



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 316 461**

51 Int. Cl.:
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01955324 .7**
96 Fecha de presentación : **28.06.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1294907**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.03.2003**

54 Título: **Vectores binarios para la transformación mejorada de sistemas vegetales.**

30 Prioridad: **28.06.2000 EP 00113631**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2009

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

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

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

ES 2 316 461 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Vectores binarios para la transformación mejorada de sistemas vegetales.

5 La presente invención se relaciona con un sistema de nuevos vectores binarios caracterizado por contener, a pesar de su tamaño extraordinariamente pequeño, todos los elementos necesarios para la transferencia a las agrobacterias y a las plantas.

10 La transformación de las plantas con ayuda de la transferencia de genes mediada por agrobacterias se describe en la literatura. Los vectores basados en los plásmidos Ti de las agrobacterias permiten la transformación de un amplio rango de especies vegetales, utilizando un sistema bacteriano natural para la introducción de ADN en el genoma nuclear de las plantas. Como parte de este parasitismo altamente desarrollado, la agrobacteria transfiere una parte definida de su ADN, el ADN de transferencia (ADNt), limitado por repeticiones de 25 bp de largo, denominadas también borde izquierdo y derecho, al ADN cromosomial de las plantas (Zupan *et al.*, The Plant Journal 23(1), 11-28. 2000). La acción combinada de los llamados genes *vir*, presentes en los plásmidos Ti iniciales, posibilita esta transferencia de ADN del ADNt. La transferencia de genes mediada por agrobacterias hace uso de las ventajas de este sistema transformador vegetal natural. Para ello se diseñaron los llamados vectores binarios, que permiten una transferencia de genes útiles o construcciones de genes más o menos efectiva. Las anteriores investigaciones no permitían reconocer ninguna normativa en lo que al emplazamiento de la incorporación del ADN extraño al genoma del ADN de las plantas se refiere. Se ha descubierto que el ADNt del vector binario limitado por las repeticiones (Left y Right Border) se transfiere de manera relativamente precisa (Tinland *et al.*, Trends in Plant Science 1 (6), 178-184. 1996). Son partes funcionales fundamentales del vector binario los ADNt con las repeticiones de borde, así como las secuencias procarióticas de vectores con los orígenes de replicación (*ori*) para la proliferación y conservación en las bacterias (*E. coli* y agrobacteria).

25 Los vectores binarios hasta ahora descritos se basan en los plásmidos "broad host range" ("de amplio espectro huésped") como pRK252 (Bevan *et al.*, Nucl. Acid Res. 12, 8711-8720, 1984) y pTJS75 (Watson *et al.*, The EMBO Journal 4, n° 2, 277-284, 1985), que poseen un amplio espectro huésped y derivan del plásmido tipo P RK2. Estos presentan evidentemente el inconveniente de que son inestables en condiciones no selectivas (Ditta *et al.*, plásmido 30 13, 149-153, 1985). La WO 99/01563 describe un vector para la transformación de plantas conteniendo un ADNt con secuencia de bordes flanqueantes y conteniendo una secuencia de ADN (gen codificador para una toxina) situada fuera del ADNt. Ésta evita que se desarrollen plantas transformadas, que tengan secuencias de vectores diferentes de las del ADNt. Un gran grupo de los vectores binarios empleados se derivan del pBIN19 (Bevan *et al.*, Nucl. Acid Res. 12, 8711-8720, 1984), que contiene, junto al borde del plásmido Ti pTiT37, el origen de replicación RK2 activo en las agrobacterias con los elementos *cis* relevantes *oriV* y *oriT*, así como el origen *ColE1* del pBR322. Hajdukiewicz *et al.* desarrolló un nuevo vector binario (pPZP), menor y más eficiente que los hasta ahora habituales (Hajdukiewicz *et al.*, Plant Molecular Biology 25, 989-994, 1994). En vez del origen de replicación RK2, el vector pPZP allí descrito posee el origen de replicación del plásmido de *Pseudomonas* pVS1, que presenta la organización típica de un sitio de partición completo y, por tanto, factores para la transmisión hereditaria estable en las agrobacterias a lo largo de generaciones (Itoh *et al.*, Plasmid 11, 206-220, 1984). El segmento pVS1 origina, mediante su completo sistema de partición, la estabilidad genética a lo largo de generaciones sin presión de selección. Esta propiedad, que no tienen los vectores binarios basados en RK2, parece ser esencial para un mayor ratio de transformación en el caso de la colza.

45 Anteriores análisis de las secuencias necesarias para la transferencia han probado que sólo son esenciales dos elementos de actuación *cis*. Estas dos repeticiones directas no completamente idénticas (llamadas bordes) de 25bp de longitud flanquean el ADNt. Cada ADN situado entre estos bordes se transfiere de manera dirigida (Wang *et al.*, Cell 38, 455-462. 1984). Mientras que el borde derecho es siempre necesario y se corta muy exactamente, las modificaciones en el borde izquierdo no evitan obligatoriamente la transferencia de ADN. El extremo izquierdo del ADN transferido es variable. Por este motivo se transfieren, además del ADNt con las secuencias de nucleótidos transgénicas deseadas, también secuencias de vectores no deseadas, por ejemplo, genes resistentes bacterianos, al genoma de las plantas (Hanson *et al.*, The Plant Journal 19(6), 727-734. 1999, Kononov *et al.*, The Plant Journal 11, 945-957. 1997, Martineau *et al.*, The Plant Cell 6, 1032-1033. 1994, Ramanathan *et al.*, Plant Mol Biol. 28, 1149-1154. 1995). Sin embargo, esto no es deseable, particularmente por motivos de seguridad, para un empleo de estas plantas en la economía agrícola. Por tanto, los sistemas hasta ahora conocidos requieren análisis moleculares costosos de las plantas transformadas producidas, si éstas tuvieran que liberarse para un empleo en la agricultura.

60 Otro inconveniente de los vectores binarios existentes es el desventajoso tamaño de manipulación y el bajo número de copias, por ejemplo, del pBIN19 de 12 kb (Bevan *et al.*, Nucl. Acid Res. 12, 8711-8720, 1984) o del pGA482 de 13 kb (An *et al.*, The EMBO Journal 4, n° 2, 277-284. 1985). El bajo número de copias conlleva bajos rendimientos de ADN de los plásmidos y dificulta las clonaciones. Los orígenes de replicación inestables pueden conducir a una pérdida variable de plásmidos durante la proliferación. El vector pGreen con un tamaño de 4,6 kb es muy pequeño, pero le faltan los elementos para la proliferación estable en las agrobacterias, de forma que sólo se pueda emplear junto con especiales cepas de agrobacterias (Helles *et al.*, Plant Molecular Biology 42, 819-832. 2000). Con frecuencia falta también un número suficiente de enzimas restrictivas para la clonación de los casetes de expresión deseados o los vectores permiten sólo el empleo de menos marcadores de selección. A los vectores binarios anteriores les falta además la posibilidad de eliminar de nuevo los marcadores de selección de las líneas transgénicas. No son posibles simples análisis de la secuencia con primers estándar, ya que los sitios de reconocimiento para los primers de secuenciado

ES 2 316 461 T3

comercialmente habituales no se encuentran presentes en los vectores binarios. Los sitios restrictivos únicos, que se encuentran, adicionalmente a los sitios de multiclonación, sobre el ADNt o en el vector y posibilitan una manipulación modular, faltan del mismo modo que los sitios restrictivos, que permiten un “genestacking” (“apilamiento de genes”). Es, por tanto, objetivo de la presente invención, proporcionar un sistema, que no siga presentando los inconvenientes citados anteriormente.

Este objetivo se resuelve conforme a la invención con un nuevo sistema de vectores binarios, que se distinguen por su complejidad y modularidad y, entre otros, por una secuencia adicional de borde. La presencia de determinados sitios restrictivos únicos, independientes del sitio de multiclonación, en el ADNt, pero también en el vector, que fanquea el ADNt, ofrece la posibilidad de inserción de módulos cualesquiera. La combinación de los elementos individuales es nueva.

En este contexto se entiende por vector binario conforme a la invención un vector, que pueda proliferar tanto en *E. coli* como también en agrobacterias y contenga los elementos necesarios para la transferencia a un sistema vegetal.

Es también objeto de la invención un procedimiento para la generación de vectores binarios que cumpla el objetivo descrito anteriormente. Un vector binario conforme a la invención se elabora preferentemente en 3 pasos:

En el primer paso se incorporan, tras la supresión del ADNt y de las secciones adyacentes de un vector de la familia pPZP (Hajdukiewicz *et al.*, Plant Molecular Biology 25, 989-994. 1994), otros fragmentos PCR conteniendo los bordes, un sitio de multiclonación y un sitio único para la clonación de los marcadores de selección junto al borde izquierdo de tal manera, que el marcador de resistencia bacteriano del vector se encuentre junto al borde derecho. Además, el vector conforme a la invención pSUN1 se reduce unos 0,7 kb en comparación con, por ejemplo, pPZP200. En el segundo paso se eliminan, con 2 supresiones diferentes, todos los sitios NotI y otras regiones en parte no funcionales del vector (pSUN10). A ello pertenece también el sitio de reconocimiento del nic, el origen de transferencia para la transferencia conjugal de plásmidos, sin la que no es ya posible una transferencia a otras bacterias por conjugación natural. Esto representa, en lo que a las consideraciones relevantes para la seguridad se refiere, una gran ventaja frente a otros plásmidos binarios, de los que sólo el plásmido pGreen no puede seguirse conjugando como un vector derivado del pUC, que no contenga ningún sitio de reconocimiento del nic (Hellens *et al.*, Plant Molecular Biology 42, 819-832. 2000). La escisión de esta sección de plásmido condujo en *E. coli* para el plásmido pAT153 frente al plásmido pBR322, a un aumento del número de copias de 1,5 - 3 veces (Twigg *et al.*, Nature 283, 216-218. 1980). En este vector de la llamada segunda generación se insertó, durante la escisión del sitio NcoI, la secuencia “overdrive” del plásmido Ti pTiA6. Esta secuencia actúa positivamente en cis sobre el corte del ADNt y, por tanto, sobre la transferencia del ADNt (Toro *et al.*, Natl. Acad. Sci. USA 85, 8558-8562. 1985).

Las manipulaciones en este segundo paso conducen a otra reducción del tamaño del vector pSUN10 conforme a la invención.

En el tercer paso se importan los sitios de reconocimiento de recombinasas, como por ejemplo, los sitios FRT de reconocimiento para las recombinasa FLP (Senecoff *et al.*, The Journal of Biological Chemistry 261(16), 7380-7386. 1986), para posibilitar un corte de los marcadores de selección empleados (vector pSUN20 conforme a la invención).

Son, por tanto, objeto de la presente invención, pequeños vectores, preferentemente en tamaños de 2 a 12, de manera especialmente preferente de 3-9, de manera muy especialmente preferente de 4-6 kb, para la transformación eficiente de sistemas vegetales conteniendo un ADNt, en el que, dado el caso, se inserta una secuencia heteróloga de nucleótidos en un multienlazador extensivo, rodeado por habituales primers de secuenciado y que está flanqueado por un borde derecho y uno izquierdo. Los vectores binarios conformes a la invención se caracterizan por una secuencia adicional (aBS, additional Border Sequence) conforme a SEQ ID NO 1. Los vectores conformes a la invención se caracterizan además porque pueden contener en el ADNt casetes de expresión para la sobreexpresión y/o represión de genes extraños. Esta secuencia aBS se encuentra en el ADNt junto al borde izquierdo y posibilita una integración más limpia del ADNt en el genoma de las plantas. En la Fig. 1 se representa, para la aclaración un fragmento de aprox. 520 nucleótidos del vector conforme a la invención. La secuencia adicional aBS comprende conforme a la invención un rango de aprox. 60 a 240 nucleótidos, preferentemente de 90 a 120 nucleótidos y de manera especialmente preferente de aprox. 120 nucleótidos. Una variante de ejecución especial en esta secuencia adicional de borde conforme a la invención se representa como SEQ ID No. 1. La secuencia adicional de borde conforme a la invención contiene además un motivo funcional de secuencia, indicado en la Fig. 1 por un marco. Dentro de este motivo de secuencia tienen lugar, a escala reforzada, eventos de recombinación entre el ADNt y el genoma de las plantas. En un variante de ejecución especialmente preferente de la presente invención, este motivo de secuencia comprende un rango de 33 nucleótidos, representado como SEQ ID NO. 2. La secuencia adicional de nucleótidos (aBS) conforme a la invención puede variar fuertemente en las regiones restantes, repercutiendo favorablemente en un elevado contenido en AT. Por equivalentes funcionales han de entenderse conforme a la invención las secuencias de nucleótidos esencialmente equivalentes. Son secuencias funcionalmente equivalentes aquellas secuencias que, a pesar de la secuencia de nucleótidos divergente, poseen aún las funciones deseadas. Los equivalentes funcionales abarcan, por tanto, las variantes naturalmente existentes de las secuencias aquí descritas, así como las secuencias de nucleótidos sintéticas, por ejemplo, obtenidas por síntesis química. Por equivalente funcional se conocen particularmente también las mutaciones naturales o sintéticas de una secuencia inicialmente aislada, que presentan además la función deseada. Las mutaciones abarcan las sustituciones, adiciones, supresiones, cambios o inserciones de uno o de varios restos de nucleótidos.

Además, la presente invención comprende, por ejemplo, también aquellas secuencias de nucleótidos, obtenidas modificando la secuencia de nucleótidos, resultante en los derivados apropiados. Una meta de una modificación de este tipo puede ser, por ejemplo, la delimitación ulterior de la secuencia o, por ejemplo, también la inserción de otras interfaces de enzimas de restricción. Otro objeto de la invención es, por tanto, un vector binario caracterizado por un multienlazador con más de 6, preferentemente 15-20, de manera especialmente preferente 16-25, sitios únicos de restricción.

Conforme a la invención, se entiende por secuencias homólogas aquellas, complementarias a las secuencias de nucleótidos conformes a la invención y que se hibridan con éstas. El término secuencias hibridantes incluye conforme a la invención las secuencias de nucleótidos sustancialmente similares del grupo del ADN o ARN, que adquieren, en condiciones estrictas conocidas, una interacción específica (enlace) con las secuencias de nucleótidos citadas anteriormente. Entre ellas se cuentan también las secuencias cortas de nucleótidos con una longitud de por ejemplo, 10 a 30, preferentemente 12 a 15 nucleótidos. Esto comprende también conforme a la invención, entre otros, los llamados primers o también sondas. El vector binario conforme a la invención contiene además un ADNt, limitado por los bordes derecho e izquierdo, pudiendo estar la secuencia adicional conforme a la invención, por ejemplo, junto al borde izquierdo. El borde derecho puede contener además un llamado segmento reforzador o "secuencia de overdrive" (overdrive sequenz) (Peralta *et al.*, The EMBO Journal 5, 1137-1142. 1986), que repercute favorablemente en la eficiencia de la transferencia del ADNt y, por tanto, en el ADN heterólogo deseado en esa macromolécula contenido. En la ejecución ejemplar del ADNt representado en la Fig. 1, hay además por ambos lados, junto a un multienlazador extenso flanqueado por los primers Uni y Revers, adicionalmente dos sitios singulares de reconocimiento para enzimas restrictivas. Estos pueden emplearse, por ejemplo, para la integración de secuencias heterólogas de nucleótidos, marcadores de selección y otros módulos, como por ejemplo, elementos para la recombinación, sistemas alternativos de selección (sistema GST-MAT, (Sugita *et al.*, The Plant Journal 22(5), 461-469. 2000) o un segundo marcador de selección, entre el multienlazador y el borde. Otros dos sitios singulares de restricción se encuentran, en los vectores conformes a la invención y derivados de estos, junto al ADNt y permiten la inserción de marcadores o genes suicidas, que permiten la comprobación de la integración en el ADN vegetal. Estos sitios pueden emplearse también para la integración de otro ADNt y permiten así la integración independiente de, por ejemplo, marcadores de selección y transgenes. Otra posibilidad consiste en la integración de genes vir, que debería posibilitar una eficiencia de transformación mejorada (Ke *et al.*, Plant Cell Reports 20, 150-156. 2001). El vector conforme a la invención se caracteriza además porque puede contener en el ADNt casetes de expresión para la sobreexpresión y/o represión de genes extraños. Otra ventaja de estos vectores es que el gen resistente bacteriano se encuentra junto al borde derecho y, por tanto, según las concepciones mecánicas sobre la transferencia de ADNt, muy alejado del ADNt transferido. Los vectores pSUN10 y pSUN20 conformes a la invención y sus derivados se caracterizan primero porque poseen, suprimiendo las secciones de secuencia no necesarias en la parte del vector sin el ADNt, sólo un tamaño de 4,6 kb. Tienen todos los elementos necesarios para la proliferación en *E. coli* (origen ColE1) y en las agrobacterias (origen pVS1) y para la transformación (bordes izquierdo y derecho modificados) en las plantas. El pequeño tamaño de los vectores conformes a la invención, la ausencia de los sitios restrictivos empleados con frecuencia fuera del ADNt, el cómodo multienlazador, el origen ColE1 y el alto número asociado de copias de los plásmidos, posibilitan una muy buena clonabilidad de otras secciones de secuencia en los vectores. Los otros dos sitios restrictivos únicos PvuII y BglII situados flanqueando el sitio de multiclonación en el ADNt, así como los dos sitios restrictivos MluI y/o NcoI (en el pSUN10 SspI) que flanquean el ADNt elevan la modularidad de los vectores. Los vectores binarios conformes a la invención se caracterizan por la combinación de pequeño tamaño del vector, la presencia de todos los elementos necesarios para el funcionamiento, la ausencia de sitios de reconocimiento de enzimas restrictivas empleadas habitualmente, como por ejemplo, NotI fuera del ADNt, la buena manipulación por el alto número de copias en *E. coli* y la estabilidad en las agrobacterias, el multienlazador muy extensivo con 18 sitios únicos de restricción, la presencia de sitios de reconocimiento para primers secuenciadores comerciales flanqueando el multienlazador, la clonación, independiente del multienlazador, del marcador de selección junto al borde izquierdo y la posición del marcador de selección bacteriano junto al borde derecho. La ausencia de sitios NotI en el vector ofrece la posibilidad de establecer un casete especial en el ADNt, que permita la clonación de ADNc y bancos genómicos a través de los adaptadores EcoRI/NotI frecuentemente empleados. La combinación de secciones de secuencia conforme a la invención y la alta modularidad asociada a ella son nuevas. Los vectores binarios conformes a la invención se caracterizan además porque el vector pSUN20 y sus derivados poseen los motivos de reconocimiento para la recombinación FRT de la recombinasa FLP del plásmido de 2 μ de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Senecoff *et al.*, The Journal of Biological Chemistry 261(16), 7380-7386. 1986) flanqueando la posición de inserción para el marcador de selección y así surge la posibilidad de eliminar por recombinación el marcador de selección de las líneas transgénicas. Poseen además un sitio único de restricción, como por ejemplo, ScaI entre el multienlazador y el borde izquierdo para la inserción de marcadores de selección, que se transfieren entonces al gen objetivo de las plantas y permiten así la selección de transgénicas plantas, que contengan también el gen objetivo.

Los vectores binarios conformes a la invención se pueden emplear también, debido a su pequeño tamaño, eficientemente para la transferencia directa de genes. Para ello entran en consideración los métodos conocidos por el experto, como por ejemplo, microinyección, electroporación, fusión de protoplastos con liposomas, tratamiento de protoplastos con fosfato cálcico, polietilenglicol u otras sustancias y métodos, que promueven una transferencia de los vectores binarios a las células vegetales. Estos procedimientos se describen, por ejemplo, en Römpp: Biotecnología y Tecnología Genética, Editorial Thieme Stuttgart, 2. Ed., 1999 en las pág. 324-330. En una variante preferente se utiliza, por ejemplo, el método biolítico, por ejemplo, para la comprobación de fusiones de genes informador promotoras por medio de la expresión transiente tras el bombardeo con partículas de oro cargadas de ADN. El vector conforme a la invención ofrece además debido a su estructura modular, numerosas posibilidades para la integración de diferentes elementos,

como por ejemplo, el gen *codA* de *E. coli*, que se codifica para una citosindeaminasa y permite una selección combinada positiva-negativa (Gallego *et al.*, Plant Molecular Biology 39, 83-93. 1999), las secuencias, que refuerzan la recombinación homóloga, por ejemplo, el sistema *cre/lox* (Sauer *et al.*, Current Opinion in Biotechnology 5, 521-527. 1994.) o el sistema recombinasa FLP (Maniatis, T., Fritsch, E. F. & Sambrook, J. Molecular cloning-A laboratory manual (Cold Springer Harbor Lab., Cold Springer Harbor, New York). 1982). Los sitios restrictivos singulares fuera del ADNt en el vector permiten la integración de, por ejemplo, un gen ARNse que actúa como gen suicida (Barnasegen; (Hanson *et al.*, The Plant Journal 19(6), 727-734. 1999.) para suprimir la transferencia de secuencias de vectores. Aparte de esto, ofrecen la posibilidad de integrar genes *vir*, que debería posibilitar una elevada eficiencia de transformación en plantas monocotiledóneas (Ke *et al.*, Plant Cell Reports 20, 150-156. 2001). Además, también ofrecen, por ejemplo, la posibilidad de integrar un segundo ADNt, para producir plantas libres de marcadores tras la cotransformación.

Es, por tanto, también objeto de la presente invención un procedimiento para la transformación eficiente de sistemas vegetales mono- y dicotiledóneos, transfiriéndose vectores especialmente pequeños, conteniendo un ADNt con un multienlazador con muchos, por ejemplo, con más de 6, preferentemente 15-20, de manera especialmente preferente 16-25 sitios únicos de restricción, en los que, dado el caso, se inserta una secuencia heteróloga de nucleótidos (inserción deseada) y que está flanqueado por un borde derecho y un borde izquierdo modificados correspondientemente al pSUN1 conforme a SEQ ID NO1, en un sistema vegetal y este vector con alta eficiencia proporciona una transferencia del ADNt flanqueado por los bordes derecho e izquierdo, en el que, dado el caso, se inserta la secuencia heteróloga de nucleótidos deseada, en el genoma de un sistema vegetal. La transformación de plantas es una rutina para un número de especies vegetales continuamente creciente, tanto los tipos mono- como también dicotiledóneos. Esta invención se relaciona también con aquellas especies vegetales, aún accesibles hoy en día para transformaciones genéticas. En principio, esta invención puede emplearse para cada método de transformación en las células vegetales apropiadas, si la transferencia de genes es ahora directa o indirecta. Un método preferente conforme a la invención lo representa la transferencia de genes mediada por agrobacterias. Se prefiere especialmente el empleo de la llamada tecnología del vector binario protegida por las patentes EP A120516 y/o US 4.940.838.

Los vectores conformes a la invención empleados en este procedimiento contienen, como elementos valiosos adicionales en el ADNt, sitios de reconocimiento para primers de secuenciado habituales (primers pUC18 uni e inversos), así como otro sitio único, por ejemplo, Sca I para la integración de los marcadores de selección junto al borde izquierdo, flanqueado, por ejemplo, por los sitios FRT de reconocimiento de la recombinasa FLP de los plásmidos 2 μ de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y que posibilita una eliminación posterior de los marcadores de selección mediante recombinación. El vector pSUN20 empleado en este procedimiento y sus derivados tienen asimismo la ventaja de que en las secuencias de vectores fuera del ADNt no hay ningún sitio de restricción habitual, como por ejemplo, NotI. Así podrían establecerse casetes en el ADNt, que permitan la clonación de ADNc flanqueado por NotI/EcoRI y bancos genómicos. Estos se denominan en lo sucesivo como genotecas. Directamente por el lado del vector del borde izquierdo hay un sitio MluI para la integración de marcadores negativos, como el gen *codA* de *E. coli*, que se codifica para una citosindeaminasa y permite una selección combinada positiva-negativa (Gallego *et al.*, Plant Molecular Biology 39, 83-93. 1999).

La presente invención comprende además un sistema vegetal transformado, células regeneradas o plantas de las mismas, su descendencia o semillas elaboradas según a un procedimiento conforme a la invención descrito anteriormente. En una variante de ejecución especial de la presente invención, este sistema vegetal transformado se caracteriza porque no debería contener ningún porcentaje de secuencia del vector citado anteriormente fuera de los bordes derecho y/o izquierdo.

Es además objeto de la presente invención el empleo del vector binario conforme a la invención para la creación de genotecas y su transformación de plantas, preferentemente mediada por agrobacterias.

Es también objeto de la presente invención una variante del vector binario, en la que el multienlazador se sustituye por una sucesión de sitios de restricción esporádicos y resulta así particularmente apropiada para la clonación de varios casetes de expresión (gene stacking).

La presente invención se caracteriza a fondo mediante los siguientes ejemplos, que no son, sin embargo, limitantes para la invención:

Métodos Generales

1. Procedimiento de Clonación

Las técnicas recombinantes de ADN y los análisis de la secuencia se efectúan conforme a Maniatis *et al.* (Maniatis, T., Fritsch, E. F. & Sambrook, J. Molecular cloning-A laboratory manual (Cold Springer Harbor Lab., Cold Springer Harbor, New York). 1982) y las enzimas utilizadas se emplean según las instrucciones. Como vector de base sirve el plásmido pPZP200 (Hajdukiewicz *et al.*, Plant Molecular Biology 25, 989-994. 1994). Los bordes derecho e izquierdo se amplificaron del plásmido pPZP200 y/o de la variedad de agrobacterias C58(pTiC58) (DZMS 5172).

ES 2 316 461 T3

2. Cepas de Bacterias

Para la transformación en *E. coli* se empleó la variedad DH5a. Para la transformación en agrobacterias por medio del método de congelación-descongelación se emplearon las cepas EHA101, EHA 105, C58C1[mp90] LBA4404 y GV3101 (Höfgen *et al.*, Nucl. Acids Res. 16(20), 9877. 1988).

3. Transformación de las Plantas

La transferencia de genes mediada por las agrobacterias de *Nicotiana tabacum* efectuada por el llamado “método de las rodajas de hojas” y de *Brassica napus* mediante la transformación de petioles (Moloney *et al.*, Plant Cell Repsitios 8, 238-242. 1989).

4. Análisis del ADN Genómico de Plantas Transgénicas

El ADN genómico del tabaco transgénico y plantas de colza se preparó del siguiente modo:

Se trituran aprox. 3-5 g de material en hojas con atmósfera de nitrógeno líquido para dar un fino polvo. Después de traspasarlo a un tubo microcentrifugador de 50 ml y de la adición de 15 ml de tampón de extracción (500 mM de cloruro sódico, 100 mM de tris-HCl f 8,0; 50 mM de EDTA, f 8,0; 1 mM de mercaptoetanol), se mezcla bien el extracto. Entonces se añade 1 ml de disolución SDS al 20%, se agita y se incuba 10 min a 65°C. Tras la adición de 5 ml 5M de acetato potásico, se mezcla el extracto y se coloca de 20 a 30 min sobre hielo. Tras la centrifugación durante 20 min a 12000 rpm, se trasfiere el exceso mediante una membrana Miracloth a un nuevo vaso de centrifugado. Tras la adición de 10 ml de isopropanol, se mezcla y se deja precipitar de 20 a 30 min a -20°C. El ADN genómico se separa por centrifugación durante 20 min a 10000 rpm y se desecha el exceso. El pellet secado se resuspende en 0,7 ml e 50xTE y se transfiere a un tubo. Entonces se extrae el ARN tras la adición de 20 μ l de RNase (10 mg/ml), incubación durante 30 min a 37°C, adición de 75 μ l de acetato sódico 3 M, mezcla y centrifugación durante 15 min a 13000 rpm. El exceso se transfiere a un nuevo tubo y se le añaden 500 μ l de isopropanol. Tras la precipitación a temperatura ambiente durante 5 min se separa el ADN genómico por centrifugación durante 15 min a 10000 rpm y se lava con 70% etanol. El pellet secado se disuelve en 200 μ l de TE a 4°C a lo largo de toda la noche y se determinan la concentración y la calidad del ADN genómico.

Alternativamente se aisló ADN genómico con el DNeasy Plant Kit de Quiagen. En un primer paso se identificaron las líneas transgénicas a través de PCR con primers específicos de los genes. La integración del ADN extraño se examinó por medio de “Southern blot” - análisis de 20 μ g de ADN conforme al sitio restrictivo apropiado. Con el “Universal genome Walker Kit” de Clontech se aislaron las transiciones entre el ADNt y el ADN vegetal se aísla y, a continuación, se secuenciaron.

5. β -Glucuronidasa - Examen de Actividad (GUS - Assay)

El gen informador β -glucurodinasa es una enzima bacteriana, accesible tanto para determinaciones cuantitativas como también histoquímicas de la actividad. Las muestras de tejido se incubaron en 1 mM de X-Gluc, 50 mM de fosfato sódico (f 7,0) y 0,1% de Tween 20 toda la noche a 37°C y entonces se evaluaron. La actividad de la glucurodinasa en las líneas transgénicas se determinó cuantitativamente tal como se describe (Jefferson, *et al.*, Plant Molec. Biol. Rep. 5, 387-405. 1987), tras la extracción de los tejidos, mediante la conversión de 4-metilumbeliferil- β -D-glucurónido.

6. Ensayo de la Luciferasa

La expresión del gen de la luciferasa se analizó con el sistema de ensayo de la luciferasa (Luciferase Assay System) (E1500) de Promega conforme a las instrucciones.

Estructura del vector Binario pSUN1 Conforme a la Invención

Tras la linealización del plásmido pPZP200 (Hajdukiewicz *et al.*, Plant Molecular Biology 25, 989-994. 1994) con ScaI, se descomponen el ADNt y las secciones de secuencia adyacentes con nucleasa Bal31. Tras el suavizado de los extremos con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa se recirculó el plásmido restante con empleo del enlazador 5'-ttccatggtcagatcdíatactcagctgagacgtcttacgcgtt-3' (paso I). Durante la recirculación se formó el plásmido pUH41. (Fig. 2) Sobre este enlazador se encuentran los sitios restrictivos únicos, en los que después se incorporan los bordes, el multienlazador y los marcadores de selección. Durante la transformación posterior de *E. coli* y selección en base a la espectinomicina (100 mg/l) sólo crecieron clones, que contenían el gen resistente aadA completo aminoglicósido-3"-adeniltransferasa.

ES 2 316 461 T3

El análisis de estas colonias dio como resultado que el clon pUH41 poseyera la supresión más extensa, ofrece una resistencia muy buena y se puede transferir bien a la variedad de agrobacterias EHA105. En este clon se insertaron los bordes. Para ello se amplificaron los bordes derecho e izquierdo por medio de Advantage Tth polimerasa (Clontech) y los primers RB5/RB3 y/o LB5/LB3 del plásmido pPZP200 (Hajdukiewicz *et al.*, Plant Molecular Biology 25, 989-994. 1994). Tras la clonación de los fragmentos PCR en el vector pUC18 se verificó la secuencia. Los primers empleados para la amplificación de los bordes derecho e izquierdo se especifican a continuación:

Primer RB5: 5'- gagctdíaatctgattgtcgtttcccgccttc-3';

Primer RB3: 5'-cctgtggtgcatggacatacaaatggacg-3',

Temperatura de alineamiento (Ta) = 56°C

Primer LB5: 5'- ctgatgggctgcctgtaacgcgtggtgattttg-3';

Primer LB3: 5'-cattaaagacgctccgaatggttattaagttg-3',

Temperatura de alineamiento Ta = 50°C

El borde derecho se clonó sobre NcoI/BglII en el multienlazador del vector pUH41 (Fig. 2, paso II). En el plásmido pDE44RB resultante se insertó el borde izquierdo tras una descomposición AatII/MluI (paso III). En el sitio PvuII del plásmido pUH45 producido se incorporó el casete 35S promotor-fosfinotricinacetiltransferasa-35SpA, para comprobar la integración y la regeneración en una siguiente transformación del tabaco (pUH56, Fig. 2, paso VI).

Para poder emplear numerosos sitios restrictivos únicos en el multienlazador, se clonó el enlazador 5'-gtacctcgcccggcgatccgacacdiat-3' en el vector pUC19 cortado con XbaI y Asp718. El multienlazador, que contiene los sitios EcoRI SacI KpnI XhoI SrfI SmaI EcoRV BamHI SpeI XbaI Sall HincII PstI Sha de Sfi HindIII, se amplificó a través de los primers universales e inversos M13 y se ligó en el sitio Scal del pUH45 (paso IV).

Conforme a las dos orientaciones posibles del multienlazador se originan además los plásmidos pUH52 (Fig. 2) y pUH53 (no representado). Para el aislamiento de la secuencia adicional (additional left border sequence) se efectuó una amplificación PCR por medio de los siguientes primers

SLB5: 5'- gcggacgtctttaatgtactgaattaacatccg - 3'

SLB3: 5'- cacagctgcttgtaataattgcatdíaattg - 3'

en el ADN del plásmido aislado del plásmido DZMZ - pTi de la variedad *Agrobacterium tumefaciens* C58 (DSM n°: 5172) a una Ta de 55°C. El producto PCR se clonó en el plásmido pUC18SmaI. El clon pUH46 tenía, según el análisis de secuencias, la secuencia correcta. En los plásmidos UH52 y UH53 se incorporó, tras una división PvuII/AatII, el fragmento PvuII/AatII del plásmido UH46 y, por tanto, la secuencia adicional de borde conforme a la invención, obteniéndose los vectores pSUN1 (Fig. 2, paso V) y pUH58 (no representado).

Transformación del Plásmido pUH56 en el Tabaco

Para comprobar si la modificación de los bordes influye sobre la formación de callos y en la regeneración en sí, se transformaron los plásmidos pUH56 (Fig. 2), con un casete 35S-fosfinotricinacetiltransferasa en el plásmido UH45 (Fig. 2), y para el control pPZP200::35SPat (corresponde al vector pUH 39) en la variedad de agrobacterias EHA 105. La transformación de *Nicotiana tabacum* se efectuó con el método de las rodajas de hojas. En la Fig. 3 pueden verse los rebrotes regenerados 3 y 6 semanas tras la transformación en comparación con el control (pUH39). La regeneración se desarrolló sin diferencias verificables entre los regenerados. La modificación de los bordes no tuvo, por tanto, ningún efecto negativo sobre la regeneración.

Comprobación de la Eficiencia de Transformación y de la Inserción Correcta del ADNt

La expresión de los genes informadores glucurodinasa y luciferasa se empleó para, por un lado, determinar la eficiencia de los nuevos vectores durante la transferencia de un transgen (glucurodinasa, GUS) y, por otro, comprobar, mediante la incorporación junto al borde izquierdo, por el lado del vector, del ADNt (luciferasa, Luc), que ninguna secuencia de vectores se haya transferido conjuntamente. Los pasos de clonación necesarios para la incorporación de los casetes 35S promotor/glucurodinasa y 35S promotor/luciferasa se reproducen en la Fig. 4. pUH52 y pSUN1 se linearizaron con MluI, se suavizaron, se desfosforilaron y se ligaron (paso I) con el fragmento HindIII suavizado del vector pRT101Luc (Maas *et al.*, Plant moles. Biol. 16, 199-207. 1991). En el sitio SrfI de los plásmidos pUH62 y, correspondientemente, pUH61 resultantes, se clonó entonces el fragmento EcoRI/HindI suavizado del plásmido pGUSINT37, produciéndose los plásmidos pUH64 y, correspondientemente, pUH63 (paso II). En estas estructuras se integraron en el sitio PvuII, como marcadores de selección, los casetes nosP/Pat/nosT (HindIII, suavizados) y/o die nosP/NPTII/nosT (HindIII/BamHI, suavizados) (paso III). Los clones pUH68 y pUH67 y/o pUH76 y pUH77 resultan-

tes de esto se transformaron en las cepas de agrobacterias EHA101 y/o GV3101 y entonces en tabaco, *Arabidopsis* y/o *Brassica napus*. Las plantas transformadas se pusieron en el invernadero, formando raíces el 70 - 90% de los rebrotes. Las plantas seleccionadas eran hasta un 80-100% transgénicas para los marcadores de selección. Las actividades de glucurodinasa y luciferasa se determinaron como antes. El 70-90% de las plantas mostró actividad GUS y el PCR genómico probó la integración del gen GUS en el 90-100% de las plantas analizadas. Por tanto, la correlación entre las plantas resistentes y las plantas exprimidoras de glucurodinasa es muy alto, lo que significa que el ADNt se ha transferido completamente. Esto se logró clonando los marcadores de selección junto al borde izquierdo. Como la transferencia del ADNt comienza junto al borde derecho, se transfiere en primer lugar el gen informador y después el gen del marcador de selección (Becker *et al.*, Plant moles. Biol. 20, 1195-1197. 1992). Esto se confirma también mediante análisis del PCR genómico y análisis Southern. Una eventual actividad de la luciferasa en las plantas transgénicas significa que al menos esta parte del vector está integrada en el genoma. Durante el análisis de las plantas transgénicas de tabaco transformadas con los vectores pUH67 y pUH68 conformes a la invención no se detectó ninguna actividad de la luciferasa. Evidentemente, aprox. un 30% de las plantas de colza analizadas mostraron actividad de la luciferasa. Los análisis genómicos confirmaron que el 30-50% de las plantas transgénicas pueden contener también secuencias de vectores. Esto coincide con los datos bibliográficos (Martineau *et al.*, The Plant Cell 6, 1032-1033. 1994, Ramanathan *et al.*, Plant moles. Biol. 28, 1149-1154. 1995, Kononov *et al.*, The Plant Journal 11, 945-957. 1997).

Estructura del Vector Binario pSUN10 Conforme a la Invención

En el paso de clonación I (Fig. 5) se amplificó a través de PCR un fragmento del origen pVS1 del plásmido pSUN1. Los primers PVS5a 5'-cgagcgcgcgtctctaaaaggt-3' y PVS5b 5'-caggggcccttgcacgattaccgggg-3' empleados corresponden a las posiciones 1093-1105 y 2390-2371 sobre el plásmido pSUN1. Este fragmento PCR dividido con MluI/BSP120I se clonó en vez del fragmento de 1878 bp borrado en el plásmido pSUN1, dividido primero con MluI y parcialmente con NotI. El plásmido origina además pSundel. La secuencia de overdrive del plásmido octopin pTiA6 (Toro *et al.*, Porc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 8558-8562. 1985) se clonó con ayuda del oligo ov RB 5'-catg ataagtcgcgctgatgtgttttgaatatt3' y ovSsp 5'-catgaatattcaaacacacacacacagcgcgacttat-3' en el sitio NcoI, que se eliminó de este modo (paso II). Como nuevo sitio restrictivo único junto al borde derecho en el producido pSYelov plásmido se encuentra disponible el sitio SspI, para introducir en esta posición otro bacteriano marcador de selección, ADNt's u otros módulos. En el paso de clonación III se borraron dividiendo con NotI y parcialmente con NdeI, suavizando los extremos y recirculando el plásmido, otros 336 bp y el sitio nic, el origen para conjugaciones con otras bacterias. Por tanto, estos vectores y sus derivados no pueden difundirse ya a través de conjugación, que aumente considerablemente la seguridad biológica. Se produjo además el plásmido pSUN10 que se distingue del plásmido pSUN1 por la supresión de dos secciones de secuencia incluyendo el sitio nic y el overdrive integrado del plásmido Ti pTiA6. Además, no se modificó el ADNt.

Estructura del Vector Binario pSUN20 Conforme a la Invención

Una meta de esta clonación era tener la posibilidad de eliminar de nuevo los marcadores de selección de las líneas transgénicas. Como ejemplo se empleó aquí el sistema recombinasa FLP/FRT de la levadura. (Senecoff *et al.*, The Journal of Biological Chemistry 261 (16), 7380-7386. 1986). Para ello tuvieron que sintetizarse y clonarse los sitios FRT de reconocimiento con ayuda de los oligos. Para ello se generó en primer lugar un sitio de reconocimiento con ayuda de los oligos 5'-gaagtctctatacttcttctgagaadíaagaacttcggaadíaagaacttcgctgcagctac-3', 5'-cagtcgacgaagtctctatcc gaagtctctatctcaagaagadíaagaacttcgctac-3' y se clonó en el sitio KpnI del plásmido pOCS1. En el sitio SalI flanqueando el primer sitio FRT de reconocimiento se clonó entonces el segundo sitio de reconocimiento, obtenido asimismo a partir de los oligos, a través de los extremos XhoI. Los oligos tienen las siguientes secuencias: FRTII-1 5'-tcgagtact gaagtctctatcttctgagaadíaagaacttcggaadía-3' y FRTII-2 5'-tcgagtgaagtctctatccgaagtctctatctcaagaagadíaaga-3'. Se obtuvo además el plásmido pFRTII, cuya secuencia se verificó. Los sitios de reconocimiento fusionados se cortaron entonces como fragmento SmaI/Ecl136II y se clonaron en el sitio PvuII del pSUN10 (Fig. 6).

El plásmido pSUN20 producido de este modo se distingue, por tanto, del pSUN10 sólo por la secuencia adicional de los sitios FRT de reconocimiento del plásmido pSUN10. El sitio ScaI situado entre los sitios FRT de reconocimiento se emplea para la clonación del marcador de selección.

Comprobación de la Proliferación Estable en Agrobacterium Tumefaciens

Como se han borrado partes de la sección de secuencia pVS1, debería demostrarse aquí que esto no afecta a la proliferación ni a la estabilidad del plásmido binario conforme a la invención en las agrobacterias. El vector conforme a la invención pSUN10 se transformó por congelación-descongelación en las cepas de agrobacterias EHA101, EHA 105, C58C1[mp90] LBA4404 y GV3101. Las colonias crecieron normalmente tras aprox. 2 días. De las colonias del EHA 101/pSUN10 se seleccionaron 3, se pusieron en 5 ml de medio YEB con 50 mg/l de canamicina y 100 mg/l y se aisló el ADN del plásmido. Tras la división y verificación se extrajeron de estos cultivos, en cada caso, 100 µl, para inocularles 100 ml de medio YEB. Por muestra se proporciona, en cada caso, un matraz con canamicina/espectinomicina y otro con canamicina. En el primer matraz sólo podían crecer, debido a la resistencia a la espectinomicina, agrobacterias que contengan el plásmido binario; en el segundo matraz podían crecer también células EHA 101, que hubieran perdido el plásmido. Tras un cultivo a lo largo de toda la noche se sembraron las agrobacterias en placas de Petri con medio YEB, según sus resistencias, en diferentes diluciones. Se contabilizaron las placas de Petri con las diluciones de 10⁻⁸ y 10⁻⁹. Este procedimiento se repitió otras 5 veces, de forma que se analizaron 6 generaciones. De la última generación se aisló ADN de plásmido de todas las muestras, cuya calidad y cantidad no se distingue. En la Fig. 8 se reúnen los datos

ES 2 316 461 T3

en un diagrama. La altura de las barras indica las colonias contabilizadas y no podía identificarse ninguna diferencia significativa entre aquellas en condiciones no selectivas para el plásmido binario pSUN10 y aquellas en condiciones selectivas.

5

Estructura del pSUN20Test

Conforme a la Fig. 7, se elaboró una estructura para el examen del nuevo vector pSUN20 conforme a la invención. En el sitio SmaI del vector pSUN20 se clonó el fragmento SpeI/AatII del plásmido UH77, con un gen GUS conteniendo intrón bajo el control del promotor 35S y el gen NPTII bajo el control del NosP (paso I). En el sitio ScaI del plásmido pSUN20GUS resultante entre los sitios de reconocimiento de la FLP recombinasa se clonaron los marcadores de selección fosfinotricinacetiltransferasa bajo el control del nosP (paso II). El plásmido resultante se transformó en tabaco. Las plantas transformadas se colocaron en el invernadero y se determinó la actividad de la glucurodinasa como antes. La correlación entre las plantas resistentes a la fosfinotricina y NPTII y las exprimidoras de glucurodinasa fue muy alta, de forma que el ADNt se transfiriera completamente. Esto se confirma también mediante análisis del PCR genómico y análisis Southern. La descendencia se cruzó con plantas exprimidoras de recombinasa y se analizó la expresión GUS en las plantas no más resistentes a la fosfinotricina. Podía demostrarse que estas plantas contenían el gen objetivo y la escisión del marcador de selección resultó exitosa.

20

Descripción de las figuras

Fig. 1: detalle secuencial del vector conforme a la invención pSUN1 conteniendo la secuencia adicional aBS conforme a la invención.

25

Las abreviaturas empleadas tienen aquí el siguiente significado:

RB-3; RB-5: primers para la amplificación del borde derecho

30

LB-3; LB-5: primers para la amplificación del borde izquierdo

aBS-3; aBS-5: primers para la amplificación de la secuencia adicional conforme a la invención; additional Border Sequence (aBS)

35

Rev: primer inverso de secuenciado

Uni: primer universal de secuenciado

IR: repetición invertida

40

↓: sitios de transferencia de ADNt al genoma de las plantas transgénicas

Fig. 2: representación esquemática de la estructura del vector binario pSUN1.

45

Las abreviaturas empleadas tienen aquí el siguiente significado:

AadA: espectinomicina/estreptomicina-resistencia

RB: borde derecho

50

aBS: secuencia adicional de nucleótidos; additional Border Sequence

sta: proteína divisora

55

rep: pVS1 proteína replicante

pVS1: inicio de la replicación con un amplio espectro huésped del plásmido pVS1

ori: inicio de la replicación ColE1

60

Se señalan además sitios singulares de reconocimiento de enzimas restrictivas.

Fig. 3: Comparación de la regeneración de tabaco transformado con los vectores pUH56 y pUH39 (control) después de 3 y/o 6 semanas.

65

ES 2 316 461 T3

Fig. 4: representación esquemática de la estructura de los vectores binarios pUH68 y pUH67. Las abreviaturas empleadas tienen aquí el siguiente significado:

- 5 AadA: espectinomicina/estreptomicina-resistencia
RB: borde derecho
LB: borde izquierdo
10 aBS: conforme a la invención adicionales (additional) secuencia de borde
35S: promotor del ARN 35S del virus mosaico de la coliflor
pA35S: terminador del ARN 35S del virus mosaico de la coliflor
15 nosP: promotor del gen de la nopalina sintasa de la *agrobacteria tumefaciens*
nosT: terminador de la transcripción del gen de la nopalina sintasa de la *agrobacteria tumefaciens*
GUS: gen informador, codificador para la b-glucuronidasa de *E. coli*
20 Luc: gen informador, codificador para la luciferasa de Firefly
Pat: gen de la fosfotricinacetiltransferasa, sintético
rep: pVS1 proteína replicante
25 pVS1: inicio de la replicación con un amplio espectro huésped del plásmido pVS1
ori: inicio de la replicación ColE1
30 Se señalan además sitios singulares de reconocimiento de enzimas restrictivas.

Fig. 5: representación esquemática de la estructura del vector binario pSUN10.

- 35 Las abreviaturas empleadas tienen aquí el siguiente significado:
aadA: espectinomicina/estreptomicina-resistencia
RB: borde derecho
40 LB: borde izquierdo
MCS: sitio de multiclonación
pVS1: inicio de la replicación con un amplio espectro huésped del plásmido pVS1
45 ori: inicio de la replicación ColE1.

Fig. 6. representación esquemática de la estructura del vector binario pSUN20.

- 50 Las abreviaturas empleadas tienen aquí el siguiente significado:
aadA: espectinomicina/estreptomicina-resistencia
55 RB: borde derecho
LB: borde izquierdo
MCS: sitio de multiclonación
60 pVS1: inicio de la replicación con un amplio espectro huésped del plásmido pVS1
ori: inicio de la replicación ColE1
frt: inicio de la replicación para la FLP recombinasa de la levadura
65 Se señalan además sitios singulares de reconocimiento de enzimas restrictivas.

ES 2 316 461 T3

Fig. 7: representación esquemática de la estructura del vector binario pSUN20Test

AadA: espectinomicina/estreptomycin-resistencia

5 RB: borde derecho

LB: borde izquierdo

aBS: conforme a la invención adicionales (additional) secuencia de borde

10 35S: promotor del ARN 35S del virus mosaico de la coliflor

pA35S: terminador del ARN 35S del virus mosaico de la coliflor

15 nosP: promotor del gen de la nopalina sintasa de la *agrobacteria tumefaciens*

nosT: terminador de la transcripción del gen de la nopalina sintasa de la *agrobacteria tumefaciens*

GUS: gen informador, codificador para la b-glucuronidasa de *E. coli*

20 NptII gen de la neomicinofosforiltransferasa,

Pat: gen de la fosfotricinacetiltransferasa, sintético

rep: pVS1 proteína replicante

25 pVS1: inicio de la replicación con un amplio espectro huésped del plásmido pVS1

ori: inicio de la replicación ColE1

frt. inicio de la replicación para la FLP recombinasa de la levadura

30 Se señalan además sitios singulares de reconocimiento de enzimas restrictivas.

Fig. 8: representación de la estabilidad de las agrobacterias.

35 YEB: Medio

K: seleccionado en base a la canamicina

40 K+S: seleccionado en base a la canamicina y espectinomicina.

45

50

55

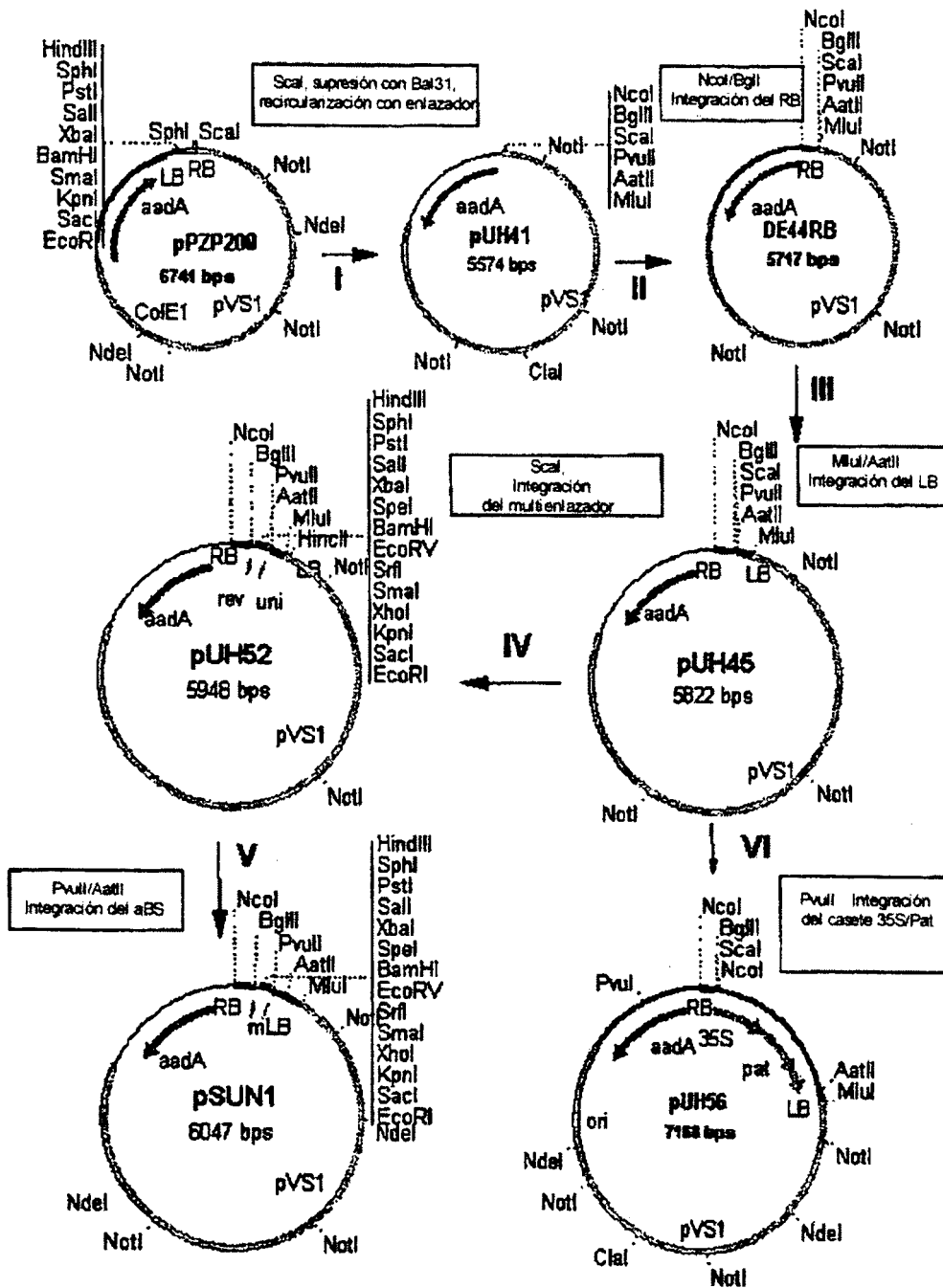
60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Vector binario para la transformación eficiente de sistemas vegetales, conteniendo un ADN de transferencia (ADNt), en el que se inserta una secuencia heteróloga de nucleótidos y que está flanqueado por un borde derecho y uno izquierdo, presentando el vector junto al borde izquierdo la secuencia adicional conforme a SEQ ID NO 1, y un multienlazador con más de 6 sitios únicos de restricción entre los bordes.
- 10 2. Vector binario conforme a la Reivindicación 1 **caracterizado** porque el vector tiene un tamaño de 2 a 12, preferentemente de 3-9, de manera especialmente preferente de 4-6 kb.
3. Vector binario según al menos una de las Reivindicaciones 1-2 **caracterizado** por un multienlazador con 15-20, de manera especialmente preferente 16-25 sitios únicos de restricción.
- 15 4. Vector binario según al menos una de las Reivindicaciones 1-3 **caracterizado** por la presencia de sitios de reconocimiento para primers de secuenciado pUC18 uni y primers inversos flanqueando el multienlazador.
5. Vector binario según al menos una de las Reivindicaciones 1-4 **caracterizado** por la clonación del marcador de selección, independiente del multienlazador, junto al borde izquierdo.
- 20 6. Vector binario según al menos una de las Reivindicaciones 1-5 **caracterizado** por la posición del marcador de selección bacteriano junto al borde derecho.
7. Vector binario según al menos una de las Reivindicaciones 1-6 **caracterizado** por una bioseguridad elevada eliminando una región que contiene el sitio *nic*.
- 25 8. Vector binario conforme a la Reivindicación 1-7 **caracterizado** por comprender los motivos de reconocimiento de recombinasas flanqueando la posición de inserción para el marcador de selección.
- 30 9. Vector binario para la transformación eficiente de sistemas vegetales, conteniendo un ADNt, en el que se inserta una secuencia heteróloga de nucleótidos y que está flanqueado por un borde derecho y uno izquierdo, comprendiendo el vector junto al borde izquierdo una secuencia adicional conteniendo un motivo de secuencia conforme a SEQ ID NO 2 o un motivo de secuencia con homólogos de al menos un 80%, preferentemente un 90% de SEQ ID NO 2 y, entre los bordes, un multienlazador con más de 6 sitios únicos de restricción.
- 35 10. Procedimiento para la generación de un vector binario conforme a una de las Reivindicaciones 1-9 **caracterizado** porque
- 40 a. tras la supresión del ADNt y de las secciones adyacentes de un vector de la familia pPZP, se incorporan otros fragmentos PCR conteniendo los bordes, un sitio de multiclonación y un sitio único para la clonación de los marcadores de selección;
- b. mediante 2 supresiones diferentes se eliminan todos los sitios *NotI* y otras regiones del vector en parte no funcionales.
- 45 11. Procedimiento acorde a la Reivindicación 10 **caracterizado** porque tras el paso (b) se introducen los sitios de reconocimiento de recombinasas.
- 50 12. Procedimiento acorde a las Reivindicaciones 10 u 11 **caracterizado** porque el marcador de resistencia bacteriano se incorpora en el primer paso (a) junto al borde derecho.
13. Empleo de un vector binario conforme a una de las Reivindicaciones 1-9 para la transformación eficiente de sistemas vegetales.
- 55 14. Empleo de un vector binario conforme a una de las Reivindicaciones 1-9 para la generación de sistemas vegetales transformados, células regeneradas o plantas de las mismas, su descendencia o semillas.
15. Empleo de un vector binario conforme a una de las Reivindicaciones 1-9 para la creación de genotecas.
- 60 16. Empleo de un vector binario conforme a una de las Reivindicaciones 1-9 para la transformación de plantas, preferentemente mediada por agrobacterias.

Fig.2



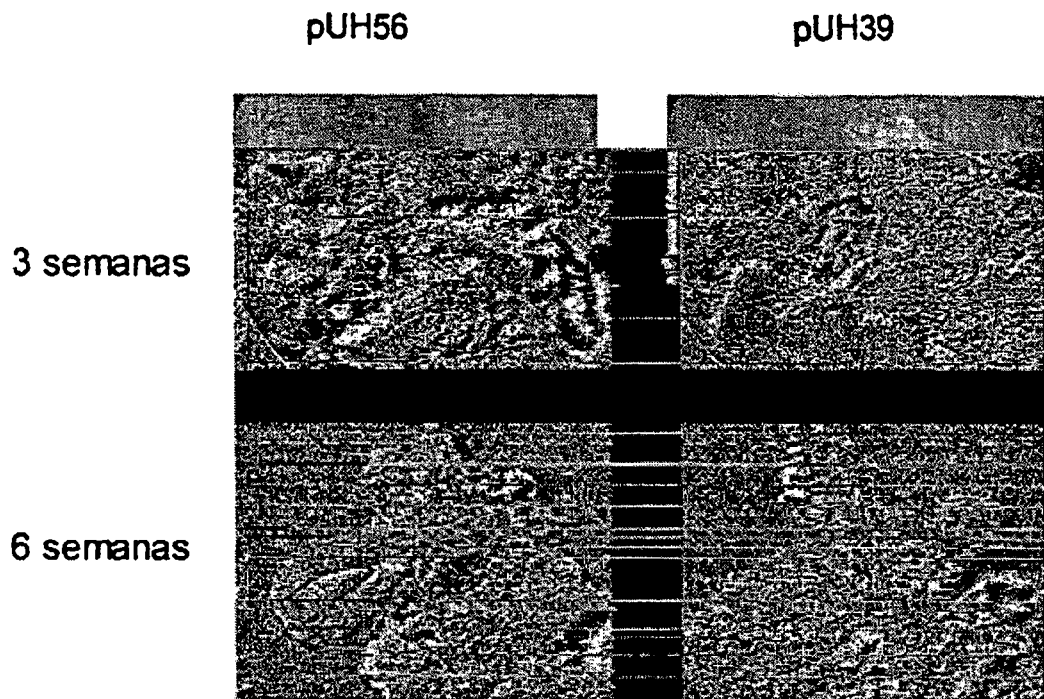


Fig. 3

Fig.4

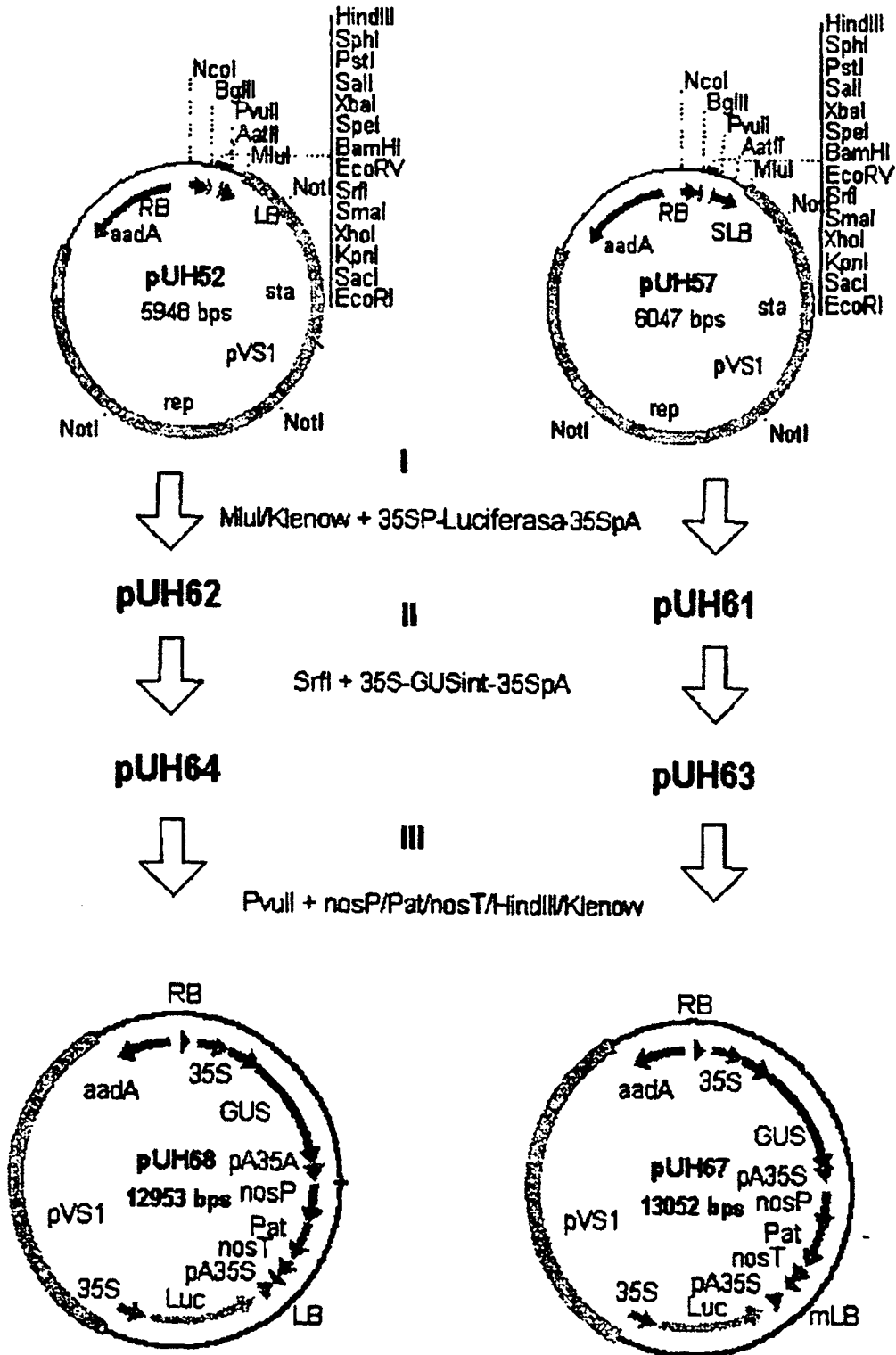
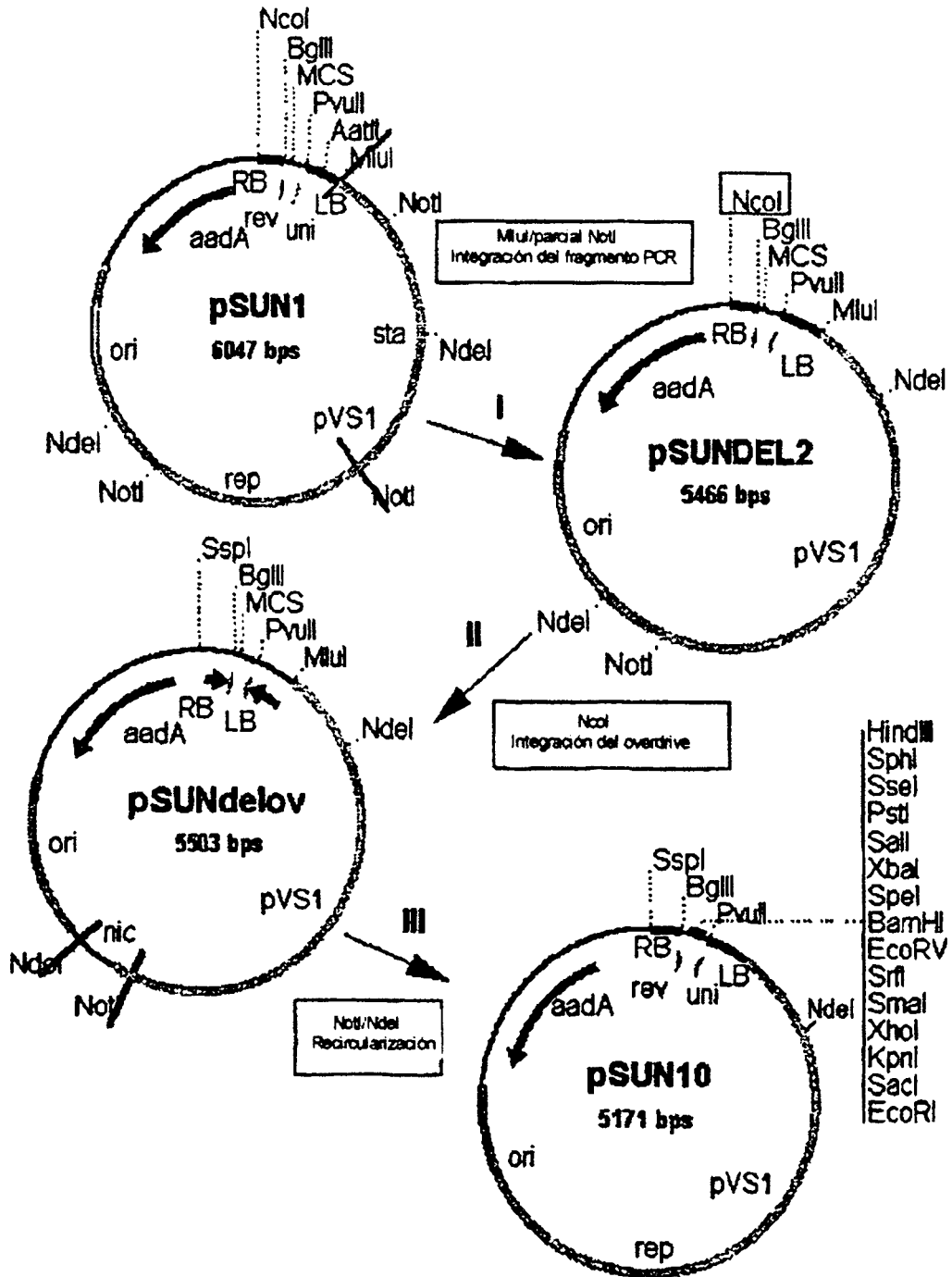


Fig.5



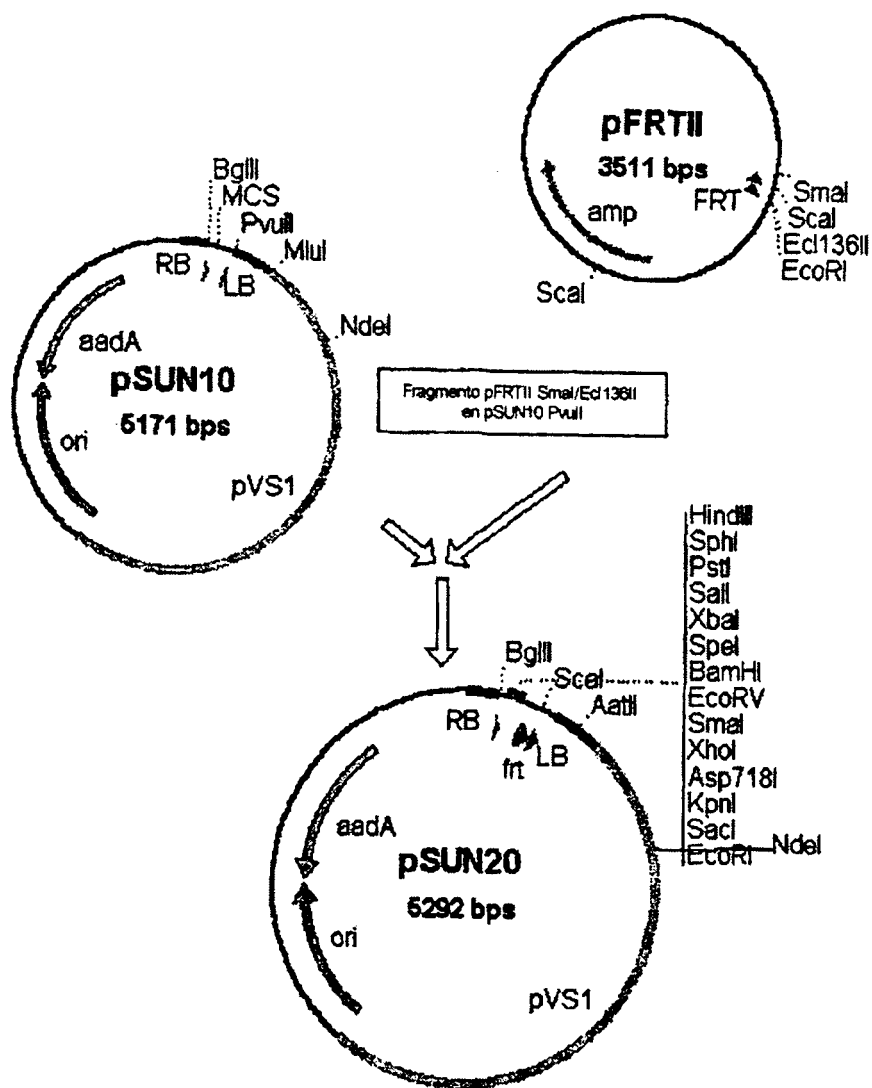


Fig. 6

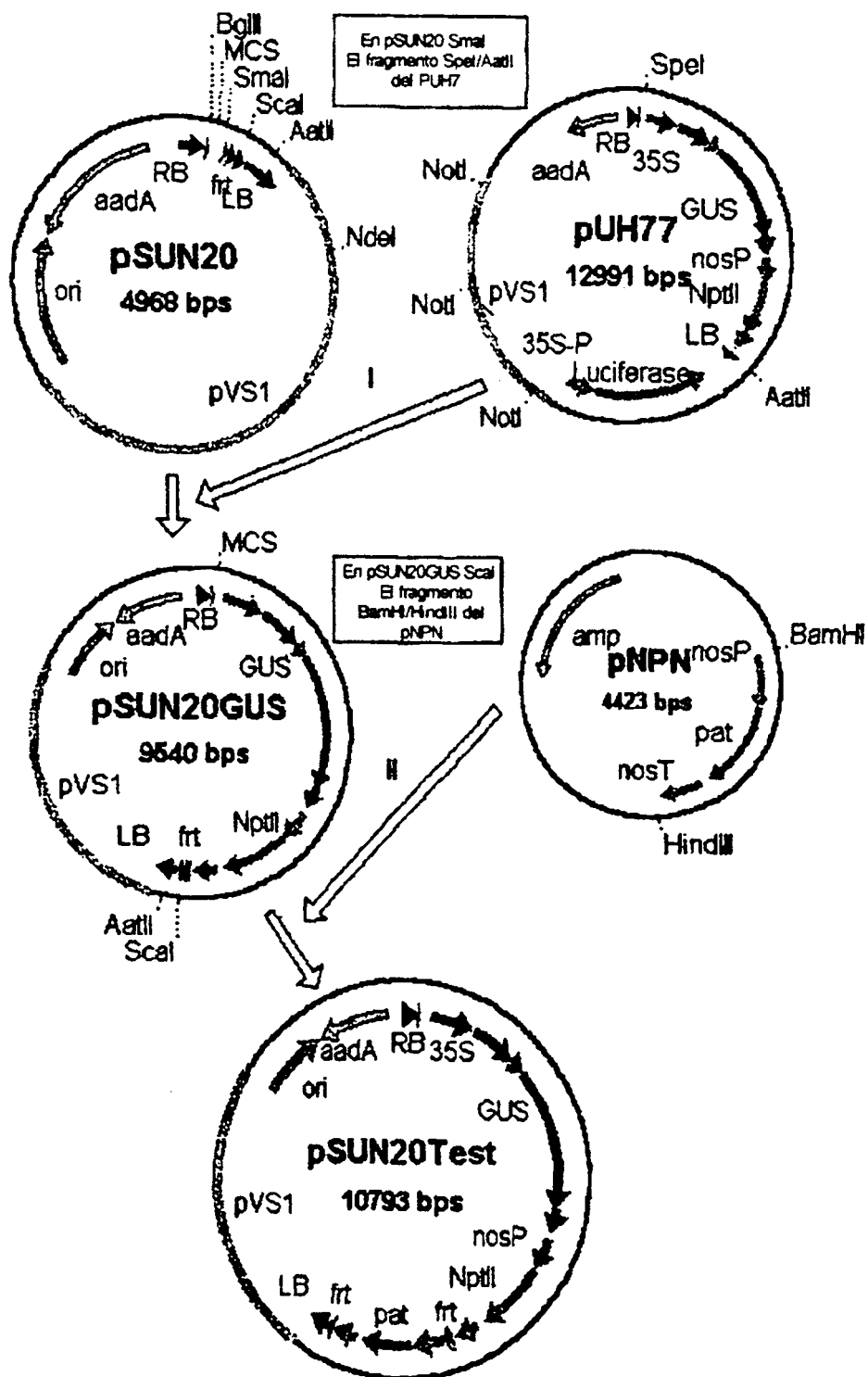


Fig. 7

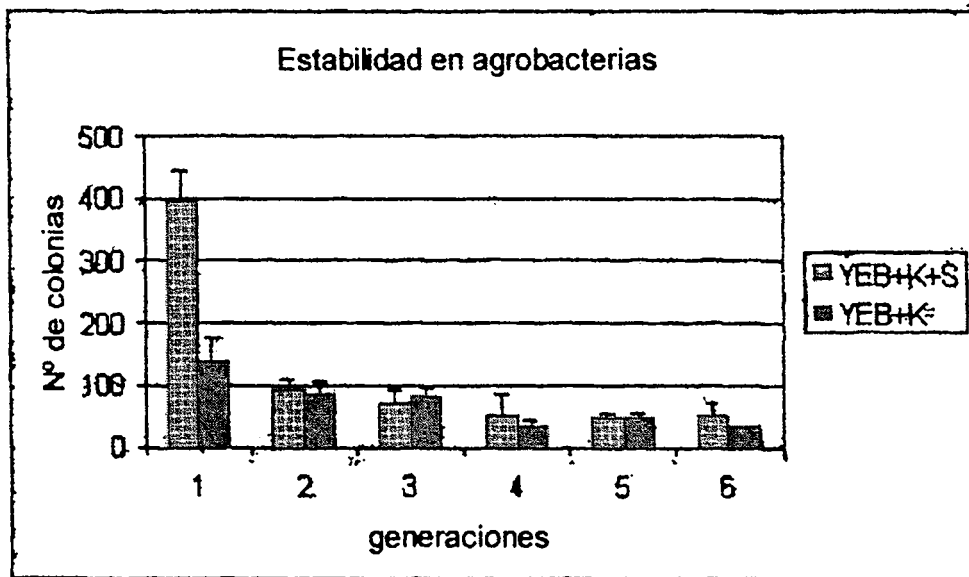


Fig. 8

