



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 302 359**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/82** (2006.01)  
**C12N 5/04** (2006.01)  
**A01H 5/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **98947760 .9**  
86 Fecha de presentación : **08.10.1998**  
87 Número de publicación de la solicitud: **1021552**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **26.07.2000**

54 Título: ***Lemnaceae* transgénicas.**

30 Prioridad: **10.10.1997 WO PCT/IL97/00328**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.07.2008**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.07.2008**

73 Titular/es:  
**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT Co., Ltd.**  
**The Weizmann Institute of Science, P.O. Box 95**  
**Rehovot 76100, IL**

72 Inventor/es: **Edelman, Meir;**  
**Perl, Avihai;**  
**Flaishman, Moshe y**  
**Blumenthal, Amnon**

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 302 359 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

*Lemnaceae* transgénicas.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a plantas transformadas establemente, la progenie de las mismas y productos obtenidos de las células o progenie. La invención además concierne a métodos para la transformación genética de plantas y más específicamente a un método en donde se usa *Agrobacterium* como el vector de transformación.

10 **Técnica anterior**

La técnica anterior considerada pertinente para la siguiente divulgación aparece en una lista en la sección titulada “Referencias” antes de las reivindicaciones.

15 **Antecedentes de la invención**

La transformación genética de plantas está empezando gradualmente a jugar un papel importante en la agricultura moderna. Se han hecho intentos para introducir ADN heterólogo en plantas para aumentar su resistencia a infecciones víricas, adquirir o aumentar la resistencia a varios herbicidas, modular los tiempo de maduración o decaimiento, aumentar el valor nutricional de varios productos de las plantas, hacer que produzcan productos farmacéuticos, y producir varias otras moléculas químicas y biológicas.

La producción comercial de compuestos transgénicos en sistemas de bacterias, levaduras y células de mamíferos con frecuencia está dificultada por los altos costes de capital de inversión en equipos de fermentación y la necesidad de eliminar priones o componentes de microplasmias de los productos purificados. Recientemente, se ha conseguido la producción de proteínas y péptidos heterólogos (por ejemplo,  $\alpha$ -amilasa, anticuerpos, encefalinas, seroalbúmina humana) en plantas (Pen *et al.*, 1992, Miele, 1997). Las ventajas potenciales de los sistemas de plantas transgénicas son: costes de producción de biomasa reducidos y una reducción del riesgo biológico de contaminantes en el procesamiento posterior de los productos. Las plantas transgénicas pueden de esta manera ser biorreactores superiores para enzimas en masa en la industria, productos purificados en medicina y productos farmacéuticos oralmente activos.

Para transformar plantas para producir un producto deseado, el gen relevante, una vez identificado y clonado, se tiene que introducir en la planta de interés de modo que la planta resultante sea capaz de pasar el gen a su progenie. Los métodos de introducción propuestos para este propósito incluyen electroporación, microinyección, bombardeo con microproyectiles, fusión de liposomas, transferencia mediada por *Agrobacterium*, y muchas otras.

Uno de los vectores de transformación más comúnmente usado es *Agrobacterium*, que un género de bacteria patógena de plantas de la familia *Rhizobiaceae*, que no fija el nitrógeno libre y normalmente produce agallas y raíces pilosas en células infectadas. El ADN heterólogo se introduce en *Agrobacterium* y a través de un proceso de transfección en donde el material genético de *Agrobacterium* entra en la célula de la planta, tiene lugar la transformación de la planta (Armitage *et al.*, 1992). *Agrobacterium* infecta principalmente plantas dicotiledóneas e infecta plantas monocotiledóneas solo con un rendimiento muy bajo (Armitage *et al.*, 1992).

Un intento de transformar plantas monocotiledóneas fue mediante bombardeo de partículas en donde el ADN heterólogo se distribuye mediante aire o mediante helio en la planta o célula vegetal que se va a transformar. Esta técnica tiene dos desventajas principales: primero, es bastante difícil dirigir las partículas de ADN a la zona meristemática en donde, para ciertas plantas tales como las de la familia *Lemnaceae*, debería tener lugar la transformación para permitir la regeneración a partir de allí de una planta completa transformada; segundo, incluso si la partícula de ADN entra en la zona meristemática y alcanza el núcleo de la misma, el ADN normalmente no se integra en el cromosoma de la célula y, de esta manera después de unos pocos ciclos celulares el ADN heterólogo no integrado se pierde, de modo que la transformación por bombardeo de partículas es normalmente simplemente transitoria.

Hubiera sido muy deseable proporcionar un método para la transformación genética de plantas monocotiledóneas que produjera transformación estable con un rendimiento satisfactorio.

Una de las monocotiledóneas comercialmente más prometedoras son las *Lemnaceae*, una familia acuática ampliamente distribuida de plantas pequeñas (1-5 mm). Las *Lemnaceae* sobresalen en dos características potencialmente explotables por la industria de la biotecnología: su extraordinaria velocidad de crecimiento vegetativo y una tolerancia alta para un espectro de nutrientes y sustancias tóxicas (Landolt y Kandeler, 1987). En los EE.UU., la comercialización de *Lemnaceae* se ha centrado alrededor y la gerencia de aguas residuales y los piensos animales (Culley *et al.*, 1981; Ngo, 1987). Sin embargo, el uso de acuaculturas y tecnología convencional mezcladas ha tenido solo un éxito moderado. En Israel se tomó una aproximación diferente, utilizando la cepa *Lemna gibba* Hurfeish (Porath *et al.*, 1979). Con su raíz especialmente corta y alto contenido en proteína, carotenoide y hierro, esta cepa se cultivó en condiciones modernas de invernadero (4 toneladas por acre por semana recogidas; Tzora Biotechnology Inc., Kibbutz Tzora), y se comercializó como producto vegetal empaquetado para la industria alimentaria. A pesar de las velocidades de crecimiento sumamente elevadas y el futuro prometedor de *Lemnaceae* como una potencial fuente de alimentos,

varios intentos de transformar genéticamente estas plantas, mediante un método de transformación estable se han demostrado, hasta la fecha, bastante infructuosos. El fracaso en la transformación era debido al hecho de que *Lemnaceae* se multiplican vegetativamente, surgiendo las frondas hijas de las zonas meristemáticas profundas dentro de la fronda madre. De esta manera, se debe alcanzar el meristemo inicial para que se produzca la transformación estable. Los inventores de la solicitud encontraron que el bombardeo con partículas de *Lemnaceae*, el método actual en el estado de la técnica usado por varios grupos para obtener sucesos de transformación localizados, transitorios, era ineficaz en la transformación de frondas hijas.

Sería muy deseable obtener plantas de *Lemnaceae* que están transformadas establemente con ADN heterólogo de interés y usar tales plantas transformadas para la producción de productos químicos y biológicos.

### Descripción general de la invención

En la siguiente descripción, el término “transformación” se usará para indicar la introducción de un ADN transformante en células o tejido vegetales que lleva a la aparición en estas células o tejidos de caracteres que dichas células o tejidos no poseían anteriormente o a la modulación de caracteres presentes, *a priori*, en las plantas. El término “transformación estable” se usará para indicar una transformación genética tal que es heredable a generaciones futuras de la planta transformada. El término “ADN transformante” se usará aquí para indicar la molécula de ADN exógeno que se introduce en las células vegetales y produce su transformación. El ADN transformante puede ser de cualquier origen, por ejemplo de origen vegetal, y también puede ser una secuencia de ADN que está presente de forma natural en la planta transformada. El ADN transformante puede comprender regiones codificantes y/o secuencias de control capaces de regular la cantidad y el tiempo de la transcripción. El término “planta transformada establemente” se usará de aquí en adelante para indicar una planta que comprende un ADN transformante integrado de forma estable en su genoma. Una “*Lemnaceae transformada establemente*” se ajusta a la descripción de una planta transformada establemente.

Según la presente invención se encontró de manera sorprendente que existen condiciones que permiten la transformación estable de plantas *Lemnaceae*. De esta manera, mediante uno de sus aspectos, la presente invención concierne a una planta *Lemnaceae* transformada establemente, tejidos, productos de la misma y progenie de la misma.

Las plantas *Lemnaceae* son preferiblemente de los géneros: *Spirodela*, *Lemna* y *Wolffia*. La presente invención concierne preferiblemente a cepas de *Lemnaceae* transformadas capaces de una eficacia de transformación extremadamente alta, siendo un ejemplo de tales cepas la cepa 8717 de *Spirodela punctata*, que es un cepa de *Spirodela punctata* aislada por E. Landolt y marcada erróneamente como *Lemna disperma* en Landolt, 1986.

La planta *Lemnaceae* transformada, tejido y productos de la misma de la invención se pueden usar para la producción de varios productos químicos y biológicos tal como proteínas y polipéptidos codificados por el ADN transformante y también se puede usar para preparar varias enzimas capaces de producir varios productos químicos tal como hidratos de carbono, lípidos, alcaloides, pigmentos, vitaminas, etc.

La presente invención también concierne a un método de producción de un producto de interés, por ejemplo productos químicos o biológicos tal como proteínas, polipéptidos, hidratos de carbono, lípidos, alcaloides, pigmentos, vitaminas, y otros, en donde una *Lemnaceae* transformada según la invención se hace crecer en un medio de cultivo apropiado, para producir el producto de interés. El producto de interés puede ser además aislado y purificado, total o parcialmente, para un uso adicional, para servir como un aditivo de alimentos, un aditivo de cosméticos, una vacuna, agente terapéutico, un biocatalizador para la conversión enzimática de productos químicos, etc. De forma alternativa, el producto de interés se puede usar en su forma cruda, sin aislar como está presente en la planta *Lemnaceae* crecida, usando la planta misma sin procesamiento o con procesamiento parcial para los fines anteriores.

La presente invención también se ocupa, mediante otro de sus aspectos, de un producto de interés que es un producto químico o biológico tal como proteínas, polipéptidos, hidratos de carbono, lípidos, alcaloides, pigmentos, vitaminas, y otros, obtenidos de las plantas *Lemnaceae* anteriores transformadas establemente.

La planta o tejido transformados también puede expresar caracteres deseados que no se caracterizan en la producción de nuevos productos, ejemplos de tales caracteres son: resistencia a antibióticos, por ejemplo resistencia a kanamicina, conferida por el gen *npt II*; o resistencia a herbicidas, por ejemplo resistencia al herbicida BASTA 20 (glufosinato de amonio, Hoechst, Alemania).

Las plantas o tejidos de *Lemnaceae* transferidas también pueden expresar más de un gen exógeno, por ejemplo, la planta se puede transformar para ser resistente a varios herbicidas y/o antibióticos a la vez.

Según la presente invención, se encontró que la transformación estable de plantas o tejidos de *Lemnaceae* se puede obtener mediante el uso de células de *Agrobacterium* que llevan dicho ADN transformante. De esta manera, según un de sus aspectos adicionales, la presente invención concierne a un método para la transformación estable de plantas o tejidos de *Lemnaceae* que comprende incubar las plantas o tejido vegetal de *Lemnaceae* con células de *Agrobacterium* que llevan dicho ADN transformante, por lo cual las células en dicho tejido vegetal se vuelven establemente transformadas mediante dicho ADN transformante.

## ES 2 302 359 T3

Se determinó además que existen cepas de *Agrobacterium* que se pueden dirigir a y transformar específicamente el tejido meristemático en *Lemnaceae*, por ejemplo cepas de *A. tumefaciens* EHA105, EHA101 y GVE3103, o cepas de *Agrobacterium* que se dirigen a y transforman específicamente el área herida de la planta tal como las cepas de *A. tumefaciens* LBA4404 y C58. Por lo tanto el método de la invención concierne preferiblemente a la incubación de plantas *Lemnaceae* con *Agrobacterium* de las cepas EHA105, EHA101 y GVE3103 capaces de transformar el tejido meristemático o cepas de *Agrobacterium* LBA4404 y C58 capaces de transformar tejido herido.

Se encontró además que el uso de la filtración a vacío durante la incubación de las plantas *Lemnaceae* con las células de *Agrobacterium* aumenta la eficacia de la transformación. De esta manera, mediante una forma de realización preferida, el método de transformación incluye incubación de plantas o tejidos de *Lemnaceae* con células de *Agrobacterium* mientras se aplica infiltración a vacío.

Otra forma de realización del método de la invención se basa en el descubrimiento de era posible aumentar la eficacia de la transformación de *Lemnaceae* por *Agrobacterium* exponiendo la zona merismática de la fronda madre. Tal exposición se puede llevar a cabo de forma física, es decir, eliminando las frondas hijas para exponer la zona merismática, por ejemplo mediante un movimiento de tirón usando pinzas, o mediante cualquier otro medio mecánico. De forma alternativa, dicha exposición se puede llevar a cabo aplicando una preparación química o una preparación hormonal capaz de eliminar específicamente la fronda hija sin dañar la zona merismática subyacente.

Todavía otro aspecto de la presente invención concierne a un método nuevo para la transformación de plantas usando células transformantes de *Agrobacterium*, que es particularmente adecuado para la transformación en masa de tejido vegetal. Según este método, las plantas se cortan en partículas pequeñas que se incuban después con las células transformantes de *Agrobacterium*, preferiblemente en presencia de un medio potenciador que se describirá más adelante. El tamaño de las partículas debe ser tal que al menos algunas de ellas contengan tejido meristemático no dañado que sea capaz de regenerarse a plantas enteras. Para alcanzar esta característica, las partículas deben ser preferiblemente de un tamaño medio de más de 150  $\mu\text{m}$  de diámetro, más preferiblemente en un intervalo de tamaño de alrededor de 150  $\mu\text{m}$  - 750  $\mu\text{m}$ . Cortar el tejido vegetal en tales partículas pequeñas maximiza el área de contacto entre el tejido meristemático y *Agrobacterium*. Además, las células de *Agrobacterium* infectan más fácilmente el tejido vegetal dañado y al cortar la planta, las células de *Agrobacterium* están expuestas a grandes regiones de tejido vegetal dañado. El resultado total de estos factores es un marcado aumento en el rendimiento de la transformación.

Otro método de transformación que se puede usar en la realización de la presente invención, es la microinyección que se conoce por sí mismo. Según este método, las células de *Agrobacterium*, preferiblemente junto con el medio potenciador de la invención que se describirá más adelante, se microinyectan a una zona de transformación deseada de la planta, típicamente en el meristemo de la planta. Una ventaja principal de la microinyección, es que permite dirigir específicamente las células transformantes de *Agrobacterium* al tejido deseado, por ejemplo solo al meristemo de las raíces, solo al meristemo de las hojas, etc., de modo que el resultado es una planta que tiene ADN exógeno solo en un tejido específico, por ejemplo, las raíces y no en otros tejidos.

Otra forma de realización del método de transformación de *Lemnaceae* se basa en el sorprendente descubrimiento de que la transformación se puede llevar a cabo *in planta*, esto es, usando la planta entera y no hay necesidad de cortar la planta en partículas pequeñas, o de usar cultivo de tejido y después regeneración *in vivo* para fines de transformación. Se puede usar una planta completa para la transformación siempre que las células de *Agrobacterium* se dirijan al meristemo bien por microinyección directa como se ha descrito anteriormente bien mediante la utilización de cepas de *Agrobacterium* que se dirigen preferiblemente al meristemo tales como las cepas de *A. tumefaciens* EHA105, EHA101 y GVE3103. Así la presente invención proporciona un método para la transformación *in planta* de *Lemnaceae* dirigiendo las células de *Agrobacterium* que llevan el ADN transformante al meristemo de la planta a ser transformada.

Según otra forma de realización de la invención, se encontró que es posible aumentar la eficacia de la transformación de plantas por células de *Agrobacterium* incubando las células de *Agrobacterium* con el tejido vegetal a ser transformado en presencia de un medio potenciador que es capaz de aumentar la virulencia de *Agrobacterium*. Este aumento en eficacia debido al uso del potenciador no está limitado a la transformación de plantas *Lemnaceae* sino que también se puede aplicar a plantas en general incluyendo plantas monocotiledóneas y plantas dicotiledóneas.

*Agrobacterium* se usa ya de forma rutinaria para la transformación de plantas dicotiledóneas. Sin embargo, según esta forma de realización de la invención, la eficacia de transformación de plantas dicotiledóneas se aumenta mediante incubación del medio potenciador de *Agrobacterium*. Con respecto a las plantas monocotiledóneas, aunque ha habido algunos informes de algunas transformaciones con éxito de tales plantas con *Agrobacterium*, estos informes han sido esporádicos y normalmente mostraban rendimientos de transformación insatisfactorios. Aumentar la virulencia de *Agrobacterium* mediante el medio potenciador, según dicha forma de realización, permite por primera vez, la transformación de muchas especies de plantas monocotiledóneas que no habían sido previamente transformadas, incluidas las pertenecientes al género *Lemnaceae*, así como un aumento en el rendimiento de transformación de plantas que ya se sabía que se transformaban, aunque con un rendimiento bajo mediante el uso de *Agrobacterium*.

Las plantas transformadas establemente producidas utilizando el medio potenciador según se ha descrito anteriormente, también forman un aspecto de la invención.

## ES 2 302 359 T3

El medio potenciador que aumenta la virulencia de las células de *Agrobacterium*, comprende tejido vegetal cultivado a un pH por debajo de alrededor de 5,2. Por ejemplo, el medio potenciador puede comprender una suspensión de células frescas de plantas dicotiledóneas, a una concentración del 1-10% (peso/volumen). La suspensión de células frescas puede ser, por ejemplo, de plantas dicotiledóneas de la familia *Solanaceae*.

Preferiblemente, el medio potenciador también comprende cafeína a una concentración de 100-500 mg por litro de medio.

Un ejemplo específico de un medio potenciador es uno que comprende medio basal MS a un pH de alrededor de 3,5-4,2, del 1-10% (peso/volumen) de una suspensión de células frescas de *Nicotiana tabacum*, y alrededor de 100-500 mg por litro de medio de cafeína.

Mediante otra alternativa, el medio potenciador de la invención es un medio de crecimiento de plantas que comprende extractos vegetales de *Lemnaceae*. Tal medio se puede producir extrayendo plantas *Lemnaceae* en un medio adecuado tal como un tampón fosfato.

Ambos tipos de medios potenciadores, teniendo una o ambas de las especificaciones anteriores para su uso en aumentar la eficacia de transformación de células de *Agrobacterium* usadas como vectores de transformación, también forman otro aspecto de la invención.

Mediante todavía otra forma de realización, la presente invención concierne a un método para mantener callos morfogénicos de *Lemnaceae* durante períodos de tiempo largos, usando niveles bajos de sacarosa en el medio de cultivo, por ejemplo, del 0,1 al 1,5% de sacarosa. Se encontró que es posible aumentar significativamente el período de mantenimiento de los callos en un estado viable, por ejemplo, de 2 semanas a más de 3 meses disminuyendo el nivel de sacarosa en el medio de crecimiento.

Otro aspecto de la invención concierne a un método para la producción de callos de *Lemnaceae* muy regenerativos, y además un método para la regeneración rápida y eficaz de plantas a partir de callos, utilizando el efecto combinado de minerales B5, niveles bajos de sacarosa (del 0,1 al 1,5% de sacarosa) y fitohormonas en el medio de crecimiento.

La presente invención se ilustrará ahora en referencia a algunos ejemplos no limitantes.

### Breve descripción de la figura

La Figura 1 muestra una imagen esquemática del plásmido Ti pME504.

### Descripción detallada de la invención

A continuación, la invención se ilustrará a veces con referencias específicas a la transformación de plantas, tejidos o callos de *Lemnaceae*, siendo dadas tales referencias meramente como un ejemplo y se debe entender que la invención no está limitada a ellas.

Las plantas *Lemnaceae* establemente transformadas contienen genes exógenos que confieren caracteres útiles tal como: mejora de la calidad nutricional de la planta o partes de la planta; expresión *de novo* de productos químicos y biológicos deseados, por ejemplo enzimas; factores de crecimiento, hormonas tal como insulina; anticuerpos, antioxidantes; defensinas; proantocianidinas; citoquinas y otros polipéptidos y proteínas biológicamente activos; sobreexpresión de productos ya expresados por estas plantas; etc. Otros productos que se pueden obtener de las plantas *Lemnaceae* transformadas son enzimas para aplicaciones industriales, tal como la superóxido dismutasa (SOD),  $\alpha$ -amilasa, invertasa, sacarosa fosfato sintasa y similares, y productos químicos tales como pigmentos alimentarios, por ejemplo  $\beta$ -caroteno, antocianina, etc. El tipo de producto que se puede obtener de las plantas transformadas depende obviamente de la naturaleza de dicho ADN transformante. Mediante otra aplicación los genes pueden ser aquellos que comunican resistencia a enfermedades.

Los genes que comunican resistencia a enfermedades son conocidos en la materia, incluyendo péptidos líticos, defensinas, genes de la oxalato oxidasa para tolerancia a esclerotinia o quitinasas (US 5597946, US 4940840, US 5290687, US 5374540, US 5670706, US 53996801, US 5695939, todas las publicaciones incorporadas aquí por referencia).

El ADN transformante que se introduce en las células vegetales, incluye, como apreciará el experto en la materia, secuencias codificantes que codifican para el carácter deseado así como secuencias de control que controlan la expresión de la secuencia codificante, por ejemplo, promotores, potenciadores, terminadores, intrones y similares, pre-pro-péptidos o péptidos de tránsito, produciendo los últimos la expresión de dicho carácter deseado en la región diana específica de la célula vegetal.

Los promotores que controlan la expresión de los genes en células vegetales son bien conocidos en el campo de la biotecnología de plantas, incluyendo cualquier secuencia de promotor de un gen que se expresa de forma natural en plantas o células vegetales, de origen vegetal, bacteriano o vírico. Los promotores adecuados se divulgan en Weising *et al.*, (1988), *Annual Rev. Genet.*, **22**: 241), el objeto de la cual se incorpora aquí por referencia. A continuación se da

## ES 2 302 359 T3

una lista representativa parcial de promotores adecuados para su uso en el contexto de la invención: secuencias reguladoras del ADN-T de *A. tumefaciens*, incluyendo manopina sintasa, nopalina sintasa y octopina sintasa; secuencias reguladoras de origen vegetal, incluyendo el promotor de la alcohol deshidrogenasa de maíz, promotores inducibles por luz tal como los promotores de la subunidad pequeña de la ribulosa-biscarboxilasa/oxigenasa (SSU RuBisCo) de genes de varias especies y los promotores de los principales genes de unión a clorofila a/b, promotores de histonas (EP 507 698), promotores de actina (US 5641876), promotores de ubiquitina 1 de maíz (Christenses *et al.*, (1996)), secuencias reguladoras de orígenes víricos, tal como los promotores 19S o 35S del virus del mosaico de la coliflor (US 5352605; US 5530196); promotores regulados a través del desarrollo tal como los promotores waxy, zeina o bronce de maíz; así como promotores sintéticos u otros naturales que son bien inducibles o constitutivos, incluyendo aquellos promotores que muestran expresión específica de órgano o expresión en un estado de desarrollo específico de la planta, como el promotor de la napina (EP 255 378) o el promotor de la alfa-tubulina (YS 5635618); estando todas las publicaciones incorporadas aquí por referencia.

Como una forma de realización preferida, el promotor se selecciona del grupo que consiste en los promotores de la subunidad pequeña de la ribulosa-biscarboxilasa/oxigenasa (SSU RuBisCo) de genes de varias especies, los promotores de histona, los promotores de actina, los promotores de la ubiquitina 1 de maíz y los promotores 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV 35S).

Según la presente invención, es posible usar con el promotor, otros elementos reguladores normalmente localizados entre el promotor y la secuencia codificante del carácter deseado, elementos que inducen la expresión de dicho carácter deseado en un región diana de la planta o célula vegetal específica, por ejemplo, los cloroplastos. Los ejemplos son secuencias codificantes para péptidos de tránsito, secuencias individuales o múltiples combinadas, las últimas pueden estar separadas mediante secuencias intermedias. Tales secuencias múltiples de péptidos de tránsito, tal como secuencias dobles de péptidos de tránsito, pueden comprender, en la dirección de transcripción (de 5' a 3'): un péptido de tránsito de un gen vegetal que codifica una enzima localizada en un plasto, una secuencia parcial de la parte N-terminal madura de un gen vegetal que codifica una enzima localizada en un plasto y después un segundo péptido de tránsito de un gen vegetal que codifica una enzima localizada en un plasto. Un ejemplo es el péptido de tránsito optimizado divulgado en US 5510471 ó US 5633448 (incorporados aquí por referencia). Las enzimas localizadas en plastos pueden ser de cualquier origen, por ejemplo la subunidad pequeña (SSU) de la ribulosa, el gen de la 1,5-difosfato carboxilasa oxigenasa (RuBisCo), o el gen EPSPS vegetal. El péptido señal del gen RP-1a del tabaco descrito en Cornelissen *et al.*, es otro ejemplo de péptido de tránsito.

Otra región de control puede ser un terminador o una señal de poliadenilación no traducida en el extremo 3' de la secuencia codificante que puede ser de cualquier origen, por ejemplo bacteriano, tal como el gen de la nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*, o de origen vegetal, tal como el terminador del gen que codifica la SSU RuBisCo de maíz o girasol, o el terminador de un gen de histona vegetal como se divulga en EP 633317, incorporada aquí por referencia.

Además, el ADN transformante puede comprender también un gen marcador de selección, tal como un gen que codifica para resistencia a un herbicida, resistencia a antibióticos, o similares. Además o como alternativa, el ADN transformante puede comprender además un gen indicador, tal como un gen que codifica para un marcador de color. Un gen de marcador de selección o un gen indicador facilitan la identificación y selección del tejido transformado y permite su separación del tejido no transformado.

Ejemplos específicos de genes de marcadores de selección son la secuencia codificante de la higromicina fosfo-transferasa (HPT), que puede derivar de *E. coli* y que confiere resistencia al antibiótico higromicina B; el gen de la aminoglicosidasa fosfo-transferasa del transposón Tn5 (AphII) que codifica resistencia a los antibióticos kanamicina, neomicina y G418. Los genes que codifican proteínas que confieren tolerancia a herbicidas son conocidos en la técnica, incluyendo genes que comunican tolerancia a herbicidas de oxinilo (US 4810648 y US 5559024), los genes que comunican tolerancia a los herbicidas glifosato e inhibidor de EPSPS (US 4535060, US 4769061, US 5094945, US 4940835, US 5188642, US 4971908, US 5145783, US 5312910, US 5310667, US 5633435, US 5627061, US 5554798, US 5633448, WO 96/04103, todas las publicaciones incorporadas aquí por referencia), genes que comunican tolerancia a glufosinato (EP 242 236, incorporada aquí por referencia), así como los genes que comunican tolerancia los inhibidores de HPPD (WO 96/38567 y WO 98/02562, ambas publicaciones incorporadas aquí por referencia). Aquellos genes de marcadores de selección que confieren resistencia o tolerancia a estos compuestos fitotóxicos también son de utilidad comercial en las plantas transformadas resultantes.

Los genes indicadores se pueden usar para identificar las células, tejidos o callos transformados y para evaluar la funcionalidad de las secuencias reguladoras. Los genes indicadores que codifican proteínas marcadoras de selección fácilmente ensayables son bien conocidos en la técnica. En general, un gen indicador es un gen que no está presente en, o es expresado por, el organismo o tejido receptor y que codifica una proteína cuya expresión se manifiesta mediante alguna propiedad fácilmente detectable, por ejemplo, cambio fenotípico o actividad enzimática. Ejemplos de tales genes son el gen de la cloranfenicol acetil transferasa (CAT) de Tn9 de *E. coli*, el gen de la  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) del locus *uidA* de *E. coli*, la proteína fluorescente verde (GFP) obtenida de *A. Victoria* y el gen de la luciferasa de la luciérnaga *Photinus pyralis*. La expresión del gen indicador se ensaya a un tiempo adecuado después de que el ADN se haya introducido en las células receptoras. Un ejemplo de tal ensayo supone el uso del gen de la  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) de *E. coli* (Jefferson *et al.*, (1987)). Las células vegetales transformadas y que expresan este gen se teñirán de azul tras la exposición al sustrato 5-bromo-4-cloro-idolil- $\beta$ -D-glucuronido (X-GLUC), en el medio extracelular.

## ES 2 302 359 T3

Según el método de la invención, *Agrobacterium*, por ejemplo *Agrobacterium tumefaciens*, se manipula de modo que contenga el ADN transformante que se va insertar en la planta diana, por ejemplo la planta *Lemnaceae* diana, manipulación que se realiza por medios conocidos por sí mismos. La planta entera o las células, tejidos o callos de la planta se ponen entonces en contacto con las células de *Agrobacterium* y se incuban juntos. Los tejidos de la planta se seleccionan después para los que contienen el ADN transformante, por ejemplo, ensayando la expresión fenotípica del gen marcador, por ejemplo resistencia a herbicida o antibióticos, o para la expresión del gen indicador, por ejemplo, un producto coloreado. También es posible verificar la presencia del ADN transformante introducido mediante un ensayo de ADN tal como mediante PCR.

La invención se ilustrará ahora adicionalmente en los siguientes ejemplos.

### Procedimientos experimentales

#### I. Cultivo y mantenimiento de *Lemna* y *Spirodela* para experimentos de microinyección

Para la microinyección en la zona del meristemo, se introdujo un inóculo axénico (aprox. 10 plantas) de *Spirodela oligorrhiza* (aquí denominada *Spirodela punctata*) Hegelm. o *Lemna gibba* Hurfeish en una botella de 250 ml que contenía 50 ml de media MS que tenía los ingredientes según se detallan en la Tabla 1 posteriormente.

#### II. Condiciones estándar de crecimiento

Los cultivos se hicieron crecer a 26°C bajo luz fluorescente continua ( $30 \mu\text{E m}^2\text{s}^{-1}$ ) en una atmósfera enriquecida con  $\text{CO}_2$  al 3-5%.

TABLA 1

*Medio basal MS modificado (medio MS) (basado en Murashige & Skoog, 1962)*

Macro elementos	Cantidad (mg/l)	Micro elementos	Cantidad (mg/l)	Aditivos orgánicos	Cantidad (mg/l)
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1650	$\text{H}_3\text{BO}_3$	6,2	Glicina	2
$\text{KNO}_3$	1900	$\text{MnSO}_4$	22,3	Meso-inositol	100
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,25	Tiamina HCl	10
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	KI	0,83	Ácido nicotínico	0,5
FeEDTA	35	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	Piridoxina	0,5
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,25	Biotina	0,5
		$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,03	Ácido fólico	0,5
				Hidrolizado de caseína	800
				Sacarosa	30000
				pH llevado a 5,8 con NaOH antes de esterilizar en autoclave	

#### III. Procedimiento estándar de transformación

En condiciones estériles, se colocaron 2,5 g de plantas *Lemnaceae* en una placa de Petri vacía de 9 cm. Se preparó una suspensión de 10 ml de *A. tumefaciens* de  $5-8 \times 10^8/\text{ml}$ , en medio basal MS (Tabla 1) según se describe en (IV) a continuación, y se añadió a la placa. Las plantas se cocultivarán con la suspensión de *A. tumefaciens* durante 20-40 minutos a temperatura ambiente. La suspensión se eliminó de la placa y las plantas se lavaron 3 veces con medio basal MS (Tabla 1) fresco. Las plantas se transfirieron a un recipiente (15x20x12 cm) que contenía 1,5 l de medio SP (Tabla 2) a 26°C bajo luz fluorescente continua ( $30 \mu\text{E m}^2\text{s}^{-1}$ ) en una atmósfera enriquecida con  $\text{CO}_2$  al 3-5%.

# ES 2 302 359 T3

TABLA 2

Medio SP (modificado según Hutner) (cf. Posner, 1967)

	Cantidad (mg/l)
KNO <sub>3</sub>	300
Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	72
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	74
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	40
NaEDTA	0,003
Citrato férrico	1
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1
MnSO <sub>4</sub>	0,1
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,1
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,03
ZnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	1
pH llevado a 5,8 con NaOH antes de esterilizar en autoclave	

## IV. Preparación de *A. tumefaciens* para la transformación de *Lemnaceae*

Se recogió una única colonia de *Agrobacterium tumefaciens*, mantenido en placas de LB suplementadas con antibióticos (medio LB supl.), (Tabla 3, a continuación), y se hizo crecer durante la noche (28°C, 250 rpm) en 10 ml de medio 2YT suplementado con antibióticos (medio 2YT supl.) (Tabla 4, más adelante). El cultivo crecido se transfirió a 50 ml de medio 2YT supl. y se hizo crecer además durante 12 horas adicionales (28°C, 250 rpm). Antes de la transformación, el cultivo de *A. tumefaciens* se centrifugó (3200 x g, 5 minutos), se eliminó el sobrenadante y las bacterias se resuspendieron en 10 ml de medio MS (Tabla 1). Antes del cocultivo con las plantas *Lemnaceae*, la concentración de bacterias se ajustó a 5-8x10<sup>8</sup> células/ml.

TABLA 3

Medio líquido suplementado y solidificado (medio LB supl.)

	Cantidad
Bacto triptona	10 g
Extracto de levadura Bacto	5 g
NaCl	10 g
Rifampicina	25 mg
Kanamicina	50 mg
Carbenicilina	50 mg
Agar Cifco	10g
pH llevado a 7,0 con NaOH	

## V. Microinyección en la zona del meristemo

1. *Preparación de las plantas Lemnaceae* - Se cultivaron las plantas *Lemnaceae* axénicas en recipientes (8,5 cm de diámetro por 11 cm de altura) que contenían 50 ml de medio MS (Tabla 1) a 25°C con bombillas fluorescentes blancas frías (60 μE m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>). Todos los tratamientos se realizaron en una cabina estéril de flujo laminar a temperatura ambiente.

2. *Preparación del vector de transformación* - Se utilizó *Agrobacterium tumefaciens* que contenía un plásmido p35S GUS INT (Vancanneyt *et al.*, 1990). Este plásmido lleva el gen NPTII que codifica resistencia a kanamicina y la secuencia codificante del gen indicador *uidA* de la β-glucuronidasa (GUS) (Jefferson, 1987) interrumpido por el intrón IV2 (Eches *et al.*, 1986). El uso de este vector permitió teñir para la expresión de GUS inmediatamente después de la transformación y, al mismo tiempo, evitó fondo positivo de GUS derivado de *Agrobacterium*. Para los experimentos de transformación, se cogió una única colonia y se resuspendió en medio 2YT supl., los ingredientes del cual se detallan en la siguiente tabla 4:

## ES 2 302 359 T3

TABLA 4

*Medio líquido 2YT suplementado (medio 2YT supl.)*

	Cantidad
Bacto triptona	16 g
Extracto de levadura Bacto	10 g
NaCl	5 g
Rifampicina	25 mg
Kanamicina	50 mg
Carbenicilina	50 mg
pH llevado a 7,0 con NaOH	

Las bacterias se cultivaron durante 16 horas en un agitador giratorio (250 rpm) a 28°C. Antes de cocultivar las bacterias y las plantas, el cultivo de bacterias se diluyó con medio MS (Tabla 1) o medio potenciador (Tabla 5, a continuación) hasta una densidad óptica a 550 nm de 0,6 y se llevó a un pH de 4 con HCl. Esto produjo una preparación de *Agrobacterium* adecuada para la transformación de *Lemnaceae*.

3. *Microinyección* - Las plantas *Lemnaceae* se transfirieron a medio MS llevado a pH 4, o a medio potenciador de la invención que tenía los ingredientes como se detallan en la siguiente Tabla 5:

TABLA 5

*Medio potenciador de la virulencia de Agrobacterium de la invención*

	Cantidad
Cafeína (Sigma)	150 mg
Suspensión de células frescas de <i>Nicotiana tabacum</i> (2HS) (preparada como en Aviv y Galun, 1984)	20 ml
Medio basal MS (Tabla 1) llevado a pH 4,0 con HCl antes de esterilizar en autoclave	980 ml

Las plantas se microinyectaron bajo un microscopio de disección usando una jeringuilla estéril desechable de 1 ml con una aguja G-27, y llenada con una preparación de *Agrobacterium* adecuada para la transformación de *Lemnaceae*. Las inyecciones se dirigieron hacia las zonas meristemáticas de las plantas para poner las bacterias en contacto con los meristemos en crecimiento. En cada inyección, se inyectaron alrededor de 20 µl dentro de la zona meristemática y cada zona se inyectó tres veces.

4. *Cocultivo* - Las plantas *Lemna* o *Spirodela* se coincubaron con el *Agrobacterium* adecuado preparado en medio MS (Tabla 1) llevado a pH 4, o en el medio potenciador de la invención (Tabla 5), durante 48 horas a 25°C bajo bombillas fluorescentes blancas frías (30 µE m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>). Después de esto, las plantas se lavaron 3 veces con agua destilada estéril a temperatura ambiente y se cultivaron en medio MS (Tabla 1) suplementado con 400 mg/l de claforan.

### VI. Procedimiento estándar de tinción con X-Gluc

En un tubo Eppendorf de 1,8 ml, se disolvieron 5 mg de x-gluc (Duchefa Biochemie BV) en 150 µl de dimetilformamida. A continuación se añadió la siguiente solución de tinción: 10 ml de Tris 100 mM pH 7,0; 15 µl de ferrocianuro 500 mM (solución de partida mantenida congelada); 15 µl de ferrocianuro 500 mM (solución de partida mantenida congelada) y 100 µl de Triton X-100 al 10%. Las plantas se transfirieron a una placa de Petri de 9 cm y se añadieron 10 ml de solución de tinción. Los tubos se incubaron durante la noche a 37°C en la oscuridad. Después se eliminó la solución de tinción y se enjuagó con agua destilada. Las plantas positivas para GUS se observaron con un microscopio binocular.

### VII. Formación y mantenimiento a largo plazo de callos de *Spirodela* morfogenética

Las plantas de *Spirodela punctata* se transfirieron a medio SP (Tabla 2) durante 5 días a 26°C bajo luz fluorescente continua (30 µE m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>). Las plantas se colocaron bajo un microscopio binocular, iluminado desde abajo, y las frondas hijas en crecimiento se eliminaron, mediante un movimiento de tirón usando unas pinzas. Para la inducción de callo, las frondas madre se hicieron crecer en medio B-5 (Tabla 6, a continuación) suplementado con sacarosa al 1,0%, BA 2 mg/l y Dicamba 50 mg/l. Después de crecer durante 3 semanas en este medio, los callos se transfirieron a medio B-5 suplementado con 2IP 2 mg/l y 2,4-D 10 mg/l. El mantenimiento a largo plazo de los callos se alcanzó mediante

## ES 2 302 359 T3

transferencia periódica cada 4 semanas a medio B-5 fresco suplementado con sacarosa al 1,0%, 2IP 2 mg/ml y 2,4-D 10 mg/ml.

### VIII. Regeneración rápida de plantas de *Spirodela* a partir de callos

Los callos de *Spirodela* se mantuvieron en medio B-5 (Tabla 6 a continuación) suplementado con sacarosa al 1,0%, 2IP 3 mg/ml y 2,4-D 10 mg/ml. Para la regeneración, los callos se transfirieron a medio B-5 suplementado con sacarosa al 1,0% y 2IP 2 mg/ml. Las plantas de *S. punctata* totalmente regeneradas se obtuvieron de forma eficaz en 1-2 semanas. Los callos de *Spirodela* y las plantas regeneradas, se hicieron crecer a 26°C bajo luz fluorescente continua ( $30 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ).

TABLA 6

*Medio B-5 (modificado de Gamborg et al., 1968)*

	Cantidad (mg/l)
KNO <sub>3</sub>	2500
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	250
Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	150
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	150
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	134
FeEDTA	28
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	10
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	0,25
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,025
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,025
KI	0,75
Ácido nicotínico	1
Tiamina HCl	10
Piridoxina HCl	1
m-inositol	100
Gelrite	3 g/l
pH llevado a 5,8 con NAOH antes de esterilizar en autoclave	

### IX. Aislamiento y transformación de meristemos semiautomatizado

1. *Sincronización del crecimiento de Spirodela y Lemna mediante exposición de meristemos* - Todos los materiales se esterilizaron y todos los procedimientos se llevaron a cabo en condiciones asépticas. Las plantas (10 g) se recogieron en una cabina estéril con flujo laminar vertiendo el contenido de un recipiente de cultivo a través de un tamiz de acero inoxidable estéril de malla 10 (tamaño de poro 1,7 mm). Las plantas de *Spirodela* o *Lemna* se transfirieron desde la parte superior del tamiz con una cuchara estéril a un homogenizador estéril de 1 l de capacidad, modificado para contener 6 cuchillas colocadas en tres planos diferentes (Blumenthal et al., 1993). El homogenizador se llenó con 250 ml de agua destilada, esterilizada por filtración y se activó durante 4 segundos a 17000 rpm. Las plantas parcialmente homogenizadas se vertieron de forma aséptica del homogenizador a través de un tamiz Nitex esterilizado de malla 20 (tamaño de poro 800  $\mu$ ) y se recogieron en un tamiz Nitex esterilizado de malla 42 (tamaño de poro 350  $\mu$ ). Posteriormente, se dirigió un chorro de agua destilada esterilizada por filtración (2 atm., 10 litro/min) encima del tamiz Nitex de malla 20 para forzar a todas las partículas de explantes de tamaño menor de 800  $\mu\text{m}$  a pasar a través, produciendo una población de un tamaño de partícula de 350-750  $\mu\text{m}$ . Las partículas de explantes mayores de 800  $\mu\text{m}$  se volvieron a transferir al homogenizador con una cuchara estéril, el homogenizador se activó durante 3 segundos a 17000 rpm, y todos los pasos de tamizado y lavado se repitieron como antes. La población combinada de tamaño de 350-750  $\mu\text{m}$ , recogida en un tamiz Nitex esterilizado de malla 42, se sometió a un lavado final con chorro de agua. Las partículas de explantes tamizadas de 350-750  $\mu\text{m}$  (5 g) se recogieron mediante una cuchara estéril y se espaciaron en una placa de Petri estéril de 14 cm. A lo largo de este proceso, todos los residuos se dirigieron mediante fuerza gravitacional a un envase de plástico de 30 litros situado debajo de la cabina de flujo laminar.

## ES 2 302 359 T3

2. *Cocultivo seguido por un período de recuperación* - Todos los materiales se esterilizaron y todos los procedimientos se llevaron a cabo en condiciones asépticas. Las partículas de explantes tamizadas de 350-750  $\mu\text{m}$  de *Spirodela* o *Lemna*, en la placa Petri de 14 cm, se resuspendieron en 15 ml de medio MS (Tabla 1) llevado a pH 4, y después se mezclaron con 15 ml de *Agrobacterium* previamente cultivado en medio 2YT supl. (Tabla 4) durante 24 horas a 25°C en un agitador rotatorio a 250 rpm. La mezcla explante-bacteria se cocultivó durante 1 hora a 25°C y 10  $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Después de esto, la mezcla se transfirió mediante una cuchara a un tamiz Nitex esterilizado de malla 100 (tamaño de poro 150  $\mu$ ). Las partículas excluidas por el tamiz se lavaron con 5 ml de medio MS (Tabla 1) llevado a pH 4, y se transfirieron a un recipiente de cultivo de 3 l de boca ancha que contenía 500 ml del mismo medio. El cocultivo continuó durante 48 horas a 25°C bajo luz fluorescente continua (30  $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). Al final de este período, la mezcla se tamizó a través de un tamiz Nitex esterilizado de malla 100 (tamaño de poro 150  $\mu$ ), seguido de tres aclarados de 200 ml con agua destilada. Las partículas de explantes asociadas con bacterias se transfirieron mediante una cuchara a un recipiente de cultivo de 3 l de boca ancha que contenía 500 ml de medio MS (Tabla 1) suplementado con cloranfenicol 400 mg/l y se cultivaron durante 5 días a 25°C y luz 30  $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Los explantes se tamizaron entonces como antes, seguido mediante separación del material flotante (la mayoría del cual estaba vivo y en proliferación) de las partículas hundidas, no vitales. Esto se alcanzó echando el material de explantes junto con agua destilada, en una probeta graduada de 200 ml y recogiendo el material flotante con una cuchara coladora. Los explantes se cultivaron en botellas Erlenmeyer de 1 litro que contenían 300 ml de medio SP (Tabla 2) durante 3 días.

### X. Selección y genes indicadores

Se usaron selección por NPT II y tinción de GUS para determinar si las células de los tejidos vegetales o callos tratados estaban transformadas, es decir, que contenían el ADN transformante. Como vector de expresión, se usó un ADN que comprendió el promotor 35S del caMV seguido por la secuencia codificante de NPT II de *E. coli*, que confiere resistencia a kanamicina. Se ensayó la herencia estable de los caracteres transgénicos (resistencia a kanamicina y actividad GUS) en medio permisivo mientras que el gen NPT II y sus productos se ensayaron mediante PCR e inmunotransferencia, respectivamente.

#### Ejemplo 1

##### 30 *Transformación de plantas de Lemna y Spirodela por microinyección*

Se transfirieron un gen indicador con marcador de color (GUS) y un gen que confiere resistencia al antibiótico kanamicina (NPT II) a plantas *Lemnaceae* (*Lemna gibba* Hurfeish y *Spirodela punctata*) mediante transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Esto se alcanzó después de preparar las plantas de forma adecuada y promover activamente la transferencia de ADN al núcleo de la planta como se ha especificado anteriormente.

El medio potenciador de la invención (Tabla 5) aumentó marcadamente la virulencia de *Agrobacterium* contra *Lemnaceae*. Aplicar *Agrobacterium* a plantas de *Lemna* o *Spirodela*, mantenidas durante dos meses en medio MS (Tabla 1), al tiempo que se omitía el medio acelerador redujo drásticamente las frecuencias de transformación mediadas por microinyección como se muestra en los resultados de los siguientes experimentos:

#### Experimento 1.1

49 de 100 plantas de *Lemna* microinyectadas mantenidas en medio MS eran positivas para GUS cuando se usó el medio potenciador de la invención, mientras que 3 de 100 fueron positivas para GUS cuando el medio potenciador se omitió.

#### Experimento 1.2

47 de 100 plantas de *Spirodela* microinyectadas mantenidas en medio MS eran positivas para GUS cuando se usó el medio potenciador de la invención, mientras que 2 de 100 fueron positivas para GUS cuando se omitió el medio potenciador.

Los experimentos 1.1 y 1.2 prueban así que el medio potenciador de la invención aumenta significativamente la eficacia de transformación.

#### Experimento 1.3

34 de 100 plantas de *Lemna* microinyectadas mantenidas en medio MS eran positivas para GUS cuando el medio potenciador de la invención se llevó a pH 4,0; 19 de 100 eran positivas para GUS cuando el medio potenciador se llevó a pH 5,2; 9 de 100 eran positivas para GUS cuando el medio potenciador se llevó a pH 7,5.

#### Experimento 1.4

31 de 100 plantas de *Spirodela* microinyectadas mantenidas en medio MS eran positivas para GUS cuando el medio potenciador de la invención se llevó a pH 4,0; 13 de 100 eran positivas para GUS cuando el medio potenciador se llevó a pH 5,2; 5 de 100 eran positivas para GUS cuando el medio potenciador se llevó a pH 7,5.

## ES 2 302 359 T3

Estos resultados indican claramente que un pH por debajo de alrededor de 5,2 aumenta la eficacia de transformación.

5 Se encontró que la adición de cafeína, un agente nuevo en protocolos de transformación, y células vivas de tabaco (Aviv y Galun, 1984), fomentaban la transformación por *Agrobacterium*, como se muestra en los siguientes experimentos:

### Experimento 1.5

10 44 de 100 plantas de *Lemna* micoinyectadas mantenidas en medio MS eran positivas para GUS cuando el cocultivo se llevó a cabo en medio MS llevado a pH 4,0, que contenía cafeína y células vivas de tabaco; mientras que solo 33 de 100 fueron positivas para GUS cuando se omitieron la cafeína y las células vivas de tabaco.

### Experimento 1.6

15 39 de 100 plantas de *Spirodela* micoinyectadas mantenidas en medio MS eran positivas para GUS cuando el cocultivo se llevó a cabo en medio MS llevado a pH 4,0, que contenía cafeína y células vivas de tabaco; mientras que solo 31 de 100 fueron positivas para GUS cuando se omitieron la cafeína y las células vivas de tabaco.

20 Los experimentos 1.5 y 1.6 indican de este modo que la adición de cafeína y células vivas de tabaco al medio potenciador de la invención aumenta la eficacia de transformación.

### Ejemplo 2

#### 25 *Desarrollo de plantas a partir de partículas de explantes*

El proceso semiautomatizado de triturado de *Lemnaceae* produjo una fracción purificada de partículas de explantes de tamaño de 350-750  $\mu\text{m}$ , bien de *Lemna* o de *Spirodela*, que representaban aproximadamente el 50% del material total de partida. Entre las partículas de de 350-750  $\mu\text{m}$  había partículas de explantes que se vio que contenían zonas meristemáticas no dañadas, a partir de las cuales las plantas nuevas crecieron vigorosamente. Las partículas de explantes menores de de 150-350  $\mu\text{m}$  drásticamente redujeron el número de plantas que crecían de forma activa. Los explantes que contenían meristemas se mantuvieron verdes, flotaban y crecieron hasta la madurez. Todas las otras partículas de explantes rápidamente se volvieron amarillentas-marrones, con el tiempo decolorándose del todo, y la mayoría se hundía al fondo del recipiente de cultivo. La muerte en masa de las secciones de explantes no meristemáticos no inhibía el desarrollo normal de las plantas nuevas, que se desarrollaron a partir de las secciones de explantes que contenían meristemas en plantas *Lemnaceae* maduras morfológicamente indistinguibles de las plantas no trituradas, como se demuestra en los siguientes experimentos:

#### 40 Experimento 2.1

Cuarenta y ocho horas después del proceso de triturado, 600-800 partículas de explantes de un total de 80.000 dieron lugar a plantas de *Spirodela* verdes diminutas. Las colonias incipientes contenía cada una 1-2 plantas no más largas de 1 mm. Seis después del triturado, estas colonias consistían en 3 plantas, cada una de 2-3 mm de longitud, y 45 2-3 raíces desarrolladas de nuevo (5-6 mm de longitud). Nueve días después del triturado, las plantas alcanzaron un tamaño medio de alrededor de 4-5 mm de longitud y una forma comparable a la de la *Spirodela* control no triturada. En esta fase, las colonias contenían 5-7 frondas y 5-6 raíces totalmente elongadas. Estas plantas se subcultivaron adicionalmente durante al menos 5 generaciones. El tiempo medio de duplicación de biomasa fue de 2 días y no era distinguible del de las plantas control. No se observó variación somaclonal.

#### 50 Experimento 2.2

Cuarenta y ocho horas después del proceso de triturado, 300-500 partículas de explantes de un total de 80.000 dieron lugar a plantas de *Lemna* verdes diminutas. Las colonias incipientes contenían cada una 1 planta no más larga de 1 mm. Seis después del triturado, estas colonias consistían en 2 plantas, cada una de 2-3 mm de longitud, y 55 2 raíces desarrolladas de nuevo (1 mm de longitud). Nueve días después del triturado, las plantas alcanzaron un tamaño medio de alrededor de 7 mm de longitud y tenían una forma comparable a la de la *Lemna* control no triturada. En esta fase, las colonias contenían 4 plantas y 2-4 raíces. Estas plantas se subcultivaron adicionalmente durante al menos 5 generaciones. El tiempo medio de duplicación de biomasa fue de 2 días y no era distinguible del de las plantas control. 60 No se observó variación somaclonal.

65

## ES 2 302 359 T3

### Ejemplo 3

*Análisis de plantas de Lemna y Spirodela transformadas mediante el proceso semiautomatizada de triturado de Lemnaceae y mediante el procedimiento de transformación*

5

A. Tinción positiva de GUS en plantas Lemnaceae transformadas siguiendo la exposición semiautomatizada del meristemo y transformación

10 Tras la transformación con *Agrobacterium* que tenía el gen indicador *uidA* de la  $\beta$ -glucuronidasa (GUS), se cultivaron los explantes durante 3-7 días y después se tiñeron para la actividad de GUS. Los siguientes son los resultados de dos de tales experimentos:

#### Experimento 3.1

15 Dieciséis horas después sumergir colonias de *Spirodela* transformadas por *Agrobacterium* en una mezcla de reacción de GUS (Jefferson, 1987), 120 de 600 colonias en una repetición, y 400 de 800 colonias en otra, mostraron sectores azules, indicando que el 20-50% de los explantes se habían transformado. El tamaño de los sectores transformados varió desde 0,01 a 1 mm<sup>2</sup>. Las plantas controles no transformadas no mostraron ninguna tinción de GUS. En 2 de las 600 y 16 de las 800 colonias (0,3-2%), las plantas de la generación hija se tiñeron de azul sistémicamente. 20 Esto indica que las zonas meristemáticas a partir de las que se regeneran las plantas hijas, se habían transformado. En algunas colonias, las plantas de la generación madre se mantuvieron no teñidas mientras que se observó tinción de GUS sistémica en algunas plantas de la generación hija. Esto indica que la exposición de meristemo en masa de las plantas de *Spirodela* puede llevar a transformación dirigida al meristemo.

#### 25 Experimento 3.2

Dieciséis horas después sumergir colonias de *Lemna* transformadas por *Agrobacterium* en una mezcla de reacción de GUS (Jefferson, 1987), 60 de 300 colonias en una repetición, y 250 de 500 colonias en otra, mostraron sectores azules, indicando que el 20-50% de los explantes se habían transformado. El tamaño de los sectores transformados varió desde 0,01 a 1 mm<sup>2</sup>. Las plantas controles no transformadas no mostraron ninguna tinción de GUS. En 1 de las 300 y 5 de las 500 colonias (0,3-1%), las plantas de la generación hija se tiñeron de azul sistémicamente.

#### B. Integración del gen de resistencia a kanamicina

35 Para verificar la inserción e integración del ADN que se transfiere de *Agrobacterium*, se extrajo el ADN total de plantas de *Lemna* y *Spirodela* que se habían seleccionado previamente por tinción positiva de GUS. El ADN se amplificó en una reacción de PCR (alineamiento a 55°C) con los siguientes cebadores de las regiones codificantes del NPT II:

- 40 1. 5' GCACGAGGTTCTCCGGCCGCTTGGG 3';  
2. 5' GAAGGCGATGCGCTGCGAATCGGG 3'.

Estos cebadores producen un fragmento de 780 bp dentro del gen NPT II. El producto de la reacción de PCR se sometió a electroforesis en un gel de agarosa (0,8%) y se tiñó con bromuro de etidio. Las plantas de *Lemna* y *Spirodela* positivas para GUS mostraron la banda esperada del tamaño esperado para el transgén NPT II. Los controles no transformados de plantas de *Lemna* y *Spirodela* no contenían esta banda. La misma banda en la misma posición de migración también era evidente en ADN aislado del plásmido Ti de *Agrobacterium*, que se sometió a electroforesis en el mismo gel como control positivo. Estos resultados verificaron que *Agrobacterium* es capaz de transformar genéticamente plantas de *Lemna* y *Spirodela*. 50

#### C. Transformación de órganos específicos en una planta Lemnaceae intacta

55 En el 5% de la población transformada, la expresión del gen GUS introducido se detectó solo en el sistema de la raíz. En estos casos, la expresión de GUS se detectó en todo el sistema de la raíz. Esto tiene importancia en casos donde en los que es de interés expresar el gen introducido en solo una parte definida de la planta tal como el tejido de la raíz.

### Ejemplo 4

60

*Identificación de cepas de Agrobacterium que tienen una especificidad hacia la transformación de tejido meristemático en Lemnaceae*

Se mantuvieron plantas de *Spirodela punctata* y *Lemna gibba* var. Hurfeish en medio SP (Tabla 2) en condiciones de crecimiento estándar (procedimiento II). Usando el procedimiento estándar de transformación (procedimiento III), se coltivararon plantas intactas con 5 capas diferentes de *A. tumefaciens* (EHA105 [Xiu-Qing Li *et al.*, 1992]; EHA101 [Hood *et al.*, 1987]; GVE3103 [Deblaere *et al.*, 1985]; LBA4404 [Ooms *et al.*, 1982]; y C58 [Van Larebeke *et al.*, 1974]) llevando cada una el plásmido Ti pME504 (mostrado en la figura 1). Este plásmido lleva: el gen *nptIII*,

## ES 2 302 359 T3

que confiere resistencia al antibiótico kanamicina, bajo el control del promotor de la nopalina sintasa; el gen *bar*, que confiere resistencia al herbicida BASTA (Thompson *et al.*, 1987), bajo el control del promotor 35S-CaMV; y el gen *uidA* interrumpido por un intrón (Vancanneyt *et al.*, 1990), que codifica por el indicador GUS, también bajo el control del promotor 35S-CaMV. Se determinó la expresión de GUS (procedimiento VI) contando puntos azules. Se determinó la especificidad de tejido de las distintas cepas de *A. tumefaciens* valorando la distribución de los puntos azules en las plantas de *Lemnaceae*. Los datos se resumen en la Tabla 7, más adelante.

El método implicó herir las plantas de *Spirodela punctata* y *Lemna gibba* Hurfeish, cocultivar las plantas con  $5 \times 10^8$  bacteria  $\text{ml}^{-1}$ , infiltración a vacío (30 mbar, 5-10 minutos) y cocultivo adicional durante 4 horas. Se ensayaron las frondas para la expresión de GUS 10 días después del cocultivo.

Los resultados indican que la expresión de GUS en *S. punctata* cocultivada con las cepas de *A. tumefaciens* EHA105, EHA101 y GVE3103 se restringía principalmente a las fronda hijas que surgían del tejido meristemático, mientras que la expresión de GUS en *S. punctata* cocultivada con las cepas de *A. tumefaciens* LBA4404 y C58 se restringía principalmente a las áreas heridas de la fronda madre.

TABLA 7

A. <i>tumefac.</i>	Plásmido Ti	Expresión de GUS (% de frondas)			
		<i>Spirodela</i>		<i>Lemna</i>	
Cepa	Tipo	Fronda madre	Fronda hija	Fronda madre	Fronda hija
EHA105	agropina	6	23	1	7
EHA101	agopina	7	22	1	5
CVE3103	octopina	3	18	0	0
LBA4404	octopina	10	3	0	0
C58	ninguno	8	1	0	0

### Ejemplo 5

*Identificación de cepas de Agrobacterium que se dirigen específicamente y transforman tejido herido en Lemnaceae*

Se mantuvieron plantas de *Spirodela punctata* y *Lemna gibba* Hurfeish en medio SP (Tabla 2) en condiciones de crecimiento estándar (procedimiento II). Usando el procedimiento estándar de transformación (procedimiento III), se cocultivaron plantas intactas con 5 cepas diferentes de *A. tumefaciens* que lleva cada una el plásmido Ti pME504 (mostrado en la figura 1). Se determinó la expresión de GUS contando puntos azules. Se determinó la especificidad de tejido de las distintas cepas de *A. tumefaciens* valorando la distribución de los puntos azules en las plantas de *Lemnaceae*. La expresión de GUS en *S. punctata* cocultivada con las cepas de *A. tumefaciens* LBA4404 y C58 se restringía principalmente a las áreas heridas de la fronda madre, mientras que la expresión de GUS en *S. punctata* cocultivada con las cepas de *A. tumefaciens* EHA105, EHA101 y GVE3103 se restringía principalmente a las fronda hijas que surgían del tejido meristemático como se muestra en la Tabla 7, anteriormente.

### Ejemplo 6

*Uso de infiltración a vacío para aumentar la eficacia de transformación de Lemnaceae por Agrobacterium*

Se mantuvieron plantas de *Spirodela punctata* y *Lemna gibba* Hurfeish en medio SP (Tabla 2) en condiciones de crecimiento estándar (procedimiento II). Se cocultivaron plantas intactas con la cepa de *A. tumefaciens* EHA105 que lleva el plásmido Ti pME504 usando el procedimiento estándar de transformación (procedimiento III) con y sin infiltración a vacío (30 mbar, 5-10 minutos). La eficacia de transformación se determinó puntuando la expresión de GUS (puntos azules). Los datos se muestran en la Tabla 8, a continuación.

El método implicó herir las plantas de *Spirodela punctata* var. Helgm y *Lemna gibba* var. Hurfeish, cocultivarlas con  $5 \times 10^8$  bacteria  $\text{ml}^{-1}$  (cepa de *A. tumefaciens* EHA105 que lleva el plásmido Ti pME504) e infiltración a vacío (30 mbar durante 5-10 minutos). Las plantas control se hirieron y cocultivaron como antes pero sin infiltración al vacío. Las plantas se ensayaron para la expresión de GUS 10 días después del cocultivo.

Los datos muestran un aumento en la eficacia de transformación del 61% para *Spirodela* y del 400% para *Lemna* tras la infiltración a vacío.

# ES 2 302 359 T3

TABLA 8

Expresión de GUS (% de frondas)			
	Control	Infiltrada a vacío	% de aumento
<i>Spirodela</i>	18	29	61
<i>Lemna</i>	2	8	400

## Ejemplo 7

Método para aumentar la eficacia de la transformación de *Lemnaceae* por *Agrobacterium* exponiendo las zonas meristemáticas de la fronda madre

Para exponer parcialmente las zonas meristemáticas de las frondas madre de *Lemnaceae* a *Agrobacterium*, las plantas se situaron bajo un microscopio binocular, iluminado desde abajo, y se eliminaron las frondas hijas en crecimiento; por ejemplo, mediante un movimiento de tirón usando unas pinzas. Este procedimiento no tuvo efecto en la viabilidad de las frondas tratadas. Un experimento que implicaba 500 plantas de *Spirodela punctata*, la mitad de las cuales tuvieron sus zonas meristemáticas expuestas mediante eliminación de las frondas hijas, produjo un aumento de la expresión de GUS en zonas meristemáticas del 14% (no tratadas) hasta el 23% (zona meristemática expuesta).

## Ejemplo 8

Método para aumentar la eficacia de la transformación de *Lemnaceae* por *Agrobacterium* mediante disección directa y exposición de las zonas meristemáticas de la fronda madre

Tras la eliminación de las frondas hijas de los bolsillos meristemáticos de la fronda madre, la fronda madre se seccionó longitudinalmente bajo el microscopio binocular para exponer totalmente sus zonas meristemáticas. Se realizó un experimento en el que las frondas hijas se eliminaron de 500 plantas de *Spirodela punctata*. Tras esto, 250 de estas plantas también se seccionaron longitudinalmente. La expresión de GUS se determinó 10 días después del cocultivo con *A. tumefaciens* EHA105 que lleva el plásmido Ti pME504. La expresión de GUS se observó en el 33% de las plantas seccionadas longitudinalmente, comparadas con el 25% en las no seccionadas.

## Ejemplo 9

Método para aumentar la estabilidad de la transformación de *Lemnaceae* por *Agrobacterium* mediante disección directa y exposición de las zonas meristemáticas de la fronda madre

El método implicó el tratamiento de quinientas *Spirodela punctata* como se ha descrito en el ejemplo 8. Para todas las plantas, primero se eliminaron las frondas hija. Además, la mitad de las frondas madre se seccionaron longitudinalmente y se cocultivaron con  $5 \times 10^8$  bacteria  $\text{ml}^{-1}$  de la cepa EHA105 de *A. tumefaciens* que lleva el plásmido Ti pME504. Las plantas se infiltraron al vacío (30 mbar durante 5-10 minutos). Las plantas se ensayaron para la expresión de GUS 5, 10 y 15 días después del cocultivo y se registró su relación filial con la fronda madre seccionada. Los resultados se muestran en la Tabla 9.

TABLA 9

Expresión de GUS (% de frondas)						
Tratamiento	Fronda madre	Generación de fronda hija				
	F <sub>0</sub>	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	F <sub>4</sub>	F <sub>5</sub>
Seccionada longitudinalmente	0	19	5	2	1	0,2
No seccionada	6	15	3	1	0	0,0

Se obtuvo un aumento en la estabilidad de la expresión de GUS transformado meristemáticamente de una generación filial a la siguiente como es evidente de la Tabla 9.

## ES 2 302 359 T3

### Ejemplo 10

#### *Utilización de extractos de Lemnaceae para aumentar la eficacia de transformación*

5 Se mantuvieron plantas de *Spirodela punctata* en medio SP (Tabla 2) en condiciones de crecimiento estándar (procedimiento II). Usando el procedimiento estándar de transformación (procedimiento III), se cocultivaron las plantas con la cepa EHA105 de *A. tumefaciens* que lleva el plásmido Ti pME504. Las plantas se hirieron o se dejaron intactas (no heridas). Después de esto, se cocultivaron con *A. tumefaciens* en medio SP y se suplementaron durante varios períodos de tiempo con un extracto de plantas de *Spirodela*. Se determinó la eficacia de la transformación valorando la expresión de GUS (puntos azules).

10 El método implicó el mantenimiento de 500 *Spirodela punctata* tratadas como se ha descrito en el procedimiento III. De estas 500 plantas, 250 se hirieron. Todas las plantas se colcultivaron con  $5 \times 10^8$  bacteria  $\text{ml}^{-1}$  (cepa de *A. tumefaciens* EHA105 que lleva el plásmido Ti pME504), y se expusieron a un extracto de *Spirodela*. El extracto se preparó mediante homogenización de 20 g de plantas de *Spirodela* de un cultivo de una semana de edad en 50 ml de tampón fosfato (pH 7,0). El homogenado se centrifugó (10 minutos a 10000 rpm) y el sobrenadante se esterilizó por filtración. El extracto de *Spirodela* resultante se aplicó 4 horas durante el cocultivo, o durante este período más los 10 días posteriores. Las plantas controles no se expusieron al extracto. Todas las plantas se ensayaron para la expresión de GUS 10 días después del cocultivo.

20 Los datos resumidos en la Tabla 10 muestran que la presencia del extracto de *Spirodela* aumentó la eficacia de transformación de las plantas no heridas.

TABLA 10

Incubación con el extracto de <i>Spirodela</i> (h)	Expresión de GUS (% de frondas)	
	Heridas	No heridas
0	16	8
4	17	10
240	16	14

### Ejemplo 11

#### *Demostración de la transformabilidad de varias especies de cierto número de géneros de Lemnaceae*

40 Todas las plantas se mantuvieron en medio SP (Tabla 2) en condiciones estándar de crecimiento (procedimiento II). Usando el procedimiento estándar de transformación (procedimiento III), se cocultivaron las plantas con la cepa EHA105 de *A. tumefaciens* que lleva el plásmido Ti pME504. La Tabla 11 resume el porcentaje de plantas de las diferentes especies de *Lemnaceae* que expresan GUS 10 días después del cocultivo. Se determinó la expresión de GUS en las frondas hijas de la  $F_1$  para tres géneros diferentes de *Lemnaceae*: (A) *Spirodela*; (B) *Lemna*; y (C) *Wolffia*, todas inoculadas con la cepa EHA105 de *A. tumefaciens* (pME504).

45 El método implicó herir las plantas, cocultivarlas con  $5 \times 10^8$  bacteria  $\text{ml}^{-1}$  (cepa de *A. tumefaciens* EHA105 que lleva el plásmido Ti pME504), infiltración a vacío (30 mbar durante 5-10 minutos) y después cocultivo adicional durante 30 minutos. Las plantas se ensayaron para la expresión de GUS (tinción azul) 10 días después del cocultivo.

50 Los resultados demuestran la aplicabilidad general del método de la invención para la transformación de *Lemnaceae*.

TABLA 11

Género	Especie	Cepa	% de plantas teñidas
<i>Spirodela</i>	<i>intermedia</i>	7797	3
<i>Spirodela</i>	<i>punctata</i>	8717	92
<i>Spirodela</i>	<i>punctata</i>	Hegelm	27
<i>Lemna</i>	<i>obscura</i>	7325	12
<i>Lemna</i>	<i>obscura</i>	7780	14
<i>Lemna</i>	<i>gibba</i>	Hurfeish	8
<i>Lemna</i>	<i>gibba</i>	G-3	5
<i>Wolffia</i>	<i>brasiliensis</i>	8743	0,1
<i>Wolffia</i>	<i>australiana</i>	8730	9

## ES 2 302 359 T3

### Ejemplo 12

#### *Lemnaceae transformadas que expresan resistencia a antibióticos*

5 Se colocaron plantas de *Spirodela punctata* obtenidas mediante el procedimiento de transformación estándar (procedimiento III) en medio SP (Tabla 2) que contenía kanamicina a 2 µg/ml. En cultivos controles no transformados, las plantas nuevas emergente crecieron blancas en presencia del antibiótico. Sin embargo, tras la transformación y el cultivo en presencia de kanamicina (2 µg/ml durante dos meses), tres de 500 (Experimento 1), y tres de 300 (Experimento 2) plantas que emergían de nuevo fueron verdes y resistentes a los efectos decolorantes del antibiótico. Esto  
10 indicaba que el gen *NPTII* estaba presente y se expresaba en las plantas verdes, resistentes. Se evaluaron las siguientes plantas: un clon resistente a kanamicina 10 generaciones después del inicio del Experimento 2; una colonia sensible a kanamicina (Kn-) con frondas hijas decoloradas, que no se desarrolló más en presencia de kanamicina durante los dos meses del experimento; un control no transformado que muestra una colonia con frondas hijas decoloradas después de 7 días de exposición a kanamicina 2 µg/ml. La tinción de una muestra tomada del clon resistente a kanamicina dos  
15 meses después del inicio del Experimento 2 mostró tinción azul de GUS en más del 80% de las frondas. Los resultados se muestran en la Tabla 12.

El método implicó herir las plantas, colcultivarlas con 5x10<sup>8</sup> bacteria ml<sup>-1</sup> (cepa EHA105 de *A. tumefaciens* que lleva el plásmido Ti pME504) durante 30 minutos e infiltración a vacío (30 mbar durante 5-10 minutos). Las plantas de  
20 *Spirodela punctata* transformadas se hicieron crecer en medio SP (Tabla 2) suplementado con kanamicina a 2 µg/ml durante 2 a 5 semanas. Se ensayaron seis plantas verdes resistentes a kanamicina, y un muestreo de las decoloradas, para la expresión de GUS.

Los datos resumidos en la Tabla 12 indican que las plantas verdes resistentes al antibiótico estaban realmente transformadas.  
25

TABLA 12

Suplemento al medio SP	Expresión de GUS (% de frondas)	
	Plantas verdes	Plantas decoloradas
Kanamicina (2 µg/ml)	83	0
BASTA (2 µg/ml)	76	0

### Ejemplo 13

#### *Lemnaceae transformadas que expresan resistencia a herbicidas*

40 Se cocultivaron quinientas plantas de *Spirodela punctata* 8717 con *A. tumefaciens* EHA105 (pME504), que lleva: el gen *nptIII* que confiere resistencia al antibiótico kanamicina; el gen *bar* que confiere resistencia la herbicida BASTA; y el gen *uid A* (interrumpido por un intrón (Vancanneyt *et al.*, 1990) que codifica para el marcador GUS. Las plantas cocultivadas se hicieron crecer en medio SP (Tabla 2) suplementado con BASTA 2 µg/ml durante 5 semanas. Las  
45 plantas se transfirieron periódicamente a medio fresco suplementado con BASTA cada 2 semanas. En estas condiciones, las plantas control no pudieron crecer y con el tiempo se decoloraron completamente después de 16 días. Treinta y cuatro de 500 plantas cocultivadas con *A. tumefaciens* EHA105 (pME504) fueron resistentes a los efectos decolorantes del herbicida. Esto indica que el gen *bar* estaba presente y se expresaba en estas plantas verdes, que crecían. Se evaluaron las siguientes plantas: plantas verdes de un clon resistente a herbicida; una planta sensible a BASTA, decolorada (BASTA-) que no fue capaz de desarrollar frondas hijas de F<sub>1</sub>; y un control (no transformado controlado que muestra una planta decolorada. Las plantas se evaluaron 16 días después del cocultivo. La tinción de una muestra tomada del clon resistente a BASTA 25 días después del inicio del experimento mostró tinción azul para GUS en más del 75% de las frondas. Los datos se resumen en la Tabla 12. Los resultados indican que las plantas verdes, resistentes a herbicida, seleccionadas repetidamente en medio suplementado con BASTA fresco, estaban de hecho transformadas.  
55

### Ejemplo 14

#### *Lemnaceae transformadas que llevan genes indicadores fluorescentes*

60 Se mantuvieron plantas de *Spirodela punctata* en medio SP (Tabla 2) en condiciones de crecimiento estándar (procedimiento II). Usando el procedimiento estándar de transformación (procedimiento III), se cocultivaron las plantas con *A. tumefaciens* EHA105 (pME506) que lleva, el gen *nptIII* que confiere resistencia al antibiótico kanamicina; el gen *bar* que confiere resistencia la herbicida BASTA; y el gen *luc* que codifica en indicador luciferasa de la luciérnaga LUC. En paralelo, se cocultivaron otras plantas con *A. tumefaciens* EHA105 (pME508) que lleva, el gen *nptIII* que confiere resistencia al antibiótico kanamicina; el gen *bar* que confiere resistencia la herbicida BASTA; y un gen que  
65 codifica para la proteína fluorescente verde (GFP) de *Aequorea victoria*. La expresión de los genes indicadores fluorescentes en las plantas de *Spirodela* se determinó (Millar *et al.*, 1992; Chiu *et al.*, 1996) 10 días después del cocultivo. La expresión de GFP se encontró en toda la fronda, cuando se observó con un aumento de 200 veces.

## ES 2 302 359 T3

### Ejemplo 15

#### *Expresión de múltiples genes exógenos en una planta Lemnaceae transformada*

5 Se cocultivaron plantas de *S. punctata* con *A. tumefaciens* EHA105 (pME504) que lleva, el gen *nptII* que confiere resistencia al antibiótico kanamicina; el gen *bar* que confiere resistencia la herbicida BASTA; y el gen *uidA* (interrumpido por un intrón (Vancanneyt *et al.*, 1990) que codifica para el indicador GUS. Las plantas transformadas se hicieron crecer en medio SP (Tabla 2) en presencia de kanamicina 2 µg/ml o BASTA 2 µg/ml durante 2-5 semanas. Se ensayaron las plantas resistentes verdes, así como una muestra de plantas decoloradas, para la expresión de GUS.  
10 Los resultados, resumidos en la tabla 12, demuestran una alta correlación entre las plantas verdes resistentes a antibiótico o a herbicida, y las plantas que expresan GUS. Esto demuestra la coexpresión de múltiples genes en *Lemnaceae* transformadas.

### 15 Ejemplo 16

#### *Identificación de una cepa de Lemnaceae con alta eficacia de transformación*

20 Los experimentos demostraron una alta frecuencia de tinción de GUS de una población representativa de *Spirodela punctata* 8717 transformada cuatro días después de la transformación. La tasa de transformación para esta cepa usando el procedimiento de transformación estándar (procedimiento III) es > 90%.

### Ejemplo 17

#### 25 *Transformación estable, no quimérica de Lemnaceae*

Se mantuvieron plantas de *Spirodela punctata* 8717 en medio SP (Tabla 2) en condiciones de crecimiento estándar (procedimiento II). Usando el procedimiento estándar de transformación (procedimiento III), se cocultivaron las plantas con *A. tumefaciens* EHA105 (pME504) que lleva, el gen *nptII* que confiere resistencia al antibiótico kanamicina; el gen *bar* que confiere resistencia la herbicida BASTA; y el gen *uidA* (interrumpido por un intrón (Vancanneyt *et al.*, 1990) que codifica para el indicador GUS (Figura 1). La expresión del gen indicador GUS en las plantas transformadas se determinó periódicamente mediante muestreo de la población 4, 10 y 35 días después del cocultivo. Ejemplos representativos muestran más de 7 generaciones sucesivas (unidas por sus estípes) de las plantas transformadas que expresan GUS en todos sus tejidos. Esto indica transformación estable, no quimérica de las plantas *Lemnaceae* enteras durante varias generaciones y un período de tiempo extendido.  
35

### Ejemplo 18

#### 40 *Expresión de GUS plantas Lemnaceae transformadas con un gen uidA sin promotor; lo que indica la integración del ADN exógeno en el cromosoma de Lemnaceae*

Las plantas de *S. punctata* se cocultivaron con *A. tumefaciens* GV3103 (pVCGUS) (Koncz *et al.*, 1989) que contiene una construcción de GUS (el gen *uidA* interrumpido por un intrón) sin promotor. Se evaluaron las plantas transformadas, que expresaban GUS siete días después del cocultivo. La expresión de GUS sin promotor solo es posible si el *uidA* estaba integrado en el cromosoma de la *Lemnaceae* adyacentes a secuencias endógenas reguladoras de *Lemnaceae*. Como resultado de la integración al azar del gen *uidA*, se esperarían variabilidad en la expresión de GUS entre los diferentes sucesos de transformación. Los resultados del experimento muestran 3 intensidades diferentes en la tinción azul de GUS, la más intensa de las cuales es similar a la intensidad fuerte típica encontrada en plantas transformadas bajo el promotor 35S-CaMV.  
50

La Tabla 13 resume los resultados de más 12.000 plantas en 4 experimentos diferentes (cada uno con 3 cepas diferentes de *A. tumefaciens*) que se valoraron para la tinción de GUS 10 días después del cocultivo. Se cocultivaron cuatro mil plantas con *A. tumefaciens* GV3103 que carecía de vector binario (Control). Ninguna se tiñó de azul, indicando que no había actividad GUS endógena. Se cocultivaron cuatro mil plantas con *A. tumefaciens* GV3103 que lleva la construcción sin promotor (pVCGUS). Hasta el 1,4% de las plantas se tiñó de azul, indicando un nivel altamente significativo (frente al control) de integración del gen *uidA* sin promotor en el cromosoma de la *Lemnaceae* adyacente a secuencias endógenas reguladoras de *Lemnaceae*. Se cocultivaron cuatro mil plantas con *A. tumefaciens* GV3103 (pME504), que lleva el gen *uidA* bajo el control del promotor 35S-CaMV. Veintiocho por ciento de las plantas se tiñeron de azul, indicando un nivel relativamente alto de expresión usando este promotor heterólogo.  
60

El método implicó el cocultivo de aproximadamente de 3000 plantas de *Spirodela punctata* (6 g de peso fresco) en cada experimento de transformación (1000 plantas por cada una de las 3 construcciones). Las plantas se valoraron para la expresión de GUS 10 días después del cocultivo. Los resultados se clasificaron según la intensidad del color azul: ligero (+), medio (++) y oscuro (+++).  
65

## ES 2 302 359 T3

Los datos en la Tabla 13 muestran que la variabilidad en intensidad de la tinción de GUS entre las plantas cocultivadas con *A. tumefaciens* GV3103 (pVCGUS) era considerablemente mayor que la de aquellas cocultivadas con *A. tumefaciens* GV3103 (pME504). El porcentaje y la variabilidad relativamente bajos (frente al control) en la intensidad de la tinción de GUS en plantas cocultivadas con la construcción de GUS sin promotor se explican por la integración al azar de este gen en el cromosoma de *S. punctata* y la expresión mediante varios promotores endógenos de *Spirodela*.

TABLA 13

Expresión de GUS (No. de frondas)												
	pVC-GUS				pME504				No plásmido Ti			
	+	++	+++	total	+	++	+++	total	+	++	+++	total
I	7	3	2	12	0	14	231	245	0	0	0	0
II	1	1	3	5	0	10	271	281	0	0	0	0
III	9	5	0	14	0	6	201	206	0	0	0	0
IV	3	1	2	6	0	21	209	230	0	0	0	0
Suma				37				962				0
% (media)				0,9	24				0			

### Ejemplo 19

*Desarrollo de una transformación de Lemnaceae mediada por Agrobacterium, in planta, no quimérica sin regeneración de novo*

Se demostró que era posible desarrollar un sistema nuevo de transformación en *Lemnaceae* que no requiere procedimientos de cultivo de tejido o regeneración *in vitro*. El procedimiento permite dirigir *in planta* directo al meristemo el vehículo de transformación. En este sistema nuevo, se transforma un meristemo y tiene la capacidad de seguir creciendo y de esta manera formar la nueva generación. Además, no se necesita presión selectiva para evitar el crecimiento del tejido no meristemático en la misma planta de *Lemnaceae*. Se pueden ver ejemplos de la validez de esta aproximación en los resultados de los Ejemplos 1, 4, 6 y 10 a 18.

### Ejemplo 20

*Método para el mantenimiento a largo plazo de callos morfogénicos de Spirodela*

Se ha descrito previamente la formación transitoria de callos y el mantenimiento de callos a corto plazo en 2 especies de *Lemna* (Chang y Chiu, 1978a, 1978b). Usando el medio de formación de callos de un de estos autores (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con sacarosa al 3%, 2IP 1 mg/ml, y 2,4-D 10 mg/ml, se obtuvieron callos de *Spirodela punctata* pero el desarrollo del callo se paraba en los 14 a 21 días. Durante este período, se observó en el callo una dramática acumulación de almidón (medido como aumento en el material teñido con yodo). Estos callos se decoloraban y, con el tiempo morían, debido aparentemente a envenenamiento por almidón. El mantenimiento a largo plazo es un prerrequisito para la transformación a nivel del callo ya que los pasos de cribado y/o selección son necesarios.

Se buscaron las condiciones para el mantenimiento a largo plazo de los callos de *Spirodela*. Se estudiaron varios medios (medio MS (Tabla 1), B-5 (Tabla 5), y concentraciones de sacarosa (3,0, 1,0, 0,5%) diferentes en combinación con varias fitohormonas (2IP; 2,4-D; Dicamba; BA; Zeatina). Se encontró que el medio B-5 suplementado con una concentración baja (1,0%) de sacarosa era el mejor para promover el mantenimiento a largo plazo de los callos de *Spirodela* con varias combinaciones de hormonas. Los datos en las Tablas 14, 15 y 16 resumen el porcentaje de la formación y mantenimiento a largo plazo de callos con varias combinaciones de hormonas. El método final para la formación y mantenimiento a largo plazo de callos morfogénicos de *Spirodela* se da en el procedimiento VII. Exige únicamente una concentración baja de sacarosa combinada con combinaciones hormonales particulares. Usando este procedimiento, se mantuvieron callos verdes, en crecimiento durante más de tres meses.

El método implicó cultivar frondas de *Spirodela punctata* var. Helgm en medio B-5 suplementado con sacarosa al 1% y varias concentraciones de 2IP y 2,4-D como se indica. La formación de callos se evaluó después de 8 semanas usando un microscopio de disección. Los callos se subcultivaron en medio fresco cada 4 semanas. Los resultados se muestran en la Tabla 14:

## ES 2 302 359 T3

TABLA 14

2 IP (mg/ml)	2,4-D (mg/ml)	Formación de callo <sup>a</sup> No. (%)	Mantenimiento a largo plazo <sup>b</sup> No. (%)
2	2	5 (10)	0 (0)
2	10	134 (90)	48 (34)
2	50	3 (15)	0 (0)
10	2	2 (6)	0 (0)
10	10	4 (10)	0 (0)
10	50	0 (0)	0 (0)

<sup>a</sup> Datos valorados después de 8 semanas de cultivo  
<sup>b</sup> Datos valorados después de 12 semanas de cultivo

En otro experimento las frondas de *Spirodela punctata* separadas se cultivaron en medio B-5 suplementado con sacarosa al 1% y varias concentraciones de BA y Dicamba como se indica. La formación de callos se evaluó después de 3 semanas usando un microscopio de disección. Los callos se subcultivaron en medio fresco cada 3 semanas. Los resultados se muestran en la Tabla 15:

TABLA 15

BA (mg/ml)	Dicamba (mg/ml)	Formación de callo <sup>a</sup> No. (%)	Mantenimiento a largo plazo <sup>b</sup> No. (%)
2	2	0 (0)	0 (0)
2	10	13 (23)	0 (0)
2	50	175 (100)	151 (86)
10	2	0 (0)	0 (0)
10	10	0 (0)	0 (0)
10	50	0 (0)	0 (0)

<sup>a</sup> Datos valorados después de 3 semanas de cultivo  
<sup>b</sup> Datos valorados después de 6 semanas de cultivo

En otro experimento las frondas de *Spirodela punctata* separadas se cultivaron en medio B-5 suplementado con sacarosa al 1% y varias concentraciones de zeatina y Dicamba como se indica. La formación de callos se evaluó después de 3 semanas usando un microscopio de disección. Los callos se subcultivaron en medio fresco cada 3 semanas. Los resultados se muestran en la Tabla 16:

TABLA 16

Zeatina (mg/ml)	Dicamba (mg/ml)	Formación de callo <sup>a</sup> No. (%)	Mantenimiento a largo plazo <sup>b</sup> No. (%)
2	2	0 (0)	0 (0)
2	10	0 (0)	0 (0)
2	50	10 (80)	7 (70)
10	2	0 (0)	0 (0)
10	10	0 (0)	0 (0)
10	50	13 (76)	6 (46)

<sup>a</sup> Datos valorados después de 3 semanas de cultivo  
<sup>b</sup> Datos valorados después de 6 semanas de cultivo

### Ejemplo 21

#### Método para producir callos de *Spirodela* altamente regenerativos

El único método para la producción de callos de *Spirodela* se describe en el procedimiento VII. Usando este procedimiento junto con el procedimiento VIII, se obtuvieron eficientemente plantas de *S. punctata* regeneradas (Tabla 17 a continuación). La combinación de dos procedimientos representa el método para producir callos de *Spirodela* altamente regenerativos.

## ES 2 302 359 T3

Los callos de *Spirodela punctata* var. Helgm, mantenidos durante 7 a 16 semanas en medio B-5 suplementado con sacarosa al 1%, 2IP 2 mg/ml y 2,4-D 10 mg/ml, se transfirieron a medio B-5 suplementado con sacarosa al 1% y diferentes concentraciones de 2IP. Las plantas regeneradas se puntuaron visualmente después de 2 semanas

5

TABLA 17

	2 IP	Callos	Callos en regeneración	
	(mg/ml)	No.	No.	(%)
10	0	30	26	87
	2	30	22	73
15	10	30	0	0

### Ejemplo 22

20 *Método para una regeneración rápida y altamente eficaz de plantas de Lemnaceae a partir de callos*

Se ha descrito la regeneración de estructuras similares a frondas a partir de callos de *Lemna perpusilla*; sin embargo, los autores afirman que no observaron más desarrollo de estas estructuras similares a frondas incluso después de 2 meses (Chang y Hsing, 1978). En un estudio adicional, se describió la regeneración de plantas a partir de callos de *Lemna gibba* (Chang y Chiu, 1978). Sin embargo, el procedimiento requirió dos meses para obtener una planta de propagación asexual (Chang y Chiu, 1978). La regeneración de plantas de *Spirodela* a partir de callos no se ha descrito nunca. Usando la metodología nueva de la invención para la regeneración de plantas, se obtuvieron plantas de *S. punctata* intactas, regeneradas de forma eficaz en 1-2 semanas. El método rápido único para la regeneración de plantas de *Lemnaceae* se da en el procedimiento VIII.

### 30 Ejemplo 23

*Método para la regeneración rápida y altamente eficaz de plantas de Spirodela de tipos verdaderos a partir de callos*

35 Usando la metodología para la regeneración de plantas (procedimiento VIII), > 90% de las plantas de *S. punctata* regeneradas aparecían visualmente de tipos verdaderos después de 3 semanas de crecimiento en medio SP. Las plantas de *S. punctata*, vistas después de 3 meses de crecimiento en condiciones estándar, seguían apareciendo de tipo verdadero. Cuando se compararon con el progenitor parental con respecto a la velocidad de crecimiento, tamaño y morfología de las frondas no se encontraron diferencias significativas.

### 40 Ejemplo 24

*Método para aumentar la diversidad genética mediante callos en plantas de Spirodela en regeneración*

45 La capacidad de aumentar la diversidad genética en *Spirodela* es importante ya que en varias especies, la propagación es estrictamente vegetativa (Landolt y Kandeler, 1987). Usando la metodología para la regeneración de plantas (procedimiento VIII), varias plantas regeneradas parecían visualmente aberrantes y después de 3 semanas de crecimiento en condiciones estándar, seguían pareciendo aberrantes. Cuando se compararon con el progenitor parental, se encontraron diferencias significativas en tamaño (más pequeñas), velocidad de crecimiento (más lenta) y morfología (forma de la fronda).

### 50 Ejemplo 25

*Transformación de callos de Lemnaceae por Agrobacterium*

55 Los callos de *Spirodela* se mantuvieron en medio B-5 (Tabla 6) suplementado con sacarosa la 1%, 2IP 2 mg/ml y 2,4-D 10 mg/ml. Se cocultivaron quinientos callos con *Agrobacterium* que llevaba el plásmido pME504. Después de 2 días de cocultivo, los callos se transfirieron a medio fresco suplementado con kanamicina 30 mg/l y carbenicilina 300 mg/ml. Después de 15 días, 488 callos estaban completamente decolorados. Los restantes 12 callos verdes se transfirieron a medio fresco suplementado con kanamicina 30 mg/l. Tres callos se mantuvieron verdes tras dos subcultivos adicionales (2 meses) en medio fresco que contenía kanamicina como anteriormente. Se evaluaron los callos verdes que se mantuvieron durante más de dos meses en medio B-5 suplementado con sacarosa la 1%, 2IP 2 mg/ml, 2,4-D 10 mg/ml y kanamicina 30 mg/l. Los resultados indican que los callos persistentes, verdes eran resistentes a kanamicina como resultado de la expresión de los genes introducidos.

65

## Ejemplo 26

*Producción de callos transgénicos a partir de plantas Lemnaceae intactas por Agrobacterium*

5 Se mantuvieron plantas de *Spirodela punctata* en medio SP en condiciones de crecimiento estándar (Tabla 2). Usando el procedimiento estándar de transformación (procedimiento III), se cocultivaron las plantas con la cepa EHA105 de *A. tumefaciens* que lleva el plásmido Ti pME504. Dos días después de la transformación las plantas intactas se cultivaron en medio B-5 suplementado con Dicamba 10 mg/l, BA 2 mg/l y kanamicina 30 mg/l (procedimiento VII). Se desarrollaron dos callos verdes, compactos resistentes a kanamicina a partir de las regiones meristemáticas después de 25 días. Los callos verdes en crecimiento se seccionaron del tejido original y se subcultivaron más en medio fresco que contenía kanamicina 30 mg/l durante 20 días adicionales. Después de esta transferencia también, los dos callos se mantuvieron verdes. Los resultados indican que los callos persistentes verdes eran resistentes a kanamicina como resultado de los genes introducidos.

## 15 Ejemplo 27

*Regeneración de plantas Lemnaceae transgénicas partir de callos transformados por Agrobacterium*

20 Se mantuvieron plantas de *Spirodela punctata* 8717 en medio SP en condiciones de crecimiento estándar (Tabla 2). Usando el procedimiento estándar de transformación (procedimiento III), se cocultivaron las plantas con la cepa EHA105 de *A. tumefaciens* que lleva el plásmido Ti pME504. Dos días después de la transformación, las plantas intactas se cultivaron en medio B-5 suplementado con Dicamba 10 mg/l, BA 2 mg/l y kanamicina 30 mg/l (procedimiento VII). Se desarrollaron diez callos resistentes a kanamicina a partir de las regiones meristemáticas después de 25 días. Los callos verdes se transfirieron a medio B-5 suplementado con sacarosa al 1%, 2IP 2 mg/l y kanamicina 30 mg/l. Se vio una planta verde en regeneración después de dos semanas. Esta planta se transfirió al mismo medio aproximadamente cada 2 semanas durante un período de 8 meses, dando lugar a numerosos descendientes vegetativos resistentes a kanamicina, designados de aquí en adelante como clon ME11. El clon ME11 se ha propagado como verde y resistente a kanamicina en el medio anterior durante más de 65 generaciones.

30 Se ha demostrado la capacidad de obtener callos resistentes a kanamicina mediante la producción de callos transgénicos a partir de plantas *Lemnaceae* infectadas con *Agrobacterium* (Ejemplo 25), o mediante la producción de callos transgénicos a partir de callos de *Lemnaceae* infectados con *Agrobacterium* (Ejemplo 26). Puesto que se pueden producir callos resistentes a kanamicina y se pueden regenerar plantas *Lemnaceae* de tipo verdadero de forma eficaz y fácil a partir de callos (procedimiento VIII), se ha demostrado la tecnología para producir plantas *Lemnaceae* transformadas que se originan a partir de callos resistentes a antibióticos.

## Ejemplo 28

*Verificación de la expresión y estabilidad a largo plazo del carácter introducido*

40 Se mantuvieron plantas de *Spirodela punctata* 8717 en medio SP en condiciones de crecimiento estándar (Tabla 2). Se propagó el clon ME11, transformado como en el ejemplo 27, como verde y resistente a kanamicina en medio SP suplementado con kanamicina 2 mg/l durante aproximadamente 40 generaciones. Para verificar la expresión y estabilidad a largo plazo de los caracteres introducidos, el clon ME11 se subcultivó en el mismo medio que carecía de kanamicina durante aproximadamente 60 generaciones. Se evaluó entonces el clon ME11 para resistencia a kanamicina o a BASTA mediante subcultivo en medio SP suplementado con kanamicina 2 mg/l o con BASTA 1,5 mg/l con o sin sacarosa al 1% durante 5-10 generaciones.

50 Las plantas de *Spirodela punctata* 8717 controles, no transformadas se decoloraron y finalmente murieron. Las plantas del clon ME11 permanecieron verdes y mantuvieron su crecimiento normal.

Estos resultados demuestran la expresión estable de la resistencia a kanamicina en plantas ME11 a pesar de la eliminación de la presión de selección durante más de 60 generaciones. También demuestran la expresión estable de la resistencia a BASTA a pesar de la falta de cualquier presión de selección para este carácter.

55

**Referencias**

60 **Armitage, P, Walden, R., y Draper, J. (1992).** Vectors for transformation of higher plants. En: Walden (ed.), Plant Genetic Transformation and Gene Expression, *Blackwell Sci. Pub.*, Oxford, pp 1-67)

**Aviv, D. y Galun E. (1984).** The feeder layer technique. En Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol. 1 (*Academic Press*, Nueva York), pp. 199-203.

65 **Blumenthal, A., Kahn, K., Beja, O., Galun, E., Colombini, M. y Breiman, A. (1993).** Purification and characterization of the voltage-dependent anion-selective channel (VDAC) protein from wheat mitochondrial membranes. *Plant Physiol.*, 101: 579-587.

## ES 2 302 359 T3

- Chang** W.C. y **Chiu** P.L. (1978) Regeneration of *Lemna gibba* G3 through callus culture. *Z. Pflanzenphysiol. Bd* 89: 91-94.
- Chang**, W.C. y **Hsing**, Y.I. (1978). Callus formation and regeneration of frond-like structures in *Lemna perpusilla* 6746 on a defined medium. *Plant Science Lett.* 13: 133-136.
- Chiu** W., **Niwa**, Y., **Zeng**, W., **Hirano**, T., **Kobayashi**, H., y **Sheen**, J. (1996) Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Current Biol.*, 6: 325-330.
- Christenses et al.** (1996) *Transgenic Res.*, 5: 213.
- Culley**, D.D. Jr., **Rejmankova** E, **Kvet**, J., y **Frye** J.B. (1981), Production, chemical quality and use of *Lemnaceae* in aquaculture, waste management and animal feeds, *J. World Maricul. Soc.*, 12: 27-49.
- Deblaere**, R., **Bytebier**, B., **De Greve**, H., **Deboeck**, F., **Schell**, J., **Montagu** M. **Van y Leemans**, J. (1985). Efficient octopine Ti-plasmid-derived vectors from *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucl. Acid Res.*, 13: 4777-4788.
- Eckes**, P., **Rosahl**, S., **Schell**, J., y **Willmitzer**, L. (1986). Isolation and characterization of a light-inducible, organ-specific gene from potato and the analysis of its expression after tagging and transfer into tobacco and potato shoots. *Mol. Gen. Genet.* 199: 216-224.
- Hood**, E.E., **Fraley**, R.T., **Chilton**, M.D. (1987). Virulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 on legumes. *Plant Physiol.*, 83: 529-534.
- Jefferson** R.A. (1987). Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 5: 387-405.
- Koncz**, C., **Martini**, **Mayerhofer**, R., **Koncz-Kalman**, Z., **Korber**, H., **Redei** G.P. y **Schell**, J. (1989). High frequency T-DNA mediated gene tagging in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 86: 8467-8471.
- Landolt**, E., The family of *Lemnaceae* - a monographic study. Vol. 1, Veroff, Geoboy. Inst. ETH, *Stiftung Rubel*, Zurich, pp. 274.
- Landolt**, E., y **Kandeler**, R. (1987). The family of *Lemnaceae* - a monographic study: Vol. 2, Veroff, Geoboy. Inst. ETH, *Stiftung Rubel*, Zurich, pp. 638.
- Li**, X., **Liu**, C., **Ritchie**, S.W., **Peng**, J., **Gelvin**, S.B. y **Hodges**, T.K. (1992). Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transient expression of *gusA* in rice. *Plant Mol. Biol.*, 20: 1037-1048.
- Miele**, L. (1997), Plants as bioreactors for diopharmaceuticals: regulatory considerations: *Trends in biotech.*, 15: 45-50.
- Millar**, A.J., **Sjhort**, S.R., **Hiratsuka**, K., **Chua**, N.H., y **Kay**, S.A. Firefly luciferase as a reporter of regulated gene expression in higher plants. *Plat. Mol. Biol. Rep.*, 10: 324-337, 1992.
- Murashige** T. y **Skoog**, F, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Ngo** V (1987), Boosting pond performance with aquaculture. *Operations Forum* 4:20-23.
- Okubara**, P.A., **Williams**, S.A., **Doxsee** R.A. y **Tobin** E.M. (1993). Analysis of genes negatively regulated by phytochrome action in *Lemna gibba* and identification of a promoter region required for phytochrome responsiveness. *Plant Physiol.*, 101:915-924.
- Ooms**, G., **Hooykaas**, P.J.J., **Ven** R.J.M. van, **Bleelen**, P. van, **Regensburg-Tuink**, T.J.G., y **Schilperoort**, R. A. (1982). Octopine Ti-plasmid deletion of *Agrobacterium tumefaciens* with emphasis on the right side of the T-region. *Plasmid*, 7: 15-29.
- Pen**, J., **Molendijk**, L., **Quax**, W.J., **Sijmons**, P.C., **Van Ooyen**, A.J.J., **Van den Elzen**, P.J.M., **Rietveld**, K. y **Koekema**, A. (1992). Production of active *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -amylase in tobacco and its application in starch liquefaction, *Bio/Technology*, 10: 292-296.
- Porath**, D., **Hepher**, B. y **Koton** A. (1979), Duckweeds as an aquatic crops: evaluation of clones for aquaculture *Aquatic Bot.*, 7:273-278.
- Posner**, H.B. (1967) en *Methods in Developmental Biology*, Eds. Witt F.A. y Wessels N.K. (Crowell, Nueva York), pp. 301-317

## ES 2 302 359 T3

**Thompson, C.J., Movva, N., Tizard, R., Crameri, R., Davies, J.E., Lauwereys y Botterman, J. (1987).** Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygrosopicus*, *EMBO J.*, 9:2519-2523.

5 **Vancanney G., Schmidt, R., O'Connor-Sánchez, A., Willmitzer, L., y Rocha-Sosa, M. (1990),** Construction of an intron-containing marker gene: Splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Mol. Gen. Genet.*, 220:245-250.

10 **VanLarebeke, N., Engler, G., Holstters, M, Van den Elscker, S., Zaenen, I., Schilperoort, R.A. y Schell, J. (1994).** Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. *Nature*, 252: 169-170.

**Weising et al. (1988) *Ann. Rev. Genet.*, 22: 241.**

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un método para la transformación genética estable de plantas enteras, tejido vegetal o callos de *Lemnaceae*, que comprende:

- (i) poner en contacto la planta entera, tejido vegetal o callo de *Lemnaceae* con células de *Agrobacterium* que contienen un molécula de ADN transformante; e
- (ii) incubar la planta entera, tejido vegetal o callo de *Lemnaceae* con las células de *Agrobacterium*, por lo que las células en dicha planta entera, tejido vegetal o callo de vuelven establemente transformadas con dicho ADN,

en donde las células de *Agrobacterium* se ponen en contacto, antes de o durante el método de transformación, con un medio potenciador que aumenta la virulencia de las células de *Agrobacterium*, comprendiendo dicho medio potenciador una suspensión de células frescas de plantas dicotiledóneas o comprendiendo extracto de planta *Lemnaceae*, y comprendiendo además cafeína a una concentración de 100-500 mg por litro de medio.

2. El método según la reivindicación 1, en donde el medio potenciador comprende una suspensión de células frescas obtenidas de una planta dicotiledónea.

3. El método según la reivindicación 2, en donde la suspensión de células frescas está a una concentración del 1-10% (peso/volumen).

4. El método según la reivindicación 2 ó 3, en donde la suspensión de células frescas de una planta dicotiledónea se obtiene de la familia de *Solanaceae*.

5. El método según la reivindicación 1, en donde el medio potenciador es un medio de cultivo de plantas que tiene un pH de alrededor de 3,5 a 4,2, y comprende del 1-10% (peso/volumen) de una suspensión de células frescas de *Nicotiana tabacum* y cafeína a una concentración de 100-500 mg por litro de medio.

6. Un método para la transformación genética estable de plantas enteras, tejidos vegetales o callos de *Lemnaceae*, que comprende:

- (i) poner en contacto la planta entera, tejido vegetal o callo de *Lemnaceae* con células de *Agrobacterium* que contienen un molécula de ADN transformante; e
- (ii) incubar la planta entera, tejido vegetal o callo de *Lemnaceae* con las células de *Agrobacterium*, por lo que las células en dicha planta entera, tejido vegetal o callo de vuelven establemente transformadas con dicho ADN,

en donde las células de *Agrobacterium* se ponen en contacto, antes de o durante el método de transformación, con un medio potenciador que aumenta la virulencia de las células de *Agrobacterium*, siendo dicho medio potenciador un extracto de plantas de *Lemnaceae*.

7. El método según la reivindicación 1 ó 6, en donde el extracto de plantas de *Lemnaceae* es un extracto de *Spirodela punctata*.

8. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la planta entera, tejido vegetal o callo de *Lemnaceae* es del género *Spirodela*, *Lemna* o *Wolffia*.

9. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde las células de *Agrobacterium* están específicamente dirigidas al tejido meristemático de la planta.

10. El método según la reivindicación 9, en donde las células de *Agrobacterium* son las cepas EHA105, EHA101 o GVE3103 de *A. tumefaciens*.

11. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde las células de *Agrobacterium* están dirigidas a regiones heridas en la planta.

12. El método según la reivindicación 11, en donde *Agrobacterium* es la cepa LBA4404 o C58 de *A. tumefaciens*.

13. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde, durante la incubación del tejido vegetal de *Lemnaceae* con las células de *Agrobacterium*, se aplica infiltración a vacío.

14. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde, antes de la incubación del tejido vegetal de *Lemnaceae* con las células de *Agrobacterium*, se expone la zona meristemática de la planta mediante eliminación de las frondas hijas.

## ES 2 302 359 T3

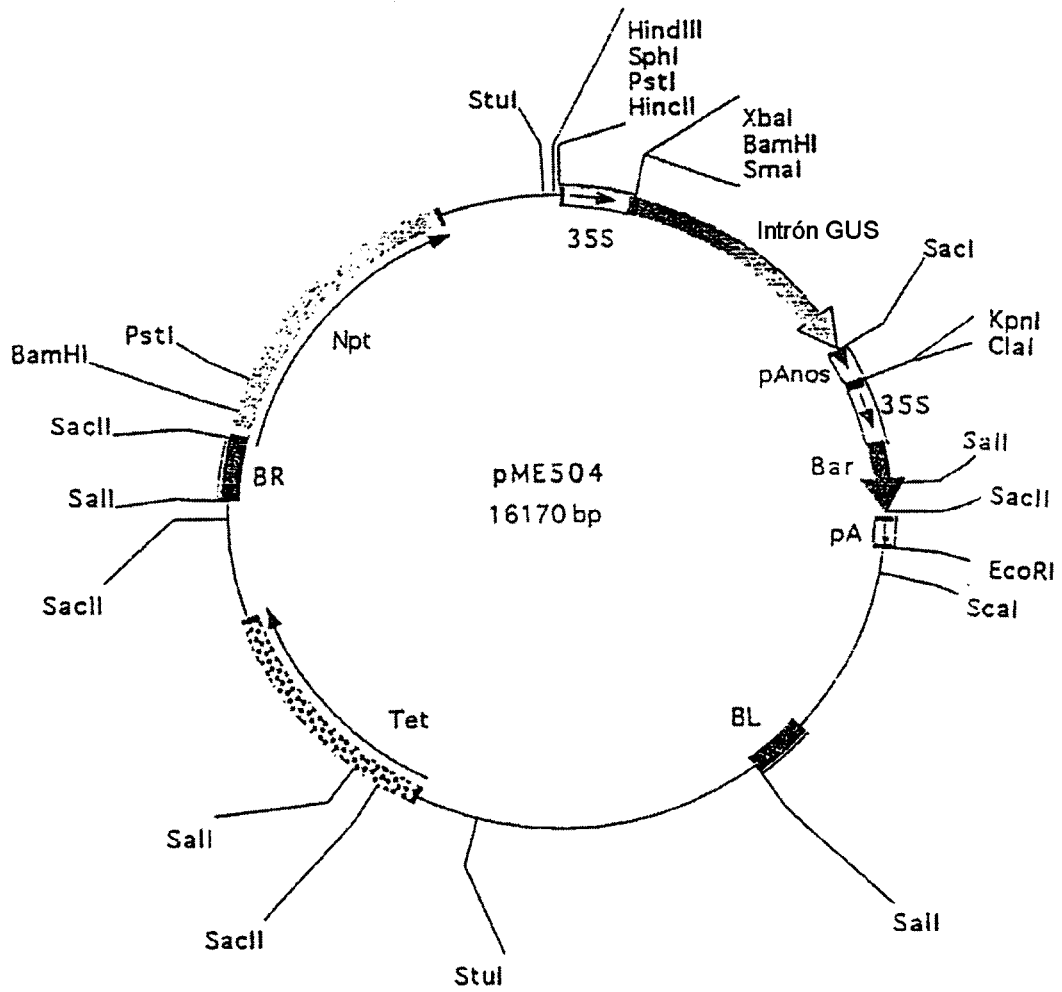
15. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde el proceso de transformación tiene lugar en un medio que tiene un pH por debajo de alrededor de 5,2.

16. Un método para la transformación genética de un planta *Lemnaceae*, que comprende

- (i) cortar la planta en partículas de un tamaño tal que todavía contienen tejido meristemático no dañado capaz de desarrollarse en plantas enteras;
- (ii) incubar dichas partículas con células de *Agrobacterium* que contienen moléculas de ADN transformante, por lo que dicho ADN transformante se introduce en las células meristemáticas en dichas partículas; y
- (iii) producir plantas transformadas a partir del tejido meristemático transformado.

17. El método según la reivindicación 16, en donde las partículas tienen diámetros, la media de los cuales está por encima de 150  $\mu\text{m}$ .

18. El método según la reivindicación 17, en donde las partículas tienen diámetros, la media de los cuales es alrededor de 150  $\mu\text{m}$  hasta alrededor de 750  $\mu\text{m}$ .



**Figura 1**