 ácidos aminados) y proteína quimérica derivada 29 kd (252 Aa)
2B		ARN buen sentido 780bp	Proteína de cabeza mutada (190 Aa)
3B		ARN buen sentido 3' 165 bp	36 Aa NH2 terminal de la proteína de cabeza
4B		ARN buen sentido 5' 615 bp	
5B		ARN buen sentido 780 bp	proteína de cabeza truncada (169 Aa)
6B		ARN buen sentido 5' 546 bp	164 Aa NH2 terminal de la proteína de cabeza
7B		ARN buen sentido 3' 234 bp	
8B		ARN buen sentido 700 bp	215 Aa NH2 terminal de la proteína de 42 Kd
1A		ARN antisentido 780 bp	

	CODIGO	FRAGMENTO cDNA	TRANSCRIPCION	PROTEINA
5	2A		ARN antisentido	
			780 bp	
10	3A		ARN antisentido	
			5' 165 bp	
15	4A		ARN antisentido	
20			3' 615 bp	
25	5A		ARN antisentido	
			780 bp	
30	6A		ARN antisentido	
			5' 546 bp	
35	7A		ARN antisentido	
			3' 234 bp	
40	8A		ARN antisentido	
45			700 bp	

N.B.: las cifras entre paréntesis se refieren a la posición de los puestos de restricciones según la secuencia del BNYVV; ▽ representa el linker BglII adicionado. El tamaño de los transcritos corresponde a la parte del mensajero complementario del BNYVV.

En esta tabla, se ha representado también un fragmento de cDNA que se extiende de la posición 2078 a 2774; se trata de un fragmento Sau 3A del RNA2 correspondiente al extremo 5' del RNA subgenómico que codifica para la proteína de 42 Kd (figura 1b). Los inventores han clonado este fragmento en los vectores de expresión pBIOS1 y pBIOS3 y esto en las dos orientaciones (8B y 8A).

Ejemplo 7

Introducción de los genes en un vector binario

El vector binario pGA492 elegido ha sido construido por G. An (1986). Este plásmido tiene un tamaño de 12 Kb, su carta genética está representada en la figura 5. Este plásmido posee:

- dos fragmentos de ADN que contienen las secuencias del T-DNA del plásmido tumorigeno pTiT37, estas secuencias delimitan la parte transferida y son indispensables para la transferencia,
- un gen quimérico que contiene la secuencia codificante del gen de la neomicina fosfotransferasa del transposon Tn5 (Rothstein *et al*, 1981) que es fusionado con un fragmento que contiene el promotor del gen de la nopalina sintasa y los primeros codones de la secuencia codificante de este mismo gen. Este gen quimérico

está terminado por la señal de poliadenilación del gen de la nopalina sintasa. Este gen confiere a las células vegetales que lo contienen la capacidad de multiplicarse en presencia de kanamicina, que es normalmente un antibiótico tóxico para éstas,

- varios puestos únicos de restricción que permiten el clonado de genes construidos *in vitro*,
- un origen de réplica de amplio espectro de huésped que funcionan *E. coli* y en *Agrobacterium tumefaciens*,
- un origen de transferencia y los genes *mob* necesarios para la transferencia por conjugación bacteriana,
- un gen de resistencia a la tetraciclina que permite la selección de bacterias transconjugadas,
- un gen de resistencia a la tetraciclina que permite la selección de bacterias transconjugantes.

En la figura 5, los inventores han ejemplificado la introducción de dos genes, los genes soportados por pBIO1-1 B y por pBIO3-1 B. Todos los fragmentos de cDNA bajo el control del promotor Nos (pBIOS1 derivados) son clonados en el puesto EcoRI de pGA 492 después de aislamiento de los genes respectivos con EcoRI. Solamente los clones que presentan los genes en el mismo sentido de transcripción que el del gen que confiere la resistencia a la kanamicina son retenidos. Para los genes que contienen el promotor 35S del CaMV (pBIOS3 derivados) el clonado se efectúa entre los puestos Sst I y EcoRI de pGA 492 después de digestión de los diferentes plásmidos por estas dos mismas enzimas. Se han obtenido 32 vectores de transferencia, dos de estos están representados en la figura 5, pGA-1-1B y pGA-3-1B.

Ejemplo 8

Introducción de un gen informador en el vector binario pGA-3-1B

La confirmación del carácter transformado de un tejido vegetal se efectúa en numerosos casos por la puesta en evidencia de las proteínas codificadas por los genes transferidos. En el caso del vector binario pGA-3-1B, los inventores han podido dosificar por técnicas inmunológicas la proteína de cabeza del BNYVV y por una dosificación enzimática la actividad de la neomicina fosfotransferasa que confiere la resistencia a la kanamicina. Sin embargo, estas dosificaciones son largas y delicadas y necesitan una importante cantidad de material vegetal.

En 1987, Jefferson *et al*, utilizan el gen uid A de *E. coli* que codifica para la enzima β -glucuronidasa (GUS E.C.3.2.2.31) como gen informador. Este gen, bajo el control de señales de transcripción vegetales (promotor 35S de CaMV y terminador Nos), se expresa muy bien en las células vegetales y la enzima se revela muy estable. Varios métodos de dosificación de la actividad enzimática de esta proteína están disponibles puesto que existen diferentes tipos de sustratos; en particular unos sustratos que dan productos cromógenos y unos sustratos que dan productos fluorescentes. Se pueden efectuar de forma simple y con poco material vegetal unas dosificaciones cuantitativas (intensidad de la fluorescencia) y unas dosificaciones cualitativas por histoquímica (aparición de un precipitado azul indigo). Para aprovechar este sistema informador en las experiencias de transformación, los inventores han construido el vector binario pGA- β -3-1B. La estructura génica de este plásmido está representada en la figura 6. El gen que puede inhibir la multiplicación del BNYVV está encuadrado por el gen que confiere la resistencia a la kanamicina y por el gen que codifica para la β -glucuronidasa. Para realizar esta construcción, los inventores han insertado en el puesto EcoRI del vector binario pGA-3-1B, el plásmido pBI221 (Jefferson 1987) abierto por su puesto EcoRI. El vector binario pGA- β -3-1B resultante (de un tamaño de 19 Kb) ha sido transferido a las cepas de *Agrobacterium* desarmadas (LBA 4404, EHA 101, C58'3) por conjugación triparental según la técnica descrita por Ditta *et al* (1980).

Ejemplo 9

Obtención de callos friables regenerantes a partir de hojas

Unas semillas de remolacha se han sembrado en tierra en invernadero. Estas semillas han salido de la variedad americana "REL 1".

Aproximadamente un mes después de germinación en invernadero, se han realizado las primeras experiencias de inducción de callos según el método descrito por Saunders *et al* (1986):

- se han extraído unas hojas jóvenes de 3 a 5 cm de longitud de cada planta,
- las mismas son desinfectadas como sigue:
detergente de la marca Domestos 15% durante 5 minutos
3 aclarados con agua estéril
secado sobre papel filtro estéril
- cada hoja es a continuación cortada en fragmentos de 0,25 cm² aproximadamente,

ES 2 079 647 T5

- los explantes así obtenidos son puestos en cultivo sobre el medio MSB1 (Tabla 3) en cajas de Petri,
- las cajas, después de haber sido selladas con una película plástica de la marca Scello-frais, son puestas a 30°C que la oscuridad durante 30 días,
- después son sacadas de la cámara de cultivo L:D 18:8, 25°C:20°C.

De 4 a 10 semanas después de la puesta en cultivo, aparecen unos callos blancos friables alrededor, y sobre o debajo de los explantes foliares.

De 1 a 8 semanas después de la aparición de callos unos brotes y/o embriones empiezan a regenerar de estos callos.

TABLA 3

Medio de cultivo

MS:

Para 1 litro:

4,4 g de medio Murashige y Skoog deshidratados de la casa SIGMA ref. M6899.

Vitaminas:

1 mg pantotenato de calcio

0,01 mg biotina

1 mg ácido nicotínico

1 mg piridoxina HCl

10 mg tiamina HCl

30 g sacarosa

pH: 5,8

Medio sólido: 8 g agar-agar

MSB1:

MS + 1 mg/l BAP

MsBo.1:

MS + 0,1 mg/l BAP

MS enraizado:

MS + 1 mg/l ANA

Extensión de las células:

MSB1 + C = MSB + 300 mg/l cefotaxima

MSB1 + CK = MSB + 300 mg/l cefotaxima + 200 mg/l kanamicina

LB:

Para 1 litro:

10 g de bactotripton

5 g yeast extract

10 g NaCl

Ejemplo 10

Obtención de suspensiones celulares a partir de los callos inducidos (comparativo)

- 5 De 4 a 6 semanas después de su aparición, los callos son extraídos (evitando cualquier estructura organizada) y puestos en cultivo en 100 ml de medio MSB1 líquido, en los erlenmeyers de 250 ml cerrados con una hoja de celofana mantenida sobre el cuello por dos elásticos. Los erlenmeyers son agitados a 200 RPM aproximadamente en la cámara de cultivo.
- 10 La suspensión celular se establece en 2 ó 3 semanas. Cada suspensión es trasplantada cada 3 semanas aproximadamente como sigue:
- el contenido de cada erlenmeyer, después de 3 semanas de cultivo, es filtrado sobre una serie de tres tamices apilados (cuyas mallas son de 1 mm, 500 μ m, y 100 μ m). Una parte de cada fracción (> 1 mm, > 500 μ m, > 100 μ m) es puesta de nuevo en suspensión en 100 ml de medio MSB1 fresco en erlenmeyers de 250 ml. Estas nuevas suspensiones son de nuevo agitadas a 200 RPM. La observación de las diferentes suspensiones celulares establecidas a partir de los diferentes genotipos ha permitido distinguir dos tipos celulares:
 - * tipo habituado (A): suspensión fina, verde con crecimiento rápido, regenera puntualmente unas formaciones vitrificadas que se desarrollan difícilmente,
 - * tipo noduloso (C): suspensión de agregados compactos amarillentos, con crecimiento más lento, regenera más frecuentemente que la primera, se desarrollan bastante bien unas estructuras embrionarias compactas.

Ejemplo 11

Transformación de suspensiones celulares y dispersiones de callos jóvenes

30 *Suspensión celular (comparativo)*

La transformación se realiza sobre unas suspensiones celulares después de 3 semanas de cultivo, sin trasplante.

- 35 En un tubo plástico, estéril y graduado, se recoge una parte de la suspensión de manera que tenga 5 ml de células apretadas en 10 ml de medio. Se adicionan 10 ml de medio MSB1 fresco. La nueva suspensión así obtenida es distribuida en cuatro cajas de Petri a razón de 5 ml por caja.

40 Las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* ensayadas son LBA 4404, EHA 101, C58'3. Cada una de estas cepas contiene unos vectores binarios que llevan los genes construidos (ejemplos 5 y 6) y más particularmente el vector pGA- β -3-1b (ejemplo 8).

45 Las cepas bacterianas son conservadas a -20°C en 15% de glicerol. 50 μ l de cada cepa son extraídos y puestos en cultivo en 2 ml de medio LB + rifampicina + tetraciclina. Los cultivos son agitados a 200 RPM a 30°C durante 2 días. Cada cepa es trasplantada a un medio fresco y cultivada en las condiciones descritas más arriba durante una noche.

Cuando las bacterias están así preparadas, se realiza la infección de las células vegetales:

- 50 μ l de cada cepa crecida una noche son extraídos y adicionados a una de las cajas de Petri que contiene las células de remolachas descritas más arriba,
- el cocultivo de las células de remolacha y de las bacterias se realiza en la oscuridad durante 33 días en cámara de cultivo.

55 Después de estos 3 días, una células vegetales son lavadas para eliminar la bacteria, una primera vez con MSB1 + 600 mg/l de cefotaxima (bacteriostático que inhibe el crecimiento de *Agrobacterium*), y después una segunda vez en medio MSB1 + 300 mg de cefotaxima.

- las células así lavadas son puestas en cultivo sobre un disco de papel Whatman estéril depositado sobre medio MSB1 + CK (tabla 3), en cajas de Petri (la kanamicina es el agente selectivo que permite desarrollarse solamente a las células transformadas). Las cajas son selladas con scello-frais y puestas en cámara de cultivo. 15 días después, los filtros que llevan las células vegetales son trasplantados sobre medio fresco MSB1 + cefotaxima + kanamicina

- 3 a 8 semanas después del cocultivo, aparecen unos callos blancos sobre un lecho de células muertas.

65 Cuando están suficientemente desarrollados, estos callos son trasplantados o bien sobre medio MSB1 + CK ó MSB1 + C; la mayor parte de los callos crecen sobre los dos medios. Un test histoquímico (Jefferson, 1987) para detectar la actividad de la proteína codificada por el gen de la β -glucuronidasa en las células de estos callos, ha

permitido evaluar en aproximadamente 80% el porcentaje de callos positivos para este test. Esto confirma por tanto el carácter transgénico de la mayor parte de los callos obtenidos.

El hecho de cultivar estos callos sin el agente selectivo (kanamicina) no parece modificar la expresión del gen GUS. Además, después de un mes de cultivo sobre medio con cefotaxima, los callos pueden ser liberados de este antibiótico sin que la bacteria se desarrolle sobre el medio.

Por tanto, un mes después del clonado de los callos, se puede prescindir de añadir los dos antibióticos en el medio de cultivo, sin ningún inconveniente aparente. Esto puede representar un triunfo para la regeneración.

Dispersión de callos nuevamente inducidos

En lugar de transformar unas suspensiones celulares inducidas después de varios meses (y que hipotéticamente han perdido su potencial de regeneración), fueron transformados unos jóvenes callos recientemente inducidos de explantes foliares (Saunders *et al*, 1986). El potencial organógeno de estos callos transformados podía así ser investigado.

Para ensayar esto, han sido extraídos unos callos justamente aparecidos después de 2 a 6 semanas sobre hojas de invernadero. Estos callos han sido dispersados en un medio MSB1 líquido en tubos plásticos estériles, y ha sido aplicado el mismo protocolo de transformación que para las suspensiones celulares. Unos callos transformados han sido así seleccionados para esta vía.

Ejemplo 12

Expresión de los genes que pueden inhibir el desarrollo del BNYW en las células de remolacha (comparativo)

Los inventores han transformado unas suspensiones celulares habituadas de remolachas con todos los genes construidos presentados en los ejemplos 5 y 6. Para cada uno de estos genes varias suspensiones celulares transformadas han sido iniciadas y cultivadas en presencia de kanamicina 200 mg/l. A partir de 10 g de células transformadas sometidas a la acción de celulasas y de peetinasas, o bien los ARN totales, o bien las proteínas solubles totales han sido aislados.

Para extracción de los ARNs la técnica que utiliza el isotiocianato de guanidio descrita por Ausubel *et al* (1987) ha resultado la más eficaz en estas células con paredes digeridas. Los ARN totales han sido analizados por Northern blot según Maniatis *et al* (1982). Para la hibridación de los ARN totales que contienen un ARN mensaje derivado del gen de la proteína de cabeza, los inventores han utilizado como sonda el fragmento de BamHI de 780 pares de bases del plásmido pBIO-3B. Para los que expresan un ARN mensajero derivado de gen codificante para la proteína de 42 Kd, ha sido utilizado el fragmento EcoRI de 1330 pares de bases del plásmido pBIO-3-8B como sonda. El marcado radiactivo de estas 2 sondas gracias al ATP (P32) se realiza por la técnica llamada del "Oligonucleotide Primed Synthesis" (Ausubel *et al*, 1987).

Los resultados obtenidos han permitido a los inventores verificar la presencia de todos los ARN mensajeros esperados, lo que mostraba la funcionalidad de los genes quiméricos construidos. Estos mensajeros tienen un tamaño correspondiente al indicado en la tabla 1 ampliado en 200 nucleótidos aproximadamente. Estos nucleótidos suplementarios situados en el extremo 3' del mRNA se deben a la parte transcrita del terminador Nos hasta la señal de poliadenilación y a la cola de poli-A. Se ha observado también que el promotor Nos tiene una eficacia de transcripción de 30 a 50 veces menor que el promotor 35S en unas células de remolachas. Estos resultados son comparables con los obtenidos sobre el tabaco y el tomate por Sanders *et al* (1987).

Aunque la transcripción de todos los genes haya sido verificada, era necesario ver si la traducción y la producción de la proteína de cabeza y la proteína quimérica de 29 Kd se había obtenido en el caso del vector binario pGA- β -3-1B. Para ello se ha realizado un Western blot (Ausubel *et al*, (1987)) sobre unas proteínas solubles extraídas a partir de diferentes suspensiones celulares transformadas (tampón de extracción: urea, 9M; β -mercaptoetanol, 7,5%, SDS, 4,5%; pH: 6,8). Los resultados están representados en la figura 7; la parte superior del filtro ha sido revelada con unos anticuerpos policlonales anti- β -glucuronidasa y la parte inferior por los anticuerpos policlonales anti-BNYVV. La β -glucuronidasa está presente en la mayoría de las suspensiones transformadas (banda inmunorreactiva 68 Kd). Diez suspensiones sobre las 11 ensayadas presentan una banda inmunorreactiva que coemigra con la proteína de cabeza del BNYVV así como una banda de un peso molecular de aproximadamente 29 Kd. La expresión de estas dos proteínas es del orden de 0,05 a 0,01% de las proteínas solubles totales; esta cantidad demuestra la buena eficacia de traducción del mensajero producido. Debe observarse que la cantidad de 29 Kd es particularmente elevada en la mayoría de los transformantes y puede ser superior a la de la proteína de cabeza. El porcentaje de readthrough en las suspensiones celulares habituadas parece superior al observado en unas raíces de remolachas para el RNA2 (Ziegler *et al*, 1985) y sobre unas remolachas transgénicas (ejemplo 15).

Ejemplo 13

*Test de resistencia in vitro*5 *Aislamiento y purificación de protoplastos de remolacha (comparativo)*

Cinco días después del trasplante, 2 ml de suspensión celular apretada son digeridos en 20 ml de enzimas cailasa. La composición del cóctel enzimático es la siguiente: 0,25%, 345 S; 0,25% T; 0,08% M₂L disuelto en manitol 0,7 M que contiene 0,08 mM NaH₂PO₄, 0,03 mM MES y 0,68 mM CaCl₂. La presión osmótica es ajustada a 760 mOsmoles/Kg y a pH 5,8. Después de 16 a 18H de suave agitación (30 oscilaciones por minuto) en la oscuridad y a 24°C, la suspensión es filtrada sobre tamiz de 100 y 50 µm respectivamente. El filtrado es adicionado con un volumen igual de una solución isoosmótica de KCl a 470 mM y los protoplastos son sedimentados a 50 g durante 5 minutos. El residuo es tomado de nuevo en sacarosa isoosmótica a 570 mM y centrifugado a 50 g durante 15 minutos. El anillo de protoplastos es extraído, sometido a una segunda centrifugación en sacarosa, que, sedimentado, es lavado dos veces en manitol a 760 mOsmoles/Kg. La viabilidad de los protoplastos es cuantificada por coloración al diacetato de fluoresceína (Widholm, 1972). Se asegura que la digestión sea completa por la ausencia de coloración de la pared del calcofluor.

La utilización de gradientes isoosmóticos pero de densidades diferenciales ha permitido obtener unas preparaciones de protoplastos de muy alto rendimiento 5 x 10⁶ protoplastos por ml de células apretadas y completamente desembarazados de restos celulares. Como mediana, 90% de los protoplastos son viables.

Cultivo de los protoplastos aislados de células no transformadas y transformadas

El medio de cultivo de los protoplastos es un medio de macro y microelementos de Murashige y Skoog (1962) donde el NH₄NO₃ está disminuido a la mitad y adicionado con:

1 g/l hidrolizado de caseína
30 g/l sacarosa
30 7,7 mg/l glicina
1,3 mg/l de ácido nicotínico
35 0,25 ng/l piridoxina
0,25 n/l Tiamina-HCl
400 mg/l glutamina
40 25 mg/l glucosamina
1 mg/l 6 bencilamino purina
45 1 mg/l ácido indolacético

La presión osmótica es ajustada a 760 mOsmoles/Kg con manitol y el pH a 5,8. El medio de cultivo es esterilizado por filtración.

Unos protoplastos han sido aislados a partir de suspensiones celulares transformadas y no transformadas. Han sido puestos en cultivo en el medio anterior en presencia y en ausencia de kanamicina a 200 mg/l a fin de calcular la eficacia de extensión. Los resultados demuestran que los protoplastos aislados a partir de células no transformadas no sobreviven en medio selectivo que contiene 200 mg/l de kanamicina. Esto está de acuerdo con la ausencia de escape en las experiencias de transformación. Ninguna diferencia significativa ha sido encontrada en las eficacias de extensión de protoplastos salidos de células transformadas en presencia y ausencia de kanamicina. Esto confirma pues la ausencia de células no transformadas en el seno de las cepas transformadas. Cuando tienen lugar experiencias comparativas que serán descritas a continuación, los protoplastos salidos de 4 tipos de cepas celulares (β 7 y β 14 que expresan la 22 Kd y la 29 Kd, WT, no transformadas y β D transformada por el vector binario pGA492) serán puestos en cultivo en ausencia de presión de selección.

60 *Infección de protoplastos de remolacha por el BNYVV*

La optimización de la técnica de infección se ha efectuado sobre unos protoplastos salidos de células no transformadas. Los inventores se han inspirado en la técnica de infección por el polietilenglicol descrita por Samac *et al* (1983) y en la de electroporación descrita por Watts *et al*, (1987). A fin de obtener unos porcentajes elevados de infectividad, era imperativo utilizar unas preparaciones de protoplastos desprovistos de restos, que tienen unos porcentajes de viabilidad superiores a 90%, así como unas preparaciones de virus con la edad de menos de dos semanas.

La frecuencia de infección ha sido determinada por inmunofluorescencia por una técnica indirecta descrita por Maule *et al* (1980). Los protoplastos infectados tienen una fluorescencia verde claro característica, dispersada en el citoplasma; los protoplastos no infectados son marrón claro. La figura 8 presenta los resultados de 4 experiencias de infección de protoplastos de remolacha por la técnica al polietilenglicol. Se ha constatado que después de 24 horas de cultivo aproximadamente 60% de los protoplastos están infectados. Este porcentaje no evoluciona de forma significativa para unas duraciones de cultivo superiores a 24 h. La infección se ha realizado por tanto de forma casi sincrónica. Esta figura muestra también que el virus desactivado por congelaciones y descongelaciones repetidas no se replica en los protoplastos de remolacha. En todas las experiencias efectuadas, una mediana a 50% de los protoplastos están infectados.

Los inventores han conseguido introducir unas partículas virales del BNYVV utilizando unos impulsos eléctricos (técnica de electroporación). Los inventores se han inspirado en la técnica descrita por Watts *et al* (1987) y han utilizado un electroporador de descarga de capacidades (Guerche *et al*, 1987).

La optimización de la técnica se ha realizado haciendo variar la duración de impulso suministrado por unos condensadores de diferentes capacidades y la resistividad del medio de electroporación. Es así que los inventores han visto como dos impulsos de 100 ms suministrados con 15 segundos de intervalo por unos condensadores de capacidad de 63 μ F cargados a 220 V a 1×10^6 protoplastos puestos de nuevo en manitol que contiene CaCl_2 a 5 mM en presencia de 5 μ g de BNYVV permitían tener un porcentaje de 55% de protoplastos infectados. La omisión del CaCl_2 conduce a una disminución de la infectividad en un factor 3, aunque la viabilidad de los protoplastos sea aumentada en un factor 2. Esto está ilustrado en la figura 9.

Infección de protoplastos de remolachas salidos de células transformadas y no transformadas

A fin de determinar si la proteína de cabeza (22 kD) de BNYVV y la proteína derivada (29 kD) producida en las células de remolacha podía inhibir la multiplicación del virus, los inventores han inoculado unos protoplastos salidos de células que expresan o que no expresan estas proteínas por el virus. Las experiencias se han realizado por las técnicas al PEG y por electroporación. La infección se ha visualizado por inmunofluorescencia de las células 30 horas después de cultivo. No se ha detectado ruido de fondo en inmunofluorescencia en las células transformadas y que expresan la proteína de cabeza antes de inoculación.

TABLA 2

Infección por el BNYVV de protoplastos salidos de células transformadas y no transformadas

Experiencia	Fuente protoplastos				Protección (%)
	No transformado		Transformado		
	P11	β7	CP ⁺ β14	CP ⁻ βD	
1	30		1		97
2	68		10		85
3	70		4		94
4	27		1		96
5	35	5			86
6	25	2			92
7	37	10		36	73
8		12		48	75

1×10^6 protoplastos han sido inoculados con 5 μ g de BNYVV (F13 ó S2) salvo para la experiencia 4 donde el inóculo consistía en 30 μ g de BNYVV. Las cifras representan el porcentaje de protoplastos fluorescentes detectados 30 h después de la inoculación. CP⁺ y CP⁻ son unas cepas celulares transformadas que expresan y no expresan la proteína de cabeza del BNYVV.

La tabla 2 resume los resultados obtenidos con dos cepas celulares ($\beta 7$ y $\beta 14$) que expresan fuertemente dos proteínas, y la cepa celular transformada (βD) y la cepa celular no transformada WT. En todos los casos, el porcentaje de protoplastos infectados aislados de células transformadas $\beta 7$ y $\beta 14$ es significativamente menor que el de los protoplastos de células no transformadas. Las experiencias 7 y 8 prueban bien que la protección es debida a la presencia de las proteínas 22 Kd y 29 Kd, puesto que el porcentaje de infección de los protoplastos salidos de las células de la cepa 8D es comparable con el de las células no transformadas. Por tanto el proceso de transformación en sí mismo no confiere protección a la infección por los virus. La expresión de proteínas extrañas, distintas de las del BNYVV no confiere ya la protección a la infección por este mismo virus. La protección no es abolida cuando se aumenta la concentración del virus presente en el inóculo. Los perfiles desitométricos (figura 10) de los RNA totales (aislados de protoplastos $\beta 14$ y WT infectados) e hibridados con una sonda cDNA total contra los 4 RNA de BNYVV que muestran que aquéllos no se replican en los protoplastos que expresan la proteína de cabeza del virus. La protección ha sido también observada cuando la inoculación se ha efectuado por electroporación que indica que la protección es independiente del método utilizado para la inoculación.

Estos resultados demuestran por primera vez que unos protoplastos de remolacha que expresan la proteína de cabeza viral del BNYVV y la proteína quimérica derivada están protegidos contra la infección por este mismo virus.

Ejemplo 14

Regeneración de plantas a partir de callos transformados

Después de un primer paso de un mes sobre M.SB1 + C ó MSB1 + CK, los callos transformados son trasplantados cada mes sobre MSB1. Después de los plazos más o menos largos, que varían de una semana a varios meses, unos brotes y/o embriones regeneran sobre algunos de estos callos.

Se ha observado que, después de transformación, los callos tienen el mismo fenotipo que la suspensión de partida. Es decir que el tipo noduloso o habituado se encuentra de nuevo después de la transformación. Además, parece que sean los callos transformados de tipo noduloso que tengan la mayor aptitud para la regeneración. Permiten la regeneración de varias estructuras que se desarrollan bastante bien y rápidamente en planta, mientras que las estructuras obtenidas sobre los callos habituados transformados son muy raras, largas y muy difíciles de desarrollarse en planta.

Las estructuras regeneradas son muy heterogéneas morfológicamente. Las mismas son trasplantadas, y después de haber sido cortadas por la base con el escalpelo, sobre el medio MSBO.1 en cajas de Petri.

Cuando los brotes empiezan a desarrollar varias hojas, son puestos de nuevo en multiplicación vegetativa en macetas o cajas. Los brotes más desarrollados son entonces puestos en enraizado sobre MS + ANA 1 mg/L (ANA: ácido naftalenacético). Las raíces aparecen de 2 a 6 semanas después.

En cuanto las raíces están suficientemente desarrolladas, las plantas son aclimatadas en invernadero en tierra universal. Al cabo de 3 meses, las plantas están bien desarrolladas (ver foto) y han perdido la mayor parte de las variaciones fenotípicas debidas al cultivo *in vitro*.

Ejemplo 15

Expresión de la proteína de cabeza y de la proteína quimérica derivada en las remolachas transgénicas

Aunque eran conocidas las remolachas transgénicas, gracias a los tests de detección del gen codificante para la β -glucuronidasa, no era cierto que el gen interesante, a saber el que codifica para las proteínas de cabeza del BNYVV, estuviera bien expresado en estas plantas. Para saberlo, es preciso detectar estas proteínas en los tejidos de remolachas transformadas. Para detectar las proteínas en las transformantes, se ha recurrido a la técnica de Western blot (Ausubel *et al.*, 1987). Esta consiste en hacer emigrar las proteínas solubles extraídas del triturado de tejidos de los transformantes, sobre el gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (Laemmli, 1970). Las proteínas así separadas son transferidas por electrotransferencia sobre una membrana de nitrocelulosa. Esta membrana es a continuación hibridada con unos anticuerpos policlonales de conejos dirigidos contra el BNYVV. El revelado se realiza por adición de anticuerpos anticonejo conjugados con la fosfatasa alcalina, que constituye unos substratos cromógenos. La figura 11 muestra el tipo de resultados obtenidos. Los extractos de remolachas transgénicas que contienen el gen codificante para las proteínas de cabeza muestran una banda inmunorreactiva que emigra al mismo nivel que la proteína de cabeza del virus. Esta banda no está presente en los extractos de plantas no transformadas. Además, en los extractos de plantas transformadas, se detecta una banda de 29 Kd correspondiente a la proteína quimérica derivada de la 22 Kd por adición de 64 ácidos aminados, debida al "readthrough" (ejemplo 5). Estas dos proteínas de 22 y 29 Kd sólo han podido ser detectadas en unos extractos de raíces transformantes y no en las hojas. La figura 11 ilustra por tanto la expresión específica, en las raíces de remolachas transgénicas, de las proteínas de 22 KD y de 29 KD, a pesar de la utilización de un promotor constitutivo. La funcionalidad del promotor en las partes aéreas de la planta está confirmada por la expresión del gen marcador GUS en todos los tejidos.

El BNYVV se transmite y se desarrolla a nivel de las raíces, y es por tanto ventajoso que las proteínas susceptibles de inhibir el virus estén presentes en estos órganos.

Ejemplo 16

Obtención de semillas de remolachas transgénicas

Después de 2 a 3 meses de aclimatación en invernadero de las plantas transgénicas, se ha constatado que eran fenotípicamente conformes con la planta madre. En esta fase las plantas poseen de 10 a 15 hojas muy bien desarrolladas, y están siempre en estado de roseta. Para saber si las plantas obtenidas son totalmente normales y en particular fértiles, y si el gen introducido es transmitido a la descendencia, las plantas han sido vernalizadas para introducir la subida de semilla. Los transformantes primarios son por tanto puestos entre 2 y 7°C en la oscuridad durante 3 meses, y después en el campo en período de día largo. De un mes a un mes y medio después de la plantación en el campo, el tallo floral empieza a subir.

La floración tiene lugar tres meses aproximadamente después de la salida de vernalización, y los frutos están maduros dos meses después.

En cuanto a los glomérulos están bien secos, son recolectados y limpiados. Las semillas estarán preparadas para ser sembradas.

Ejemplo 17

Aplicación del método de la invención a diferentes variedades de Beta vulgaris

Los métodos de transformación y de regeneración descritos en los ejemplos 9 a 14, han sido aplicados a unas suspensiones celulares y a unas dispersiones de callos blancos friables salidos de plantas que provienen de una variedad "elite" (variedad parienta de híbridos comerciales).

Se han obtenido unas plantas transgénicas que expresan la proteína de cabeza del BNYVV. Esta expresión era específica en las raíces. Teniendo la variedad "elite" un ambiente genético diferente de las otras variedades transformadas, la expresión específica parece ser entonces conservada en la especie *Beta vulgaris*.

La reproductibilidad de estas técnicas ha sido verificada aplicando los métodos de transformación y de regeneración de la invención a otras variedades y en otros puntos geográficos por otro equipo de experimentadores. En cada caso, se han obtenido unas plantas transgénicas.

Ejemplo 18

Autofecundaciones y cruces de las plantas transgénicas resistentes a la rizomania

Unas semillas transgénicas se han obtenido a la vez sobre unas autofecundaciones de las plantas transformadas y sobre unos cruces de estas mismas plantas con otras tres cepas de remolachas machos estériles (una cepa macho estéril génica monogérmica, una cepa macho estéril génica multigérmica y una cepa macho estéril citoplásmica).

Se ha obtenido la expresión específica de la proteína de cabeza y de la proteína de 29 kD en las raíces de todas las plantas transgénicas salidas de autofecundaciones y de cruces.

Estos resultados atestiguan que esta expresión específica es mantenida en un ambiente genético diferente que el de los transformantes primarios.

Bibliografía

ABEL P.P., NELSON R.S., DE B., HOFFMANN N., ROGERS S.G., FRALEY R.T., BEACHY R.N., (1986)- *Science* 232: 738-743.

AKIYOSHI D.E., MORRIS R.O., HINZ R., MISCHKE B.S., KOSUGUE T., GARFINKEL D.J., GORDON M.P., NESTER E.W. (1983) - *PNAS* 80: 407-411.

AN. G. (1985) - *Plant Physiol.* 79: 568-570.

AN. G., WATSON B.D., STACHEL S., GORDON M.P., NESTER E.W. (1985) - *EMBO J.* 4: 277-284.

AN. G. (1986) - *Plant Physiol.* 81: 86-91.

AUSUBEL F.M., BRENT R., KINGTON R.E., MOORE D.D., SMITH J.A., SEIDMAN J.G. and STRUHL K. (1987) - *Current Protocol in Molecular Biology* - Published by Green Publishing Associates and Wiley Interscience.

BEVAN M., FLAVELL R.B., CHILTON M.D. (1983) - *Nature* 304: 184-187.

BEDROOK J.R., CHALEFF R.S., FALCO S.C., MAZUR B.J., YADAV N.S., (1988) - EP-A-0257993

BEVAN M. (1984) - *Nucl. ac. Res.* 12: 8711-8721.

BOLIVAR F.; RODRIGUEZ R.L., GREEN P.I., BETLACH M.C., HEYNECKER H.L., BOYER H.W., CROSA J.H., FALKOW S. (1977) - *Gene* 2: 95-113.

BOLIVAR F., BACKMAN K. (1979) - *Methods in Enzimol.* 68: 245-267.

BOUZOUBAA S., ZIEGLER V., BECK D., GUILLEY H., RICHARDS K., JONARD G. (1986) - *J. Gen. Virol.* 67: 1689-1700.

BROADBENT L. (1976) - *Ann. Rev. Phytopathol.* 14: 75.

CUOZZO M., O'CONNEL K.M., KANIEWSKI W., FANG R.X., CHUA N.H. and TUMER N.E. (1988) - *Biotechnology* 6: 549-557.

DALE P.J., MARKS M.S., BROWN M.M., WOOLSTON C.J., GUNN H.V., MULLINEAUX P.M., LEWIS D.M., KEMP J.M., CHEN D.F., GILMOUR D.M., and FLAVELL R.B. (1989) - *Plant Science* 63: 237-245.

DE BLOCK M., BOTTERMAN J., VANDEWIELE M., DOCKX J., THOEN C., GOSSELE V., RAO MOWA N., THOMSON C., VAN MONTAGU M., LEEMANS J., (1987) *EMBO J.* 6: n°9, 2513-18.

DETREZ C. TETU T., SANGWAN R.S., SANGWAN-NORREEL B.S. (1988) - *J. Exp. of Bot.* 39 (204): 917-926.

DITTA G., STANFIELD S., CORBIN D., HELINSKI D.R. (1980) - *PNASS* 77: 7347-7351.

FERNOW K.H. (1967) - *Phytopathol.* 57: 13-47.

FISCHOFF D.A., *et al* (1987), *BIO/TECHNOLOGY* 5: 807-813.

FRANCK A., GUILLEY H., JONARD G., RICHARDS K., HIRTH L. (1980) - *Cell* 21: 285-294.

FREYTAG A.H., ANAND S.C., RAO-ARELLI A.P. and OWENS L.D. (1988) - *Plant Cell Reports* 7: 30-34.

GERLACH W.L., LLEWELLYN D. and HASELOFF J. (1987) - *Nature* 328: 802-805.

GIELEN J.J.L., *et al*, Abstracts of 7th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture. I.A.P.T.C. Juin 1990, Amsterdam.

GUERCHE P., BELLINI C., LE MOULLEC J.M., CABOCHE M. (1987) - *biochimie* 69: 621-628.

HARRISON D.B., MAYO M.A. and BAULCOMBE (1987) - *Nature* 328: 799-802.

HARPSTER M.H., TOWNSEND J.A., JONES J.D.J., BEDROOK J., DUNSMUIR P. (1988) - *Mol. Gen. Genet.* 212: 182-190.

HOEKEMA A., HIRSCH P.R., HOYKAAS P.J.J. and SCHILLPEROOT R.A. (1983) - *Nature* 303: 179-180.

HOOD E.E., HELMER G.L., FRALEY R.T., CHILTON M.D. (1986) - *J. Bact.* 168: 1291-1301.

JEFFERSON R.A., KAVANAGH T.A. and BEVAN M.W. (1987) - *EMBO J.* 6: 3901-3907.

KRENS F.A., ZIJLSTRA C., VAN DEN MOLEN W., JAMAR D. and HUIZING H.J. (1988) - *Euphytica S.* 185: 194.

LAEMMLI V. (1970) - *Nature* 227: 680-685.

LEWELLEN R.T., SKOYEN I.O. and ERICHSEN A.W. (1987) - in 50th Winter Congress I.I. R. B. Bruxelles 11-12 February 1987, 136-156.

LINDSEY K. and JONES M.G.K. (1989) - *Plant Cell Reports* 8(2): 71-74.

LOESH-FRIES L.S., MERLO D., ZIMMENT T., BURHOP L., HILL K., KROHN K., JARNIS N., NELSON S., HALK E. (1987) - *EMBO J.* 6: 1845-1851.

MANIATIS T., FRITSCH E.F., SAMBROOK J. (1982) - *Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory.*

MARIANI C., *et al* (1990), *NATURE*, vol. 347: 737-741.

MAULE A.J., BOULTON M.I., WOOD K.R. (1980) - *Phytopath Z.* 97: 118-126.

MAXAN A.M. and GILBERT W. (1980) - *Methods Enzymol.*, 65: 499-560.

5 MESSING J. (1983) - in *methods in Enzymology* 101: 20-78 *Academic Press*, New York.

MURASHIGE T., SKOOG F. (1962) - *Plant Physiol.* 15: 473-497.

PERLAK J., *et al*, (1990) *BIOTECHNOLOGY*, vol. 8, 939-943.

10 PUTZ C. (1977) - *J. Gen. Virol.* 35: 397-401.

PUTZ C., RICHARD-MOLARD M- (1984) - *C.R. Acad. Agr. de France* 70: 370-378.

15 RICHARDS K., JONARD G., GUILLEY H., ZIEGLER V. and PUTZ C. (1985) - *J. Gen. Virol.* 66: 345-350.

RITCHIE G.A., SHORT K.C., DAVEY M.R. (1989) - *J. Exp. Bot.* 40(211): 277-283.

20 ROTHSTEIN S.J., JORGENSEN R.A., YIN J.C.P., YONG-DI Z., JOHNSON R.C. REZNIKOFF W.S. (1980) - *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol* 45: 99-106.

SALLE G., LE GOZ S. and TOQUET C. (1986) - *Physiol. Veg.* 24: 73-83.

25 SAMAC D.A., NELSON S.E., LOESCH-FRIES L.S. (1983) - *Virology* 131: 455-462.

SANDERS P.R., WINTER J.A., BARNASSON A.R., ROGERS S.G., FRALEY R.T. (1987) - *Nucl. Acid Res* 15: 1543-1548.

30 SANGER F., NICKLEN S., COULSON A.R. (1977) - *PNAS* 74: 5463-5467.

SAUNDERS J.W. and DOLEY W.P. (1986) - *J. Plant. Physiol.* 124: 473-479.

SCOTT R.J. and DRAPER J. (1987) - *Plant Mol. Biol.* 8: 264-274.

35 TAMADA T. and BABA T. (1973) - *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 39: 325-332.

TETU T., SANGWAN R.S. and SANGWANN-NORREEL B.S. (1988) - *J. Exp. Bot.* 38 (188): 506-517.

40 TUMER N.E., O'CONNEL K.H., NELSON R.S., BEACHY R.N., FRALEY R.T., SHAH D.H. (1987) - *EMBO J.* 6: 1181-1188.

TWIGG A.J. and SHERATT D. (1980) - *Nature* 283: 216-218.

45 VAECK M., *et al* (1987), *NATURE*, 328, 33-37.

VAN DER WERF S., BREGEGERE F., KOPECKA H., KITAMURA N., ROTHBERG P.G., KOURILOSKY P., WIMMER E., GIRARD M. (1981) - *PNAS* 78/5983-5987.

50 VAN DUM M.P., BOL J., VAN VLOTEN-DOTING L. (1987) - *Virology* 159: 299-305.

VIEIRA J., MESSING J. (1982) - *Gene* 19: 259-268.

WATTS J.W., KING J.M., STACEY N.J. (1987) - *Virology* 157: 40-46.

55 WIDHOLM J.M. (1972) - *Stain Tech.* 47: 189-194.

YACOUB A. and TEPPER D. (1987) - in 50th Winter Congress I.I.R.B. Bruxelles 11-12 February 1987, 107-308.

60 ZIEGLER V., RICHARDS K., GUILLEY H., JONARD G., PUTZ C. (1985) - *J. Gen. Virol.* 66: 2079-2087.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de transformación de células vegetales que pertenecen a la especie *Beta vulgaris*, **caracterizado** porque comprende la puesta en contacto de una dispersión de callos blancos friables en un medio de cultivo celular vegetal líquido que contiene 0 a aproximadamente $3,0 \text{ mgL}^{-1}$ de una citoquina con *Agrobacterium tumefaciens* que contiene un vector que lleva un gen destinado a ser introducido en las células vegetales, seguido de cocultivo de las células vegetales y de las bacterias para dar lugar a unos callos friables transformados.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque comprende las etapas sucesivas siguientes:
 - I) inducción de callos blancos friables a partir de explantes;
 - II) dispersión de los callos en un medio de cultivo celular vegetal líquido que contiene 0 a aproximadamente $3,0 \text{ mgL}^{-1}$ de una citoquinina;
 - III) puesta en contacto de la dispersión con *Agrobacterium tumefaciens* que contiene un vector que lleva un gen destinado a ser introducido en las células vegetales, seguida de cocultivo de las células vegetales y de las bacterias;
 - IV) lavado de las células vegetales para eliminar las bacterias y selección de las células transformadas sobre un medio selectivo;
 - V) cultivo de las células transformadas seleccionadas para obtener unos callos friables transformados.
3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, **caracterizado** porque los callos blancos friables son inducidos a partir de hojas jóvenes, que tienen por ejemplo una longitud de 3 a 5 cm, extraídas de una planta con una edad de menos de tres meses.
4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque la dispersión de los callos se efectúa en un medio de cultivo celular vegetal que contiene 6-bencilaminopurina (BAP), más particularmente aproximadamente 1 mgL^{-1} BAP.
5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el medio de cultivo celular vegetal es el medio de Murashige y Skoog (1962), llamado medio M.S.
6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el cocultivo de células vegetales y de las bacterias se efectúa durante 3 días en la oscuridad sobre un medio de cultivo celular vegetal tal como el medio MS, eventualmente adicionado con citoquinina, por ejemplo aproximadamente 1 mgL^{-1} BAP.
7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque la eliminación de las bacterias se efectúa por lavado de las células vegetales con un medio de cultivo celular vegetal que contiene un agente bacteriostático que inhibe el crecimiento de *Agrobacterium*, por ejemplo la cefotaxima.
8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque la selección de las células transformadas se efectúa sobre un medio que contiene kanamicina.
9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el cultivo de las células transformadas seleccionadas se efectúa sobre un medio de cultivo sólido, tal como el medio M.S sólido, adicionado con citoquinina, agente bacteriostático y agente selectivo.
10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado** porque el gen destinado a ser introducido en las células vegetales se elige entre un gen que confiere un carácter de interés agronómico o industrial, por ejemplo un gen de resistencia a la infección por un virus, tal como un gen codificante para la proteína de cabeza del virus BWYV o del virus BNYVV, un gen que confiere una resistencia a un herbicida o a un insecticida, o también un gen cuya expresión confiere la esterilidad macho.
11. Procedimiento de regeneración de brotes y/o embriones transgénicos que pertenecen a la especie *Beta vulgaris* a partir de explantes, **caracterizado** porque comprende las etapas sucesivas siguientes:
 - I) obtención de callos friables transformados según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
 - II) trasplante de los callos transformados sobre un medio de cultivo que contiene 0 a aproximadamente 3 mgL^{-1} de una citoquinina, y eventualmente un agente bacteriostático y un agente selectivo hasta la aparición de brotes y/o embriones transgénicos.
12. Procedimiento según la reivindicación 11, **caracterizado** porque el medio de cultivo es el medio M.S adicionado con aproximadamente 1 mgL^{-1} BAP y eventualmente aproximadamente 300 mgL^{-1} de cefotaxima y 200 mgL^{-1} de kanamicina.

13. Procedimiento de regeneración de plantas transgénicas que pertenecen a la especie *Beta vulgaris*, **caracterizado** porque comprende las etapas sucesivas siguientes:

- I) regeneración de brotes y/o embriones transgénicos según el procedimiento de la reivindicación 11;
- II) trasplante de los brotes y/o de los embriones transgénicos sobre un medio de cultivo tal como el medio M.S adicionado con aproximadamente 0,1 mg l⁻¹ de citoquinina, por ejemplo de la BAP;
- III) puesta de las estructuras regeneradas en multiplicación vegetativa seguida de enraizado sobre un medio de cultivo tal como el medio M.S que contiene ácido naftalenacético, por ejemplo aproximadamente 1 mg l⁻¹.

14. Procedimiento de producción de semillas de plantas transgénicas que pertenecen a la especie *Beta vulgaris*, **caracterizado** porque comprende las etapas siguientes:

- I) regeneración de plantas transgénicas según el procedimiento de la reivindicación 13;
- II) vernalización de las plantas transgénicas y recolección de las semillas después de floración.

15. Callos friables transformados que pertenecen a la especie *Beta vulgaris* y que pueden ser producidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

16. Brotes y/o embriones transgénicos que pertenecen a la especie *Beta vulgaris* y que pueden ser producidos según cualquiera de las reivindicaciones 11 y 12.

17. Plantas transgénicas que pertenecen a la especie *Beta vulgaris* y que pueden ser producidas según el procedimiento de la reivindicación 13.

18. Semillas transgénicas de plantas transgénicas que pertenecen a la especie *Beta vulgaris* y que pueden ser producidas según la reivindicación 14.

19. Planta transgénica que pertenece a la especie *Beta vulgaris* y resistente a la infección por el virus de las nervaduras amarillas y necróticas de la remolacha azucarera (BNYVV), siendo dicha planta transformada de una manera estable por un fragmento de ácido nucleico, cuyo producto de expresión es capaz de conferir dicha resistencia, siendo dicho fragmento derivado del extremo 5' del ARN2 genómico o subgenómico del BNYVV, o del cADN correspondiente, codificando este fragmento para por lo menos una parte de las proteínas codificadas por los nucleótidos 145 a 3285 de la secuencia salvaje del ARN2, y estando bajo el control de un promotor que permite la expresión del fragmento en las células de la planta y estando en la orientación sentido o antisentido.

20. Planta transgénica según la reivindicación 19, en la cual dicho fragmento codifica para por lo menos una parte de la proteína codificada por los nucleótidos 145 a 2218 del ARN2 o para una variante de esta proteína que presenta una homología de por lo menos 80% y que comprende la inserción, la sustitución o la delección de ácido(s) aminado(s).

21. Planta transgénica según la reivindicación 20, en la cual dicho fragmento codifica para la proteína codificada por los nucleótidos 145 a 708 y, además, para una parte de la proteína codificada por los nucleótidos 709 a 2218 del ARN2 del BNYVV.

22. Planta transgénica según la reivindicación 21, en la cual dicho fragmento codifica para la proteína codificada por los nucleótidos 145 a 871 del ARN2 del BNYVV.

23. Planta transgénica según la reivindicación 22, en la cual dicho fragmento está compuesto por los nucleótidos 91 a 871 del ARN2 del BNYVV.

24. Planta transgénica según la reivindicación 20, en la cual dicho fragmento codifica para por lo menos una parte de una variante de la proteína codificada por los nucleótidos 145 de 2218, distinguiéndose dicha variante de la secuencia salvaje por la presencia de la secuencia Glu Asp Leu Pro que reemplaza los ácidos aminados His Ala codificados por los nucleótidos 253 a 258 en la secuencia salvaje.

25. Planta transgénica según la reivindicación 24, en la cual dicho fragmento codifica para una parte de la variante y está compuesto por los nucleótidos 91 a 871 de la secuencia salvaje, siendo los nucleótidos 253 a 258 de la secuencia salvaje reemplazados por los que codifican para Glu Asp Leu Pro.

26. Planta transgénica según la reivindicación 24, en la cual dicho fragmento codifica para una parte de la variante, correspondiendo dicha parte a la codificada por los nucleótidos 145 a 255 en la secuencia salvaje, estando los nucleótidos 253 a 255 de la secuencia salvaje reemplazados por los que codifican para Glu.

27. Planta transgénica según la reivindicación 24, en la cual dicho fragmento codifica para una parte de la variante, correspondiendo dicha parte a la codificada por los nucleótidos 256 a 871 en la secuencia salvaje, estando los nucleótidos 256 a 258 de la secuencia salvaje reemplazados por los que codifican para Asp Leu, Pro.

28. Planta transgénica según la reivindicación 20, en la cual dicho fragmento codifica para por lo menos una parte de una variante de la proteína codificada por los nucleótidos 145 a 2218, distinguiéndose dicha variante de la secuencia salvaje por la presencia de la secuencia Arg Ser Ser Gly en lugar de los ácidos aminados codificados por los nucleótidos 637 a 651 de la secuencia salvaje, formando la secuencia Arg Ser Ser Gly el carboxi terminal de la proteína.

29. Planta transgénica según la reivindicación 28, en la cual dicho fragmento codifica para una parte de la variante y está compuesto por los nucleótidos 91 a 871 de la secuencia salvaje, estando los nucleótidos 637 a 654 de la secuencia salvaje reemplazados por los que codifican para Arg Ser Ser Gly Stop.

30. Planta transgénica según la reivindicación 29, en la cual dicho fragmento codifica para una parte de la variante, correspondiendo dicha parte a la codificada por los nucleótidos 144 a 640 de la secuencia salvaje.

31. Planta transgénica según la reivindicación 29, en la cual dicho fragmento codifica para una parte de la variante y está compuesto por los nucleótidos 641 a 871 de la secuencia salvaje, estando los nucleótidos 641 y 642 de la secuencia salvaje reemplazados por GA y estando los nucleótidos 643 a 654 reemplazados por los que codifican para Ser Ser Gly Stop.

32. Planta transgénica según la reivindicación 19, que comprende un fragmento del extremo 5' del ARN2 subgenómico del BNYVV, o del cADN correspondiente, codificando dicho fragmento para por lo menos una parte de la proteína codificada por los nucleótidos 2133 a 3285 del ARN2, o para una variante de esta proteína que presenta por lo menos 80% de homología y que comprende la inserción, la sustitución o la delección de ácido(s) aminado(s).

33. Planta transgénica según la reivindicación 32, en la cual dicho fragmento codifica para la proteína codificada por los nucleótidos 2133 a 2774 del ARN2 del BNYVV.

34. Planta transgénica según la reivindicación 33, en la cual dicho fragmento está compuesto por los nucleótidos 2078 a 2774 del ARN2 del BNYVV.

35. Planta transgénica según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 34, **caracterizada** porque expresa la proteína que confiere la resistencia, y codificada por dicho fragmento, únicamente en las raíces.

36. Planta transgénica según la reivindicación 35, **caracterizada** porque el promotor que controla la expresión de dicha proteína es un promotor constitutivo, por ejemplo el pNos ó el p35S.

37. Planta transgénica según la reivindicación 35, susceptible de ser obtenida por el procedimiento de la reivindicación 13.

38. Semillas transgénicas de plantas transgénicas según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 37.

39. Semillas de plantas transgénicas según cualquiera de las reivindicaciones 17 o 19 a 37, que comprende unas semillas transgénicas según la reivindicación 38.

40. Procedimiento de producción de plantas transgénicas que pertenecen a la especie *Beta vulgaris* y que resisten la infección por el BNYVV, expresando dicha planta, específicamente en las raíces, una proteína capaz de conferir dicha resistencia, comprendiendo dicho procedimiento la transformación, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 por medio de *Agrobacterium tumefaciens*, de células que provienen de *Beta vulgaris* con uno de los fragmentos de ácido nucleico tales como los descritos en cualquiera de las reivindicaciones 19 a 34, estando la transcripción de dicho fragmento bajo el control de un promotor constitutivo tal como el p35S o el pNos, seguido de la regeneración de una planta transgénica a partir de las células transformadas.

FIGURA 1

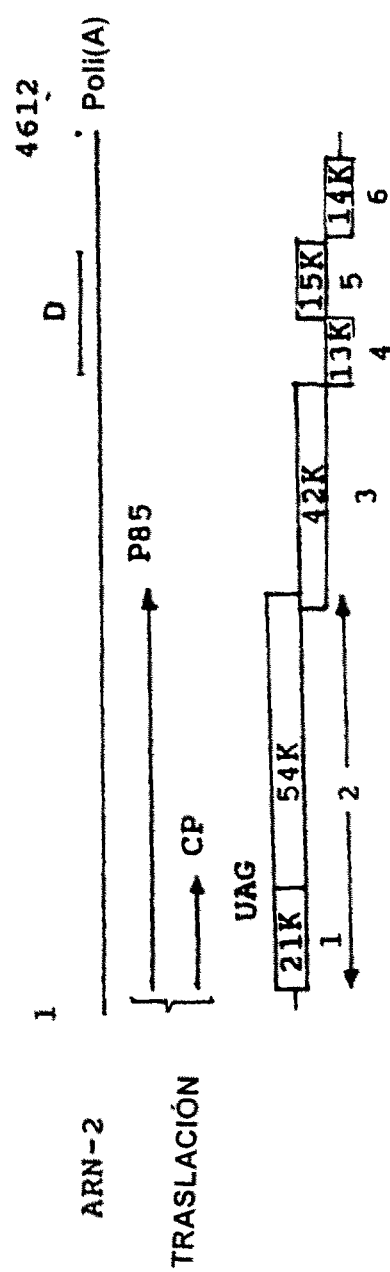


FIGURA 2

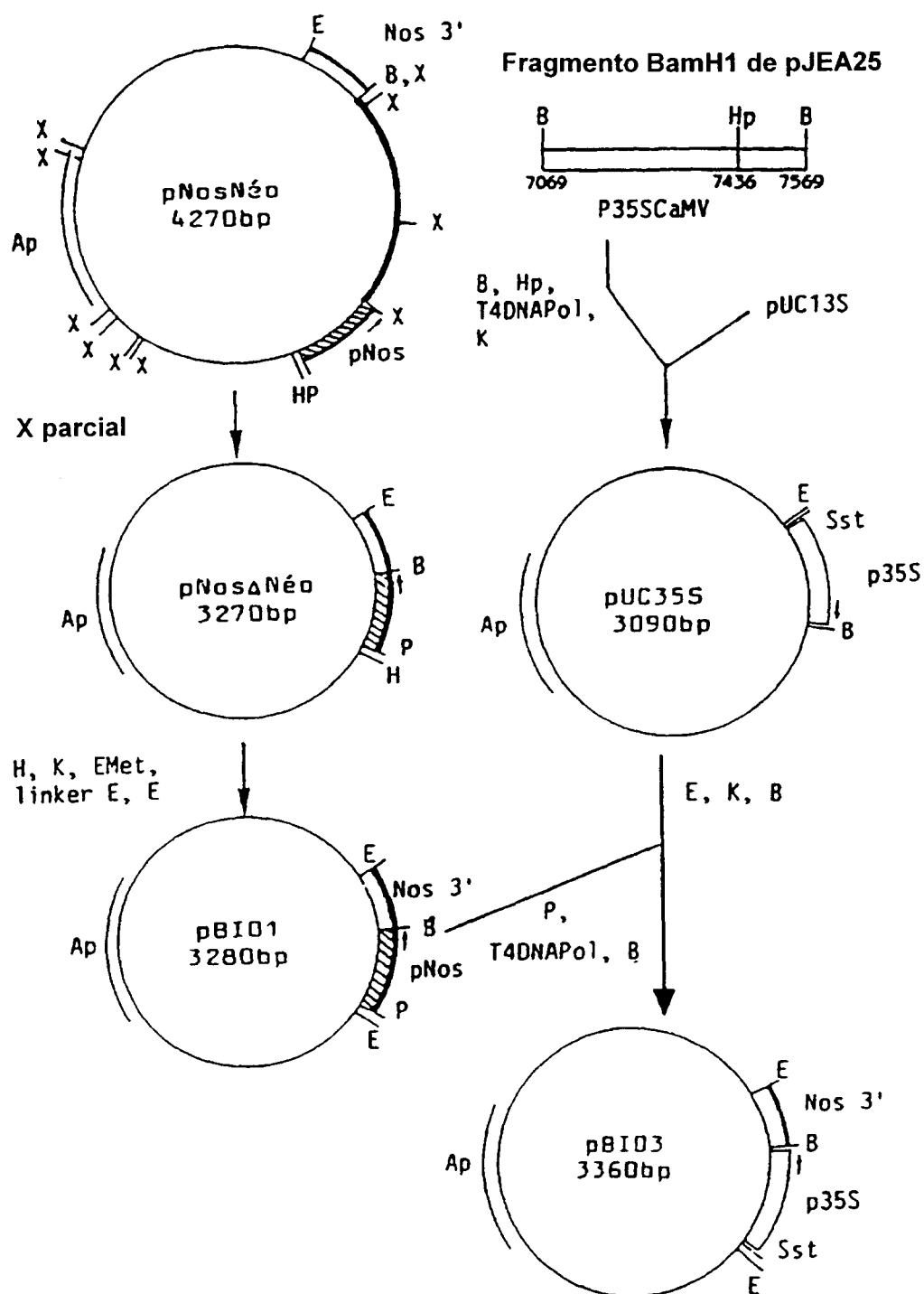
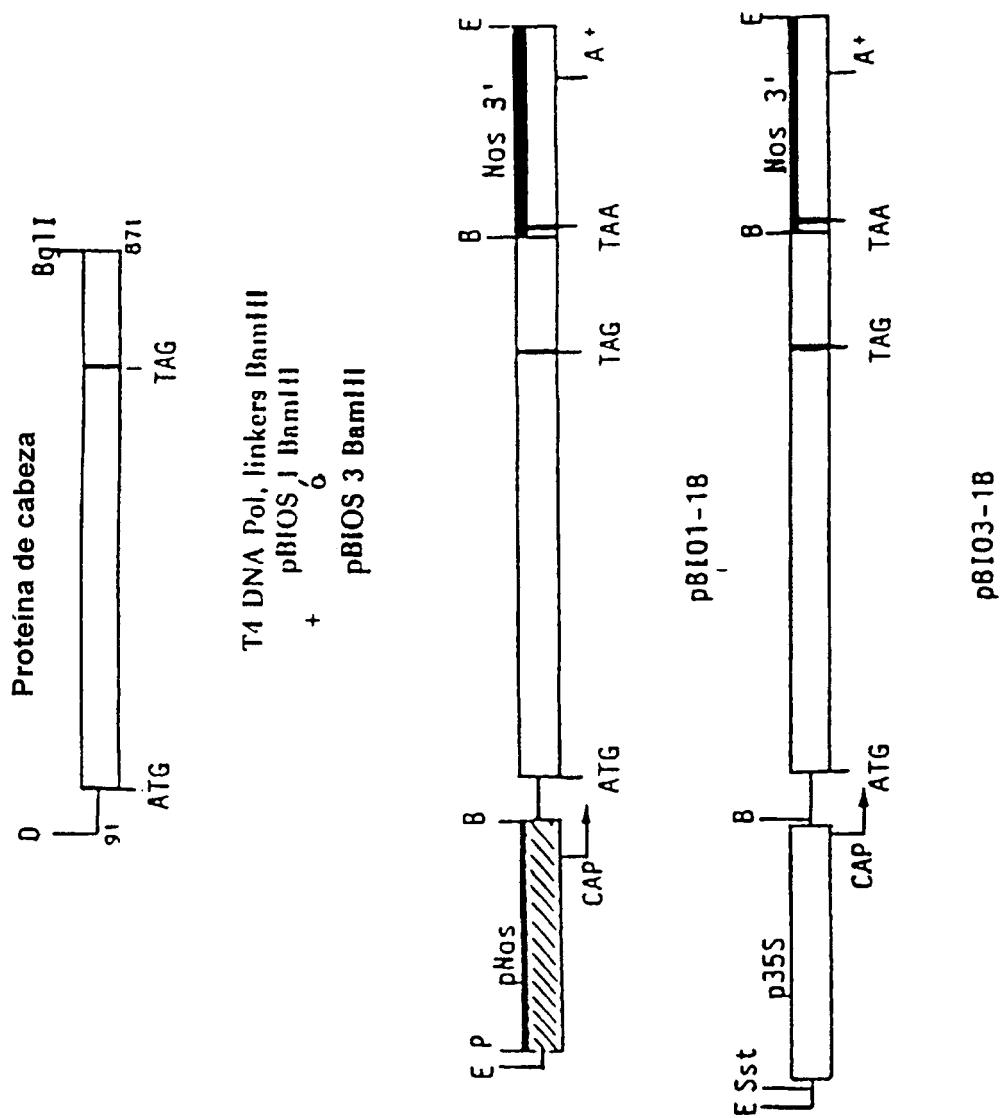


FIGURA 3



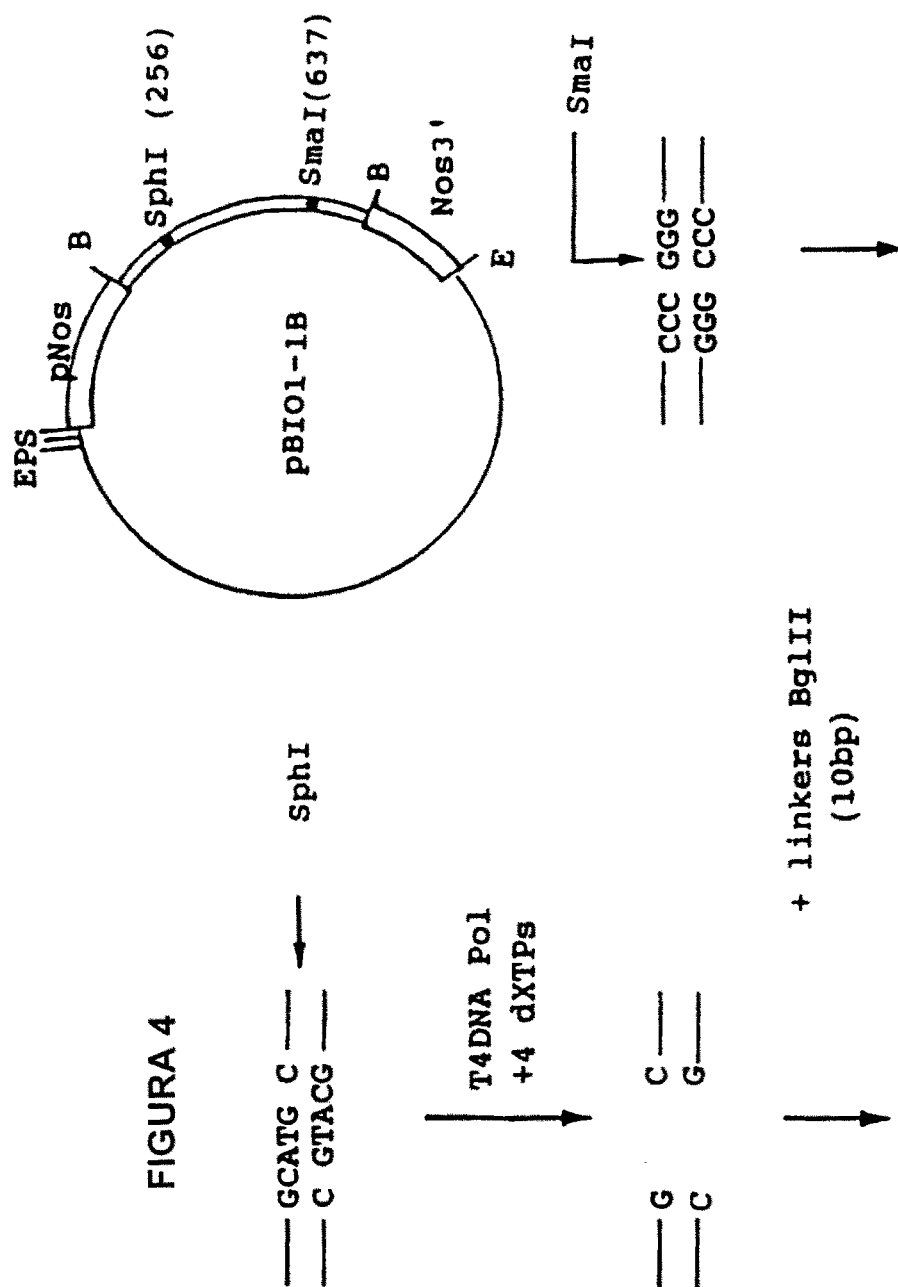


FIGURA 4 CONTINUACIÓN 1

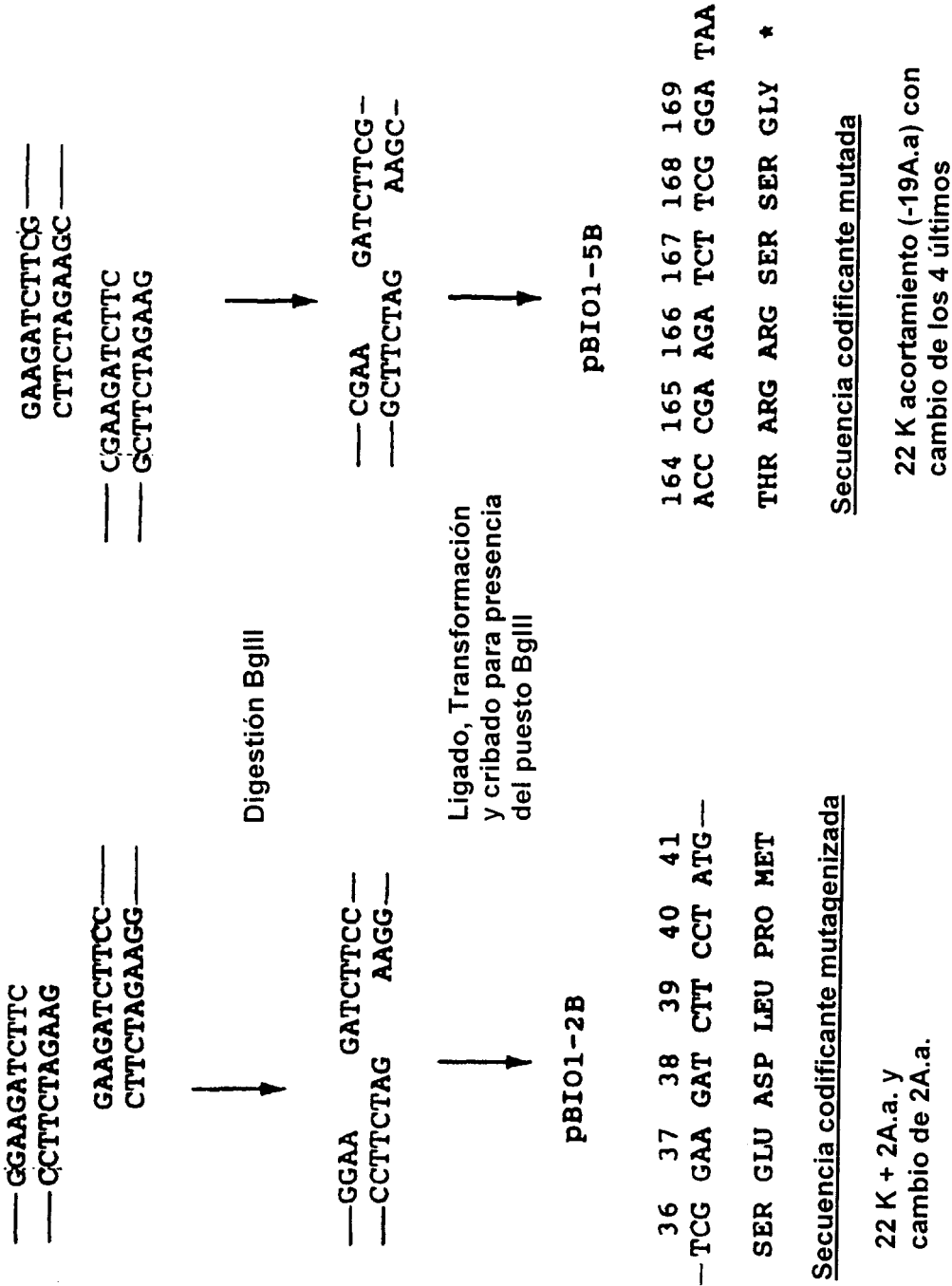


FIGURA 4 CONTINUACIÓN 2

36	37	38	39		164	165	166	167	168	169	170
TCG	CAT	GCT	ATG	---	ACC	CGG	GAT	AAA	TTT	GAG	GAC
---					---						---
SER	HIS	ALA	MET		THR	ARG	ASP	LYS	PHE	GLU	ASP

22 K Tipo salvaje

FIGURA 5

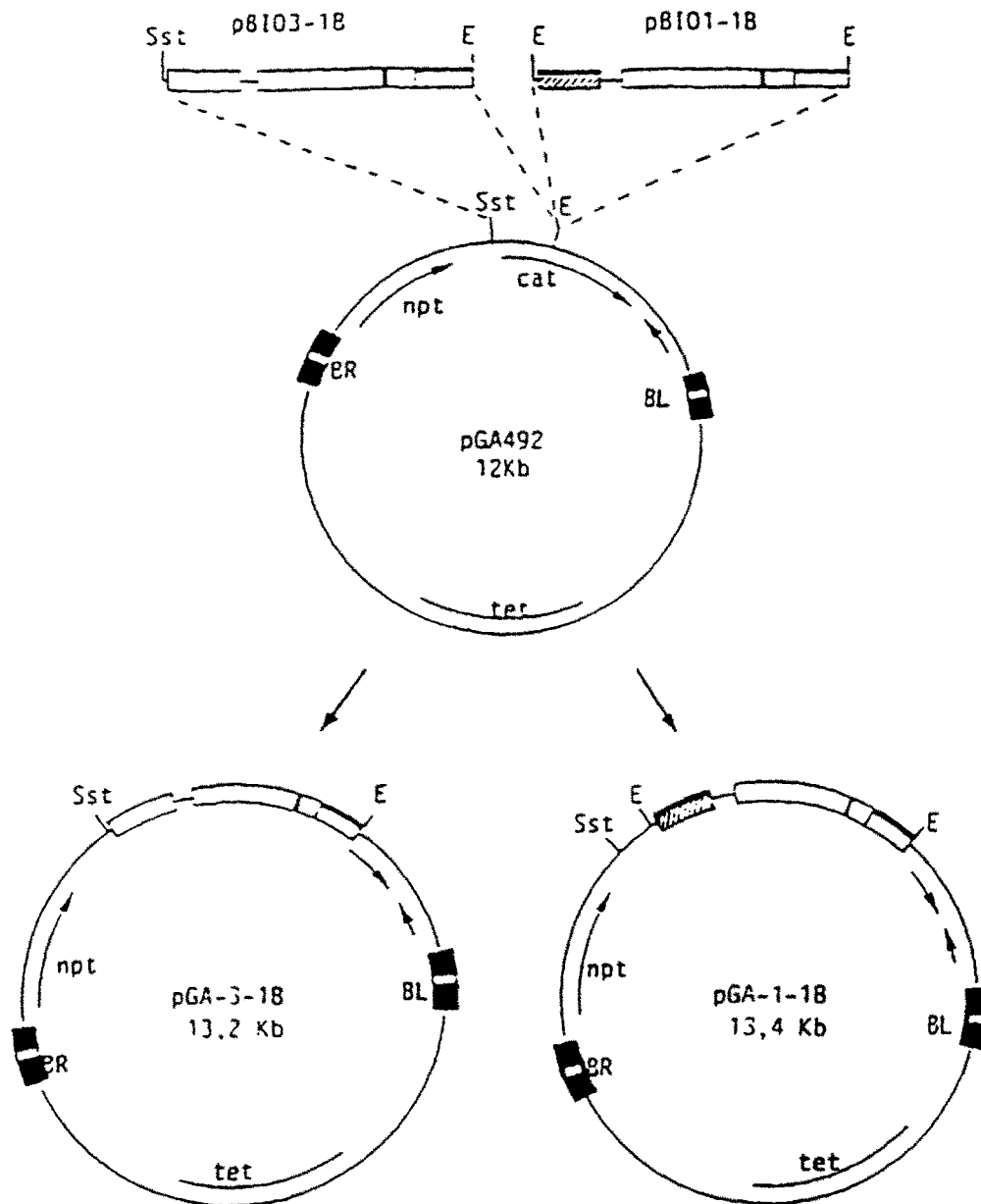


FIGURA 6

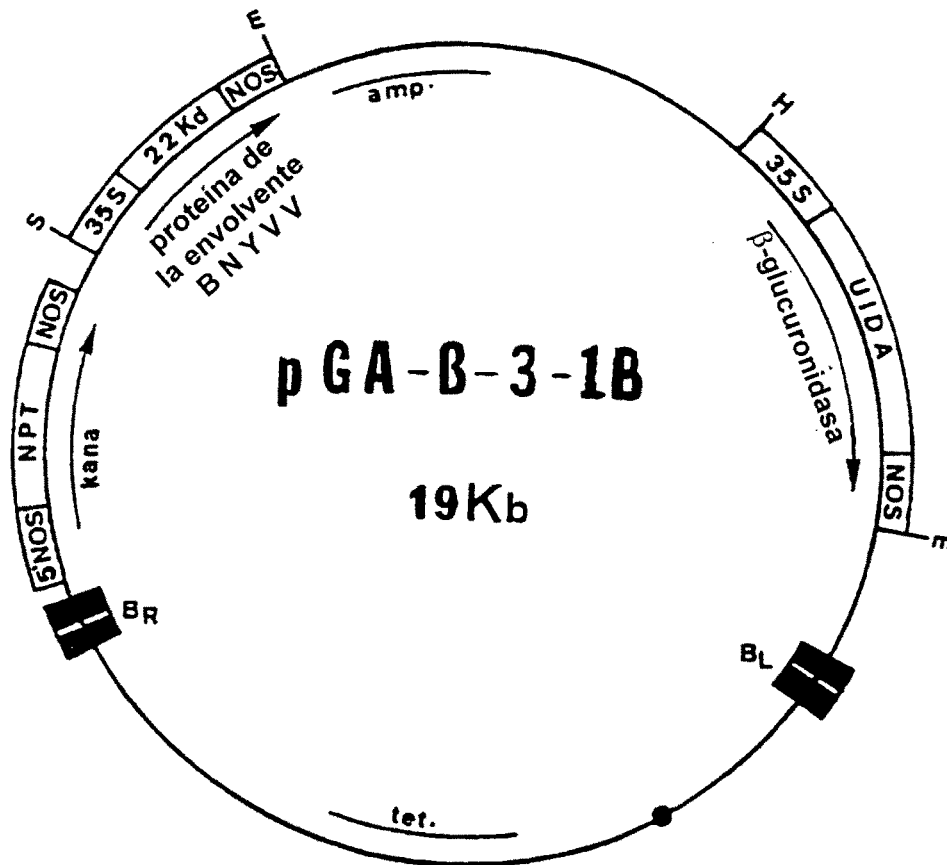


FIGURA 7

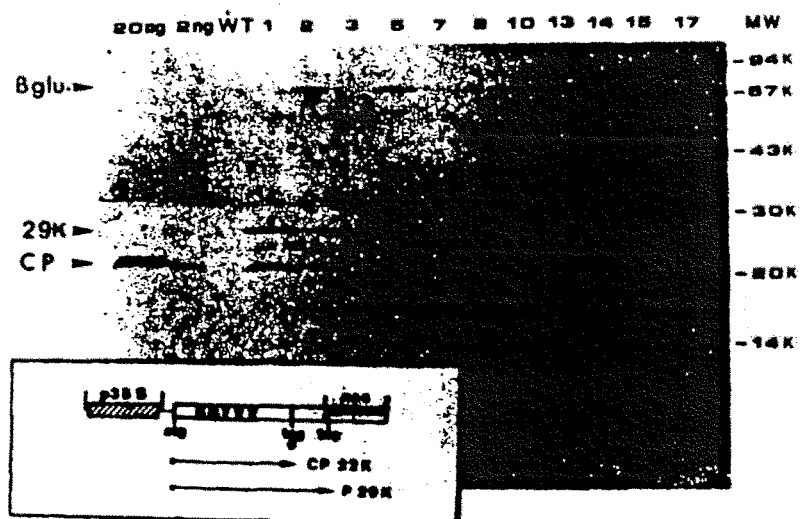


FIGURA 8

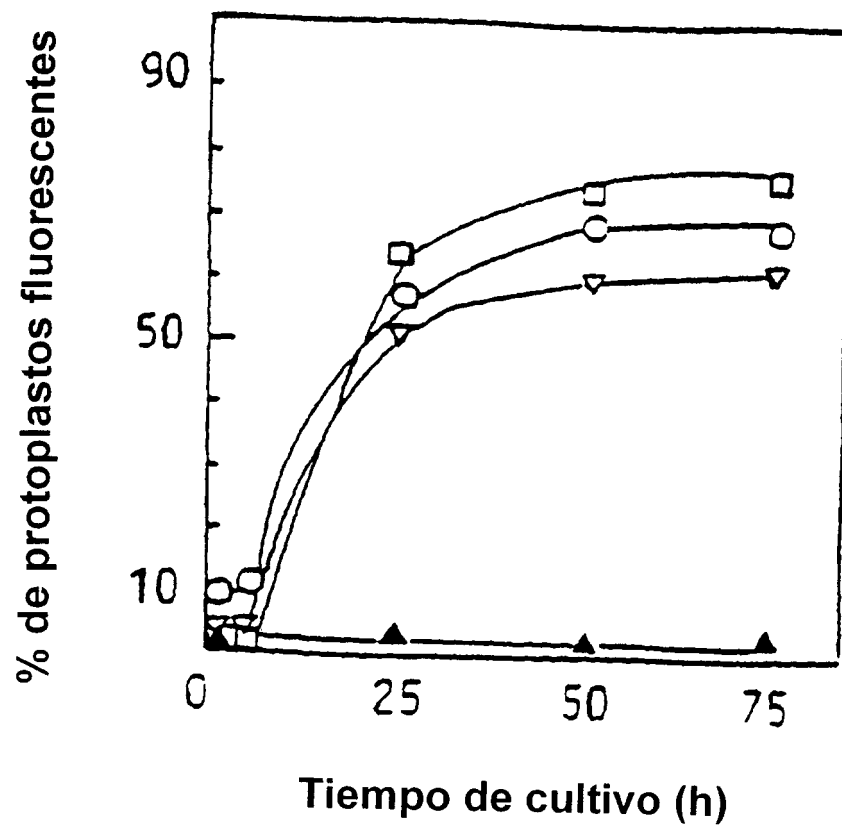


FIGURA 9

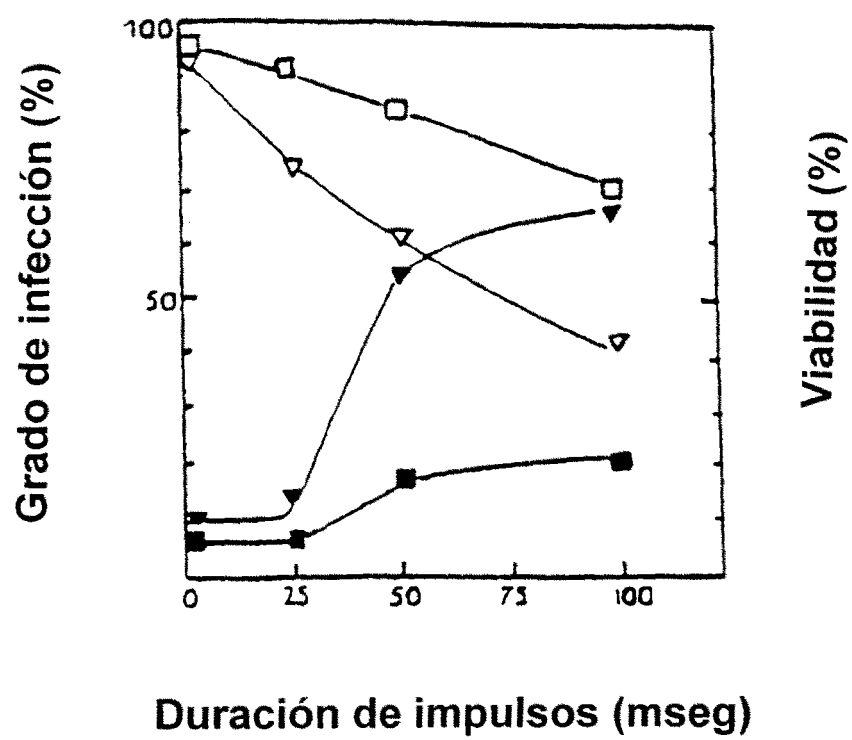


FIGURA 10

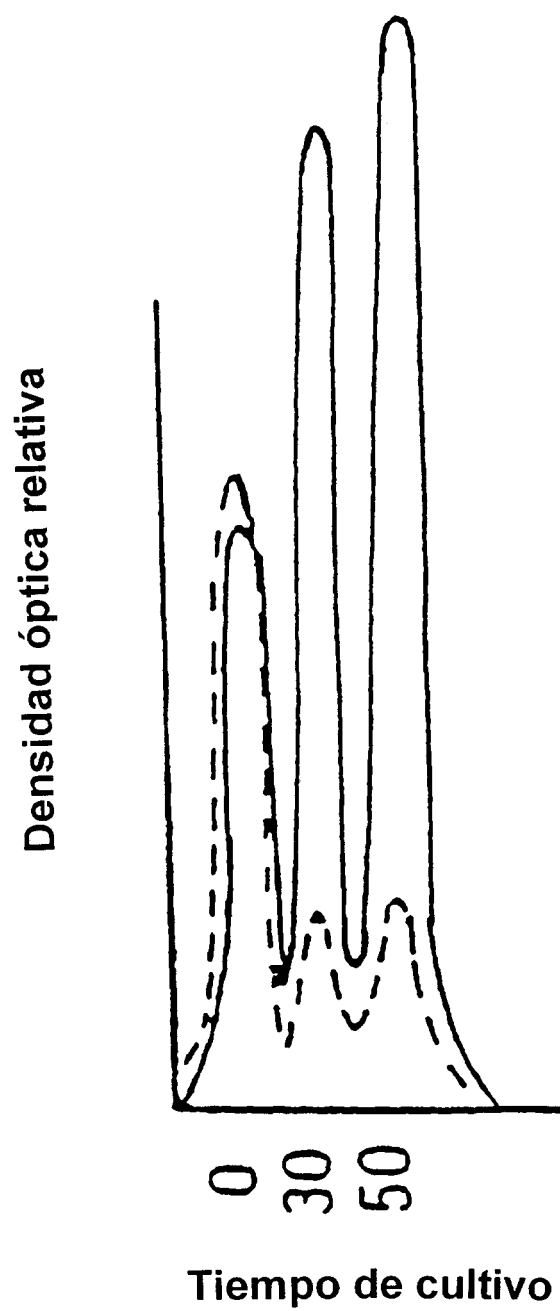


FIGURA 11

