



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 299 285**

② Número de solicitud: 200402854

⑤ Int. Cl.:  
**C12N 15/82** (2006.01)  
**C12N 5/14** (2006.01)  
**A01H 5/00** (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

② Fecha de presentación: **26.11.2004**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **16.05.2008**

Fecha de la concesión: **25.11.2009**

Fecha de modificación de las reivindicaciones:  
**24.11.2009**

④ Fecha de anuncio de la concesión: **07.12.2009**

④ Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**07.12.2009**

⑦ Titular/es: **Universidad de Vigo  
c/ Oporto, 1  
36200 Vigo, Pontevedra, ES**

⑦ Inventor/es: **Gallego Veigas, Pedro Pablo;  
Rodríguez Díaz, Ruth;  
Torre Noya, Francisco Luis de la y  
Villar López, Beatriz**

⑦ Agente:  
**Gómez-Acebo y Duque de Estrada, Ignacio**

⑤ Título: **Procedimiento para transformar material vegetal procedente de árboles adultos.**

⑤ Resumen:

Procedimiento para transformar material vegetal procedente de árboles adultos.

El procedimiento comprende transformar material vegetal, mediante transformación con *Agrobacterium* asistida por sonicación (SAAT), y se caracteriza porque dicho material vegetal es un explante, procedente de un árbol adulto, que comprende, al menos dos hojas y una yema axilar o apical, que se somete a un tratamiento de reactivación previo al SAAT y, posteriormente, el material vegetal reactivado se somete a un tratamiento consistente en una combinación de ultrasonidos e infiltración a vacío. De aplicación en el campo de la mejora vegetal, permite transformar especies consideradas recalcitrantes a la transformación (*Eucalyptus* sp.).

ES 2 299 285 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 40.2.8 LP.

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para transformar material vegetal procedente de árboles adultos.

5 **Campo de la invención**

La invención se relaciona, en general, con un procedimiento para transformar material vegetal procedente de árboles adultos, basado en la transformación con *Agrobacterium* asistida por sonicación (SAAT). Dicho procedimiento tiene su aplicación en el campo de la mejora vegetal, pudiendo transformar especies que originalmente se consideraban recalcitrantes a la transformación, tales como *Eucalyptus* sp.

**Antecedentes de la invención**

Los productos obtenidos a partir de los bosques serán, con toda probabilidad, más requeridos en el futuro. No hay duda del valor ecológico de los bosques naturales y la necesidad de preservarlos. Sin embargo, esta preocupación ecológica tiene que equilibrarse con los requerimientos de la población y la industria, que han ido creciendo a un ritmo uniforme y probablemente lo continuarán haciendo en el futuro. En este contexto, un incremento en la productividad de árboles de interés industrial haría posible la coexistencia de plantaciones productivas y los bosques naturales, ecológicamente valiosos. Lamentablemente, la mejora de especies arbóreas por cruzamientos se ve seriamente perjudicada por los largos ciclos reproductivos y el largo período de inmadurez de estas especies. Por todo ello, la aplicación de los protocolos de transformación basados en *Agrobacterium* para transformar especies forestales aparece como una herramienta con un enorme potencial.

*Eucalyptus* sp. es un género de gran importancia industrial, con grandes extensiones en Sudamérica, Asia, Australia, y más de un millón de hectáreas en el Sur de Europa. Este género presenta multitud de características deseables: destaca entre ellas (i) su rápido crecimiento (100 m<sup>3</sup>/ha/año en condiciones óptimas), pero también (ii) soporta rotaciones cortas y (iii) puede crecer en suelos pobres. Entre las setecientas especies de este género, *E. globulus* es una de las más importantes en lo que se refiere a aplicaciones industriales. Una de ellas es la obtención de pulpa de papel, ya que su madera presenta unas características químicas deseables: como el alto contenido en celulosa y el bajo contenido en lignina, lo que provoca un gran rendimiento en el proceso de obtención de pulpa "Kraft". En conjunto, estas cualidades hacen a esta especie una buena candidata para programas de mejora basados en la biotecnología. Por otro lado, sería deseable la mejora de otras muchas características: tolerancia al frío, crecimiento mejorado, etc. Más concretamente, uno de los rasgos cuya modificación resultaría más beneficiosa para la industria de papel es el contenido en lignina. El procesamiento de la madera para separar la celulosa de la lignina requiere el uso de productos químicos caros y perjudiciales para el medio ambiente. Las mejoras que se pueden introducir en este proceso pueden venir por dos vías: (i) reduciendo la cantidad total de lignina presente en la madera y/o (ii) alterando el perfil químico de las ligninas presentes para facilitar su extracción.

La ruta biosintética de las ligninas es compleja y variable, y todavía no está completamente definida. Sin embargo, varios genes de interés para la biotecnología se han caracterizado en la pasada década, como por ejemplo los genes que codifican la cinamil-alcohol-deshidrogenasa (CAD) y la cinamil-CoA-reductasa (CCR). Se ha demostrado, además, que estos genes son buenos candidatos para la modificación de ligninas en diferentes especies.

Hasta la fecha, la "domesticación" de *Eucalyptus* sp. ha consistido en el uso masivo de la propagación vegetativa de árboles elite mediante cultivo *in vitro*. Consecuentemente, la modificación genética será una herramienta valiosa si se dispone de un método de transformación eficiente. Aunque en años recientes ha habido avances significativos, la transformación del eucalipto es todavía un proceso laborioso y difícil. Además, la proporción de transformantes obtenidos es todavía demasiado baja. Se han obtenido callos con presencia del gen reportero GUS mediante biobalística, y se han transformado plántulas de *E. globulus* con bombardeo de partículas y, aunque la transformación mediante biobalística presenta la ventaja de ser menos dependiente del genotipo, con la transformación mediante *Agrobacterium* se obtiene una mayor proporción de inserciones con sólo una copia en un locus, lo que sin duda es más deseable a la hora de controlar las modificaciones genéticas.

Los beneficios de la sonicación en la transformación se han puesto de relieve en el artículo de González *et al.*, 2002, aunque no se especifican los tiempos empleados. En ese artículo se menciona que el porcentaje de positivos obtenidos ronda el 20% cuando se emplea material juvenil (17 días tras la germinación). En brotes apicales de girasol, aplicando tiempos cortos de sonicación, se consiguió aumentar la expresión transitoria de GUS pero no se observó efecto en la expresión estable (Weber *et al.*, 2003). Con tiempos más prolongados (45 s) se consiguió mejorar significativamente la transformación en embriones zigóticos de pino (Tang, 2003).

La dificultad de transformar material vegetal adulto en la mejora vegetal origina la necesidad de llevar a cabo dicha mejora en material juvenil, material que, en muchas ocasiones, no ha sido probado en el campo y, por tanto, su respuesta a las condiciones de estrés es desconocida. Un procedimiento que permitiera transformar material vegetal adulto procedente de árboles cuya respuesta a las condiciones ambientales ya hubieran sido probadas en el campo resultaría, por tanto, de gran interés.

## Compendio de la invención

El objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento para la transformación de material vegetal procedente de árboles adultos que subsane la totalidad o parte de los inconvenientes asociados con los procedimientos pertenecientes al estado de la técnica.

Los inventores han observado que la aplicación de ultrasonidos e infiltración a vacío durante el proceso de transformación con *Agrobacterium* de unos explantes previamente reactivados, mediante incubación en un medio apropiado antes de su transformación, incrementa de forma significativa la eficacia de transformación de los explantes y rinde un porcentaje de transformación muy elevado.

Un procedimiento como el proporcionado por esta invención permite la transformación genética simple, eficiente, reproducible, independiente del genotipo y con costes reducidos para árboles adultos debido a la elevada eficacia de transformación de los explantes y a la fácil reproducción del procedimiento. Asimismo, aumenta la estabilidad y control de la inserción de la secuencia nucleotídica de interés.

Por tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para transformar material vegetal, mediante transformación con *Agrobacterium* asistida por sonicación (SAAT), en el que dicho material vegetal es un explante procedente de un árbol adulto que comprende al menos, dos hojas y una yema axilar o apical, que se somete a un tratamiento de reactivación previo a la SAAT, y posterior transformación con *Agrobacterium* con ayuda de ultrasonidos e infiltración a vacío en condiciones definidas para facilitar la transformación mediada por *Agrobacterium*.

La mejora de las propiedades agronómicas de la especie vegetal puede ir dirigida a tejidos específicos de la planta. Por tanto, la cepa de *Agrobacterium* empleada en la transformación vegetal puede contener un plásmido que comprende un promotor específico de tejido funcional en plantas, operativamente unido a una secuencia de nucleótidos de interés, o, alternativamente, un plásmido que comprende un promotor de expresión ubicuo funcional en plantas, operativamente unido a una secuencia de nucleótidos de interés.

Tras la aplicación del procedimiento de transformación proporcionado por esta invención, se obtiene un material vegetal transformado que, tras un periodo de regeneración en condiciones apropiadas, da lugar a una planta que incorpora la característica deseable.

La regeneración de la planta a partir del material vegetal transformado, constituye una realización particular del procedimiento proporcionado por esta invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un material vegetal transformado mediante el procedimiento proporcionado por esta invención y a una planta procedente de la regeneración de dicho material vegetal transformado según el procedimiento objeto de esta invención.

## Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es un diagrama de barras que muestra la actividad glucuronidasa de 40 explantes de *Eucalyptus* sp. transformados mediante SAAT, en orden decreciente. Los explantes enteros fueron homogeneizados y se añadió 4-metilumbeliferil-glucuronido para medir la liberación de 4-metilumbeliferona tras dos horas mediante fluorimetría. (C, dos explantes de control).

La Figura 2 es una fotografía que muestra los resultados de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) realizada para amplificar fragmentos de los genes *NPTII* (a), *UIDA* (b) y *VIRD2* (c). Carriles 1-10: explantes de ADN transformados. Carril 11: sin ADN. Carril 12: explante no transformado. Carril 13: ADN extraído de *Agrobacterium* con el plásmido p35SGUS int. Carril 14: marcador de peso molecular.

La Figura 3 muestra los resultados de un Southern blot realizado con una sonda basada en la secuencia del gen *NPTII*. Los explantes se recogieron después de la transformación y la selección en medio con kanamicina. 1, marcador de peso molecular marcado con digoxigenina. 2, explante blanco (con pérdida de clorofila). 3, explante transformado (con clorofila). 4, explante necrótico. 5, explante sin transformar. 6, ADN extraído de *Agrobacterium* que contiene el plásmido p35SGUS int; 7, hibridación de la sonda consigo misma.

La Figura 4 es una fotografía que muestra actividad GUS tal y como se pone de manifiesto por la coloración azul en material transformado genéticamente, proveniente de *E. globulus*. El éxito de la transformación fue evidente cuando se examinaron con lupa explantes completos: (A-C), varios explantes transformados con GUS bajo el promotor CaMV35S. Cuando se examinó la expresión en profundidad, se comprobó una fuerte expresión de GUS bajo el promotor CaMV35S: (D), sección longitudinal mostrando un tallo, hojas y yema apical; (E), sección longitudinal en la zona del meristemo apical; (F), sección transversal de hojas y (H), sección transversal de tallos. Cuando los explantes fueron transformados con GUS bajo el control del promotor *EgCCR*, se encontró una fuerte expresión asociada al tejido vascular; (G), sección transversal de hojas; obsérvese la expresión de GUS en las fibras del xilema y floema, e (I), sección de tallos mostrando expresión de GUS bajo el promotor *EgCCR*. Barras en A, B y C=5  $\mu\text{m}$ ; en D=500  $\mu\text{m}$ ; en E-G=100  $\mu\text{m}$ ; en H e I=200  $\mu\text{m}$ .

**Descripción detallada de la invención**

En un aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para transformar material vegetal procedente de árboles adultos (en adelante procedimiento de la invención), que comprende la transformación con *Agrobacterium* asistida por sonicación (SAAT) caracterizado porque:

- a) dicho material vegetal es un explante, procedente de un árbol adulto, que comprende, al menos dos hojas y una yema axilar o apical;
- b) dicho material vegetal se somete a un tratamiento de reactivación previo al SAAT consistente en incubar dicho material vegetal en un medio de cultivo que comprende medio MS parcialmente modificado y suplementado con ácido naftalenacético (ANA) y benciladenina (BA); y
- c) el material vegetal reactivado, en presencia de *Agrobacterium*, se somete a un tratamiento que consiste en una combinación de (i) ultrasonidos durante un periodo de tiempo comprendido entre 15 y 120 segundos, y posteriormente, (ii) infiltración a vacío durante un periodo de tiempo comprendido entre 2 y 10 minutos.

En una realización particular, el material vegetal empleado en la transformación es un explante procedente de un árbol adulto, que comprende, al menos, dos hojas y una yema axilar o apical. Ventajosamente, dicho árbol adulto es un árbol élite adulto.

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “árbol élite adulto” se refiere a una especie vegetal leñosa (de porte arbóreo o arbustivo) que posee unas características agronómicas destacables y que ha sido criada y cultivada en el campo.

En una realización particular, dicho árbol adulto es un árbol de la especie *Eucalyptus* sp por ejemplo *E. grandis*, *E. nitens*, *E. gunnii*, *E. globulus*, o una variedad o un híbrido del mismo. No obstante, el procedimiento de la invención puede emplearse prácticamente con cualquier especie vegetal gracias al planteamiento universal de su diseño, habiendo sido comprobada por los inventores en kiwi (*Actidinia deliciosa*) y vid (*Vitis vinifera*), y siendo potencialmente aplicable a otras especies como pino (*Pinus sylvestris*), las encinas y los robles (*Quercus* sp.), el castaño (*Castanea sativa*), etc.

Según el procedimiento de la invención, los explantes se someten a un tratamiento de reactivación previa a la SAAT. Dicha reactivación se lleva a cabo cultivando los explantes en medio MS parcialmente modificado y suplementado con ANA y BA, en ocasiones identificado en esta descripción como medio R7 (véase la Tabla 1 en el Ejemplo). Mediante dicho tratamiento de reactivación, los explantes resultan más susceptibles a la infección por *Agrobacterium*.

Para transformar eficientemente los explantes previamente reactivados, el procedimiento de la invención propone poner en contacto dichos explantes previamente reactivados con *Agrobacterium* y someter al conjunto resultante a un tratamiento con ultrasonidos durante un periodo de tiempo comprendido entre 50 y 70 segundos, preferentemente, durante 60 segundos, y, posteriormente, un tratamiento consistente en una infiltración a vacío durante un periodo de tiempo comprendido entre 4 y 6 minutos, preferentemente, 5 minutos. La combinación de ambos tratamientos sobre los explantes previamente reactivados incrementa significativamente el número de explantes transformados eficientemente por *Agrobacterium*.

La aplicación de ultrasonidos puede realizarse mediante el empleo de cualquier aparato apropiado. Asimismo, la infiltración a vacío se puede llevar a cabo por métodos convencionales, por ejemplo, mediante el empleo de una bomba eléctrica o cualquier otro procedimiento conocido en el estado de la técnica que conduzca al mismo resultado, por ejemplo, una bomba de agua.

La transformación de los explantes, de acuerdo con el procedimiento de la invención, se lleva a cabo utilizando *Agrobacterium* como vector de transformación. Prácticamente cualquier cepa de *Agrobacterium* puede ser utilizada en la puesta en práctica del procedimiento de la invención. No obstante, en una realización particular, ventajosamente, se emplean cepas hipervirulentas de *Agrobacterium*, por ejemplo, la cepa hipervirulenta de *A. tumefaciens* AGL1 pTiBo542 que contiene el plásmido pBin19 (Ejemplo).

Como es conocido, *Agrobacterium* contiene un plásmido en el que se va a insertar la secuencia de nucleótidos de interés que se desea introducir en la especie vegetal a transformar, operativamente unida a una secuencia reguladora de su expresión, que puede ser específica de tejido o de expresión ubicua.

Por tanto, en una realización particular de la presente invención, la cepa de *Agrobacterium* utilizada en la transformación según el procedimiento de la invención, contiene un plásmido que comprende un promotor específico de tejido funcional en plantas, por ejemplo, el promotor de la cinamil-CoA reductasa (CCR) de *E. gunnii* (*EgCCR*). La presencia en el plásmido de *Agrobacterium* del promotor *EgCCR* va a originar que la secuencia de nucleótidos de interés al que está operativamente unido, se exprese en el tejido vascular de la planta. De igual modo, se puede dirigir la expresión de la secuencia de nucleótidos de interés uniéndolo operativamente a cualquier otro promotor funcional en plantas específico de tejido, tal como el promotor de la sacarosa- sintasa de maíz (RSsI) que se va a expresar en el floema, el promotor de la metalotioneína de maíz (MT-L), que va a expresarse preferentemente en el tejido de la raíz, etc.

Adicionalmente, cuando se desea obtener una expresión ubicua de la secuencia de nucleótidos de interés, se puede optar por utilizar promotores capaces de expresarse en cualquier tejido, tales como, el promotor de la subunidad 35S de virus de mosaico del tabaco (CaMV35S), el promotor de la ubiquitina-1 de maíz (Ubi-1), el promotor de la actina-1 de arroz (Act-1), etc.

Tal como se utiliza en esta descripción, la expresión “secuencia de nucleótidos de interés” se refiere a una secuencia de nucleótidos que proporciona a la planta transformada una característica deseada, por ejemplo, resistencia a patógenos, tales como bacterias, hongos y virus; resistencia a estrés abiótico, tales como sequía, frío, etc; resistencia a herbicidas e insectos, etc. Entre las secuencias de interés citadas anteriormente se encuentran los siguientes ejemplos:

- (i) secuencias que confieren resistencia a enfermedades bacterianas, mayor rendimiento de los árboles frutales y mejora de las propiedades organolépticas de los frutos o, tal como se describe en la presente invención, secuencias que permiten modificar los perfiles de la lignina en la madera de eucalipto, un objetivo de primer orden en la industria de obtención de pulpa y papel;
- (ii) secuencias que proporcionan resistencia a virus: genes que codifican para ARN antisentido, genes que codifican para secuencias defectivas con capacidad de interferir en la replicación del virus;
- (iii) secuencias que proporcionan resistencia a insectos: genes *Cry*, genes *Bt*, etc;
- (iv) secuencias que proporcionan resistencia a hongos: genes que codifican para enzimas de la ruta de las fitoalexinas, genes que codifican enzimas que generan especies reactivas al oxígeno, etc.;
- (v) secuencias que proporcionan resistencia a condiciones de estrés abiótico: genes para la síntesis de compuestos osmoprotectores (gen *betA*, gen *codA*, gen *TPS1*, gen *sacB*, etc), genes que incrementan la flexibilidad de las membranas (gen *fad7*, gen *des9*, etc), genes para proteína inducibles por estrés (gen *HVA 1*, gen *aff* y gen *afa3*), genes para eliminar radicales activos de oxígeno (gen *sod*, etc), etc.; y
- (vi) secuencias que proporcionan resistencia a herbicidas: transferencia de genes que producen una enzima que detoxifica el herbicida (gen *GST* de maíz, gen *BXN* de *Klebsiella*, gen *bar* de *Streptomyces*, etc), transferencia de genes que alteran la sensibilidad del enzima blanco del herbicida (gen mutante *psbA* procedente de *Amaranthus*, gen mutante para la glutamina sintetasa), etc.

El éxito de la transformación puede determinarse mediante métodos convencionales, utilizando un vector que transporte un gen reportero operativamente unido a la secuencia reguladora. En el procedimiento de transformación aquí descrito, se han utilizado el gen *UIDA* ( $\beta$ -glucuronidasa) bajo el control del promotor CaMV35S o del promotor EgCCR.

En una realización particular del procedimiento descrito en esta invención, el material vegetal transformado puede ser sometido a un proceso de regeneración por métodos convencionales con el fin de obtener la planta regenerada completa. Esta regeneración se puede llevar a cabo empleando el medio de cultivo MS modificado (M3) [Tabla 1], seguido del protocolo convencional de micropropagación, que comprende las etapas de enraizamiento, aclimatación en el invernadero y transferencia de las plántulas a su ambiente natural.

Siguiendo el procedimiento de la invención, se obtiene un material vegetal transformado, procedente de árboles adultos que, si se desea, va a dar lugar a una planta que incorpora alguna característica deseada. En una realización particular, dicha planta pertenece a la especie *Eucalyptus* sp.

## Ejemplo

### *Obtención de plantas de E. globulus transformadas a partir de material adulto*

#### I. Materiales y métodos

##### *Material vegetal*

Se emplearon plántulas micropropagadas de *E. globulus* (obtenidas a partir de árboles elite adultos seleccionados por sus propiedades de campo) proporcionados por J. Oller (ENCE-DIT, Pontevedra, España) como material vegetal para los experimentos de transformación genética. Para la proliferación de brotes se empleó un medio MS modificado (suplementado con ANA y BA), y los cultivos se mantuvieron en una cámara a 23°C y con un fotoperiodo de 16 h.

## ES 2 299 285 B2

### *Cepas bacterianas y secuencias transferidas*

Se empleó la cepa hipervirulenta de *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 pTiBo542 (Lazo *et al.*, 1991), que contiene el plásmido pBin19. Las secuencias transferidas en los experimentos fueron:

- 5 a) p35S GUS int (Vacanneyt *et al.*, 1990), que incluye el gen *UIDA* ( $\beta$ -glucuronidasa) bajo el control del promotor CaMV35S y el gen de resistencia a la kanamicina *NPTII* (neomicina fosfotransferasa), y
- 10 b) una construcción que incluye el gen *UIDA* bajo el control del promotor de la CCR de *Eucalyptus gunnii* (Lacombe *et al.*, 1997).

### *Protocolo de transformación*

15 La transformación genética se realizó en explantes completos con al menos dos hojas. Algunos de los explantes tenían, al menos, una yema apical y otras, una yema axilar. Estos explantes se mantuvieron durante 14 días en oscuridad y 7 días con un fotoperiodo de 16 h en medio de regeneración MS (R7) [Tabla 1]. El cultivo bacteriano se dejó crecer durante la noche en medio líquido LB (LB Broth Miller, Sigma, St Louis, MO, EEUU) con los antibióticos apropiados (50 mg L<sup>-1</sup> kanamicina, ampicilina y rifampicina, Sigma). Se añadió acetosiringona y prolina

20 hasta alcanzar una concentración final de 100  $\mu$ M y 1 mM respectivamente. Las bacterias se recogieron en la fase de crecimiento exponencial; para ello la suspensión se centrifugó a 3.000 g durante 10 minutos, y se resuspendió en medio MS suplementado con acetosiringona 100  $\mu$ M, prolina 1 mM y 1 mg L<sup>-1</sup> de ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) (medio de cocultivo líquido). Se colocaron aproximadamente 50 explantes en contacto con el medio en que se habían resuspendido previamente las bacterias, y se aplicó sonicación en un baño de ultrasonidos Branson 3510E-DTH (42 kHz, Branson Ultrasonics Corporation, CT, EEUU). Seguidamente se realizó una infiltración al vacío en un

25 desecador empleando una bomba de vacío eléctrica (0,084 MPa, Modelo XX55 220 50, Millipore Corporation, MA, EEUU). Los tiempos ensayados para optimizar los tiempos de sonicación e infiltración a vacío se recogen en las tablas 2 y 3, respectivamente. Posteriormente, se recogieron los explantes y se lavó el resto de medio de cocultivo líquido con agua conteniendo 500 mg de Augmentine<sup>®</sup> (2 g de amoxicilina suplementada con 200 mg de ácido clavulánico,

30 proporcionada por SmithKline Beecham, Cambridge, Reino Unido). Seguidamente, se realizó un cocultivo sólido en medio de proliferación MS (M3) [Tabla 1] suplementado con acetosiringona 100  $\mu$ M y prolina 1 mM durante 7 días, en oscuridad y a 25°C. Finalmente, los explantes se cultivaron en medio de proliferación MS, conteniendo 500 mgL<sup>-1</sup> de Augmentine<sup>®</sup> y 150 mg de kanamicina.

35

(Tabla pasa a página siguiente)

40

45

50

55

60

65

TABLA 1

Composición de los medios de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962), M3 (Proliferación) y R7 (Regeneración) (Oller, 1993)

5

|   | MS    | M3    | R7    |
|---|-------|-------|-------|
| <b>COMPONENTES</b>                                    |       |       |       |
| <b>Macronutrientes (g L<sup>-1</sup>)</b>             |       |       |       |
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>                       | 16,5  | 16,5  | 16,5  |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                  | 3,7   | 3,7   | 3,7   |
| KNO <sub>3</sub>                                      | 19,0  | 19,0  | 19,0  |
| CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O                  | 4,4   | 4,4   | 4,4   |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                       | 1,7   | 1,7   | 1,7   |
| <b>Micronutrientes (g L<sup>-1</sup>)</b>             |       |       |       |
| ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                  | 8,6   | 8,6   | 8,6   |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                        | 6,2   | 6,2   | 6,2   |
| MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O                  | 22,3  | 22,3  | 22,3  |
| KI  | 0,83  | 0,83  | 0,83  |
| CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O                  | 0,025 | 0,025 | 0,025 |
| CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O                  | 0,025 | 0,025 | 0,025 |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O   | 0,25  | 0,25  | 0,25  |
| FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                  | 27,8  | 27,8  | 27,8  |
| Na <sub>2</sub> EDTA                                  | 37,8  | 37,8  | 37,8  |
| <b>Vitaminas (mg L<sup>-1</sup>)</b>                  |       |       |       |
| Tiamina HCL   | 0,1   | 0,5   | 0,1   |
| Piridoxina HCL  | 0,5   | 0,1   | 0,5   |
| Acido nicotínico                                      | 0,5   | 0,1   | 0,5   |
| Mio-inositol  | 100   | 100   | 100   |
| L-glicina   |       |       | 50    |
| Arginina  |       |       | 2     |
| <b>Reguladores de crecimiento (mg L<sup>-1</sup>)</b> |       |       |       |
| ANA   | -     | 0,01  | 0,2   |
| BAP   | -     | 0,1   | 0,2   |
| <b>Azúcares (g L<sup>-1</sup>)</b>                    |       |       |       |
| Sacarosa  | 30    | 20    | 35    |
| <b>Agentes gelantes (g L<sup>-1</sup>)</b>            |       |       |       |
| Agar  | 7     | 7     | 7     |
| <b>pH</b>   | 5,7   | 5,7   | 5,6   |

55

#### Ensayo histoquímico y fluorimétrico de la $\beta$ -Glucuronidasa

60

65

Como método rutinario para la detección de la transformación, los explantes fueron analizados mediante un protocolo modificado a partir de Jefferson (1987) para la detección histoquímica de la actividad GUS. El material vegetal se tiñó mediante el empleo de X-Gluc (Eurogentec, Liège, Bélgica) en tampón fosfato conteniendo EDTA 10 mM, ferrocianuro de potasio 0,1 mM a 37°C durante toda la noche. Después de la tinción, el material se fijó en una mezcla 14:4:1:1 de agua, etanol, ácido acético glacial y formaldehído. Tras la fijación, la clorofila se eliminó sumergiendo la planta en etanol al 70%. Los resultados se examinaron bajo una lupa Olympus SZX12. En algunos casos, los explantes fijados se cortaron en pequeños trozos de unos 5 mm, y se realizaron secciones transversales y longitudinales mediante un vibratomo (TPI, St Louis, MO, EEUU), que se examinaron en un microscopio Olympus BX60. Se tomaron fotografías mediante el uso de una cámara digital (Olympus DP 11) y las imágenes se editaron en tamaño y resolución con el programa Adobe Photoshop 5.0, y modificadas en brillo y contraste.

## ES 2 299 285 B2

Para la determinación *in vitro* de la actividad GUS, el tejido se molió finamente empleando nitrógeno líquido, y se resuspendió en tampón fosfato pH 7,0 conteniendo EDTA 10 mM, Tritón X-100 al 0,1%, SDS (dodecilsulfato sódico) al 0,1% y mercaptoetanol 10 mM. Tras centrifugar (12.000 g, 15 min, 4°C), se tomaron 50  $\mu$ l del sobrenadante y se mezclaron con tampón de extracción con 4-metil-umbeliferil- $\beta$ -D-glucuronido 2 mM. La mezcla de reacción se incubó durante 2 h a 37°C. Los resultados se analizaron por fluorimetría (365 nm para excitación y 455 nm para emisión) en un fluorímetro Kontron SFM25 (Kontron Instruments, Herts, Reino Unido).

### Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se realizaron PCR para detectar la presencia de transgenes en los explantes. El ADN fue extraído a partir de explantes completos empleando un procedimiento adaptado a partir de Doyle y Doyle (1990). El tejido se homogeneizó en nitrógeno líquido y se resuspendió en tampón Tris-HCl precalentado, que contenía CTAB (bromuro de cetiltrimetil amonio) al 2%, PVP (polivinil pirrolidona) al 1%, EDTA 20 mM, mercaptoetanol al 0,2%, y NaCl 1,4 M. El homogenizado se incubó entonces durante 30 minutos a 60°C. Seguidamente, se añadió una mezcla 14:1 de cloroformo/alcohol isoamílico. La mezcla se centrifugó, y se recuperó la fase orgánica. Posteriormente se realizaron dos pasos de lavado empleando alcohol isopropílico y etanol al 70%. Una vez purificado, el ADN se resuspendió en agua y se conservó a una temperatura de -20°C hasta su uso.

Las PCRs se realizaron en un volumen de reacción de 20  $\mu$ L, que contenían aproximadamente 100 ng de ADN de *Eucalyptus* sp., 15 pmol de cada cebador, 200 mM de cada dNTP, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM y 0,5 unidades de Taq (Bioline Ltd, London, reino Unido), todo ello diluido en el tampón de PCR proporcionado por el fabricante. Se emplearon dos pares de cebadores para detectar la presencia de los genes *NPTII* y *UIDA*:

para el gen *NPTII*

**nptIIA (5'-GAGGCTATTCGGCTATGACT-3') y**

**nptIIB (5'-AATCTCGTGATGGCAGGTTG-3'),**

para amplificar *UIDA*

**gusA (5'-TAGAAACCCCAACCGTGAAA-3') y**

**gusB (5'-TGGCGTATAGCCGCCCTGATG-3'),**

generando fragmentos de una longitud esperada de 805 y 326 pb (pares de bases) respectivamente. Como control de la presencia de *Agrobacterium* se realizó el mismo tipo de experimento empleando cebadores específicos para el gen *VIRD2*:

**virA (5'-ATGCCCGATCGAGCTCAAGT-3') y**

**virB (5'-CCTGACCCAAACATCTCGGCTGCCCA-3'),**

que amplifican una secuencia de 338 pb. Las condiciones en las que se realizaron las PCR fueron las siguientes: 94°C durante 5 minutos seguido de 30 ciclos de 94°C durante 45 s, 50°C durante 45 s y 72°C durante 45 s. Tras los ciclos, se añadió un paso final de extensión de 72°C durante 5 minutos. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Biometra (Biometra GmbH I.L., Goettingen, Alemania).

### Análisis mediante Southern blot

El ADN total fue extraído a partir de explantes completos empleando el kit de extracción NucleoSpin® Plant (Macherey-Nagel GmbH, Düren, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante e incluyendo un paso de tratamiento con RNasa. Aproximadamente 10  $\mu$ g de ADN fueron incubados con la enzima de restricción *EcoRI* (Promega, Madison, WI, EEUU) a 37°C durante una noche. Posteriormente, el ADN digerido se fraccionó en un gel de agarosa al 1% y fue transferido a una membrana de nylon cargada positivamente (Roche Molecular Biochemicals, Manheim, Alemania). Se empleó subsecuentemente el kit comercial DIG-high prime DNA labelling and detection starter kit I (Roche Molecular Biochemicals) siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras fabricar una sonda creada mediante cebadores al azar y dNTPs marcados con digoxigenina, empleando como molde un fragmento amplificado a partir del

gen *NPTII*, ésta se puso en contacto con la membrana y se realizó una hibridación a 41°C. La membrana se lavó en condiciones de alta especificidad. Posteriormente, el resultado de la detección de color mediante 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) se fotografió con una cámara digital.

5

## II. Resultados

### *Optimización del protocolo de transformación*

Una característica del procedimiento previamente descrito es que se realizó *in planta*, es decir, el material empleado en todo el proceso de transformación fueron explantes completos. Varios pasos de este protocolo han sido optimizados, midiendo la eficiencia de transformación en función de dos parámetros: la capacidad de los explantes para crecer y desarrollarse en medio con kanamicina, y el porcentaje de explantes que mostraban, al menos, un sector azul conspicuo tras la tinción GUS (Villar *et al.*, 1999; Gallego *et al.*, 2004).

15

Dicho procedimiento método incluye una fase de reactivación de los explantes, que fue optimizada mediante el uso de un medio MS Murashige y Skoog (1962) parcialmente modificado, y suplementado con ANA, BA, arginina y glicina (Medio R7).

Tras la reactivación, se colocaron los explantes y el cultivo bacteriano en una fase de cocultivo. En este punto, los explantes se sometieron a sonicación; la cavitación acústica provocada por los ultrasonidos conlleva la aparición de heridas microscópicas que facilitan la interacción de la bacteria con el explante (Trick and Finer, 1997). Se probaron diferentes tiempos de sonicación (Tabla 2), observando que 60 s de sonicación, provocaban un drástico incremento en la tinción GUS estable obtenida, por lo que este fue el valor considerado óptimo. Aunque la resistencia a kanamicina fue superior en el caso de 120 s, la proporción de explantes GUS-positivos quiméricos fue también mayor, mientras que 60 s provocaban una coloración GUS más uniforme.

25

TABLA 2

30

*Efectos de los diferentes tiempos de sonicación en la transformación*

| Tiempo (s) | % Resistentes a Kanamicina | % Explantes GUS positivos |
|------------|----------------------------|---------------------------|
| 15         | 60                         | 80                        |
| 60         | 65                         | 100                       |
| 120        | 80                         | 60                        |

35

40

45

Un paso de infiltración posterior a la sonicación utilizando una bomba eléctrica, incrementa significativamente el éxito de la transformación. Por este motivo, se determinó el tiempo de infiltración óptimo (Tabla 3), comprobando que cuando se aplica vacío durante 5 minutos, se obtienen los mejores resultados tanto si se tiene en cuenta la resistencia a kanamicina como el porcentaje de GUS-positivos.

50

TABLA 3

55

*Efectos de los diferentes tiempos de infiltración en la transformación*

| Tiempo (minutos) | % Resistentes a Kanamicina | % Explantes GUS positivos |
|------------------|----------------------------|---------------------------|
| 2                | 95                         | 57                        |
| 5                | 84                         | 79                        |
| 10               | 77                         | 62                        |

60

65

Cuando se examinó el efecto de diferentes medios en esta fase de cocultivo líquido en el éxito de transformación (Tabla 4), se comprobó que el medio óptimo tanto en relación a la resistencia a kanamicina como a la tinción GUS fue el medio MS suplementado con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).

TABLA 4

*Efectos de los diferentes medios de cocultivo líquidos en la transformación*

| Medio                                   | % Resistentes a Kanamicina | % Explantes GUS positivos |
|---|----------------------------|---------------------------|
| MS + 2,4-D                              | 91                         | 100                       |
| MS                                      | 84                         | 79                        |
| Proliferación MS (ANA+BA)               | 63                         | 75                        |
| Regeneración MS (ANA+BA+L-arginina+Gly) | 93                         | 71                        |

*Actividad  $\beta$ -glucuronidasa en las plántulas transformadas*

Durante la optimización de la técnica de transformación, se realizaron de forma rutinaria ensayos de actividad  $\beta$ -glucuronidasa tal y como se describe en la sección Materiales y Métodos. Para determinar si la variabilidad en la actividad  $\beta$ -glucuronidasa observada en la tinción histoquímica con X-gluc (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-glucurónico) era también observable de forma cuantitativa, se realizaron mediciones de esta actividad *in vitro* frente a 4-metil-umbeliferona. La actividad GUS se pudo observar en un 75% de los explantes; sin embargo, los niveles de actividad variaron drásticamente, desde casi indetectables hasta 1,46 pkat por explante (Figura 1), indicando grandes diferencias en la expresión del enzima debidas tanto a efectos de posición en el genoma o a número de copias integradas.

Cuando se emplearon los parámetros óptimos a lo largo de todo el protocolo, se obtuvieron excelentes resultados (Tabla 5). Dichos parámetros óptimos comprenden un tiempo de sonicación de 60 segundos, un tiempo de infiltración de 5 minutos y un medio de cocultivo líquido MS parcialmente modificado.

TABLA 5

*Resultados SAAT obtenidos cuando los parámetros óptimos son comparados*

| N  | % Resistentes a Kanamicina | % Explantes GUS positivos |
|----|----------------------------|---------------------------|
| 50 | 90                         | 96                        |

La transformación fue exitosa no sólo en cuanto al número de explantes que sobrevivieron al medio de selección con kanamicina o a los que se les determinó actividad glucuronidasa, sino también en cuanto a la extensión de la transformación conseguida, tal y como pudo verse en un gran número de explantes con coloración azul uniforme (Figura 4 a, b, c). Tras la tinción con X-gluc, secciones transversales y longitudinales de estos explantes fueron analizadas mediante microfotografía, mostrando que la actividad GUS estaba presente en profundidad y en todos los tejidos del explante incluyendo meristemas, haces vasculares, tallo y hojas (Figura 4, d, e, f, h).

*Análisis molecular de los transformantes*

Para determinar la presencia de los transgenes en los tejidos de eucalipto sometidos a transformación genética, se realizaron diversas PCRs con cebadores diseñados de acuerdo con las secuencias publicadas para los genes *UIDA* (GUS), *NPTII* (resistencia a kanamicina) y *VIRD2* (diagnóstico de la presencia de *Agrobacterium*, estos genes no son

transmitidos a la planta). De esta forma, *UIDA* y *NPTII* se emplearon como signo de transformación exitosa, mientras que *VIRD2* se usó como control de la contaminación residual bacteriana que pudiese enmascarar los resultados. La Figura 2 muestra los resultados obtenidos cuando se analizaron muestras de tejido vegetal mediante PCR un mes después de la transformación; en los carriles 9 y 10, aparecieron bandas claras de amplificación correspondientes a los genes *NPTII* y *UIDA*. *VIRD2* se amplificó solo en un explante, probablemente debido a contaminación residual de *Agrobacterium*; en conjunto, los resultados positivos en la gran mayoría de las PCR realizadas reflejan la ausencia de contaminación bacteriana.

A partir del ADN extraído de los explantes seleccionados se realizó un Southern blot. No aparecieron bandas de hibridación en los explantes que no habían superado la selección con kanamicina (Figura 3). La presencia de una banda en el explante transformado (con clorofila) que se analizó, indica la integración estable de los transgenes en el genoma vegetal.

### Expresión GUS dependiente de promotor en secciones de explantes

Se realizaron experimentos de transformación genética para determinar si el promotor *EgCCR* caracterizado en *E. gunnii* conserva en *E. globulus* la capacidad de provocar expresión diferencial, y para comprobar el protocolo de transformación de la invención con un promotor específico. Estos resultados se compararon con los obtenidos cuando el promotor empleado para controlar la expresión del GUS fue el promotor constitutivo CaMV35S. Se estudió la expresión GUS en plántulas resistentes a kanamicina, y se observó claramente un patrón de expresión diferencial; mientras que las plántulas transformadas con el promotor CaMV35S mostraban un patrón de expresión constitutivo (Figura 4 f, h), el promotor *EgCCR* provocaba que la coloración GUS apareciera tan sólo asociada a los haces vasculares de *E. globulus* (Figura 4 g, i).

## III. Discusión

### Método de transformación

Este procedimiento permite la recuperación de un 70% de plántulas positivamente transformadas de forma rutinaria a partir de una población inicial *in vitro*. El alto porcentaje de éxito se debe probablemente a la combinación de sonicación y su capacidad para causar heridas microscópicas, y al paso de infiltración que facilita significativamente la interacción de *Agrobacterium* con los tejidos vegetales, siempre en un ambiente cuidadosamente controlado.

### El promotor *EgCCR* induce expresión en el tejido vascular en *E. globulus*

El ejemplo descrito en la presente invención, proporciona un procedimiento de transformación optimizado para *E. globulus* con un promotor específico capaz de controlar la expresión de los genes de interés. Para confirmar la expresión vascular conferida por el promotor *EgCCR*, se empleó una construcción con el gen reportero GUS bajo el control de ese promotor. De esta forma se obtuvo evidencia de expresión vascular, en claro contraste con el patrón de expresión ubicua conferido por el promotor CaMV35S. Por tanto, el promotor *EgCCR* puede contemplarse desde un punto de vista tecnológico como un buen candidato para dirigir la expresión de transgenes de interés hacia los haces vasculares, impidiendo efectos colaterales indeseables provocados por promotores constitutivos. En algunos casos, incluso ha sido posible demostrar que el uso de un promotor implicado en la ruta biosintética de ligninas es más eficiente a la hora de alterar el perfil de ligninas que el CaMV35S.

En conclusión, el procedimiento optimizado proporcionado por esta invención abre nuevas posibilidades para la transformación genética de material adulto de especies vegetales de interés agronómico consideradas recalcitrantes a la transformación. La capacidad para transformar tejidos provenientes de plantas adultas se debe probablemente a la fase de reactivación combinada con sonicación, infiltración y medios de cultivo modificados.

## Referencias bibliográficas

**Boudet, A.M., Kajita, S., Grima-Pettenati, J., Goffner, D. (2003)** Lignins and lignocellulosics: a better control of synthesis for new and improved uses. *Trends Plant Sci.* **8**, 576-581.

**Doyle, J.F., Doyle, J.L. (1990)** Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12**, 13-15.

**Gallego, P.P., Rodriguez, R., de la Torre, F., Villar, B. (2004)** Genetic transformation of *Eucalyptus globulus*. In *Sustainable forestry, wood products & biotechnology* (Espinel, S., Barredo, Y., Ritter, E., eds). Vitoria-Gasteiz: DFA-AFA Press, pp. 163-170.

**González, E.R., de Andrade, A., Bertolo, A.L., Coelho, G., Tozelli, R., Prado, V.A., Veneziano, M.T., Labate, C.A. (2002)** Production of transgenic *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* using the sonication-assisted *Agrobacterium* transformation (SAAT) system. *Funct. Plant. Biol.* **29**, 97-102.

## ES 2 299 285 B2

- Ho, C.K., Chang, S.H., Tsay, J.Y., Tsai, C.J., Chiang, V.L., Chen, Z.Z. (1998)** *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Eucalyptus camaldulensis* and production of transgenic plants. *Plant Cell Rep.* **17**, 675-680.
- 5 **Jefferson, R.A. (1987)** Assaying chimeric genes in plants; the GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* **5**, 387-405.
- Lacombe, E., Hawkins, S., Van Doorselaere, J., Piquemal, J., Goffner, D., Poeydomenge, O., Boudet, A.M., Grima-Pettenati, J. (1997)** Cinnamoyl-CoA reductase, the first committed enzyme of the lignin branch biosynthetic pathway: cloning, expression and phylogenetic relationships. *Plant J.* **11**, 429-441.
- 10 **Lazo, G.R., Stein, P.A., Ludwig, R.A. (1991)** A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. *Biotechnology* **9**: 963-967.
- 15 **Murashige, T., Skoog, F. (1962)** A revised medium for rapid bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**, 473-497.
- Oller, J. (1993)** Organogenesis of *Eucalyptus globulus* Labill from seedling and young tissues of clones. I Congreso Forestal Espanol. Lourizan (Pontevedra) pp 14-18.
- 20 **Santorém, E.R., Trick, H.N., Essig, J.S., Finer, J.J. (1998)** Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean immature cotyledons: optimization of transient expression. *Plant Cell Rep.* **17**, 752-759.
- Tang, W. (2003)** Additional virulence genes and sonication enhance *Agrobacterium tumefaciens*-mediated loblolly pine transformation. *Plant Cell Rep.* **21**, 555-562.
- 25 **Tournier, V., Grat, S., Marque, C., El Kayal, W., Penchel, R., de Andrade, G., Boudet, A.M., Teulieres, C. (2003)** An efficient procedure to stably introduce genes into an economically important pulp tree (*Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*). *Transgenic Res.* **12**, 403-411.
- 30 **Trick, H.N., Finer, J.J. (1997)** SAAT: sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation. *Transgenic Res.* **6**, 329-336.
- Vancanneyt, G.; Schmidt, R.; O'connor-Sánchez, A.; Willmitzer, L.; 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. Genec.* **220**, 245-250.
- 35 **Villar, B., Oller, J.J., Teulieres, C., Boudet, A.M., Gallego, P.P. (1999)** *In planta* transformation of adult clones of *Eucalyptus globulus* using an hypervirulent *Agrobacterium tumefaciens* strain. In *Sustainable forestry, wood products & biotechnology* (Espinel S., Barredo Y., Ritter E., eds.). Vitoria-Gasteiz: DFA-AFA Press, pp. 373-385.
- 40 **Weber, S., Friedt, W., Landes, N., Molinier, J., Himber, C., Rousselin, P., Hahne, G., Horn, R. (2003)** Improved *Agrobacterium*-mediated transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.): assessment of macerating enzymes and sonication. *Plant Cell Rep.* **21**, 475-482.
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para transformar material vegetal, mediante transformación con *Agrobacterium* asistida por sonicación (SAAT), **caracterizado** porque:
- 10 a) dicho material vegetal es un explante, procedente de un árbol adulto, que comprende, al menos dos hojas y una yema axilar o apical;
- 15 b) dicho material vegetal se somete a un tratamiento de reactivación previo al SAAT consistente en incubar dicho material vegetal en un medio de cultivo que comprende medio MS parcialmente modificado y suplementado con ácido naftalenacético (ANA) y benciladenina (BA); y
- c) el material vegetal reactivado, en presencia de *Agrobacterium*, se somete a un tratamiento que consiste en una combinación de (i) ultrasonidos durante un periodo de tiempo comprendido entre 15 y 120 segundos, y -posteriormente, (ii) infiltración a vacío durante un periodo de tiempo comprendido entre 2 y 10 minutos.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho material vegetal es un explante procedente de un árbol adulto, que comprende, al menos dos hojas y una yema axilar o apical.
- 20 3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho árbol adulto es un árbol de la especie *Eucalyptus* sp.
4. Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende la aplicación de ultrasonidos durante 60 segundos, y, posteriormente, infiltración a vacío durante 5 minutos.
- 25 5. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la cepa de *Agrobacterium* utilizada en la transformación contiene un plásmido que comprende un promotor específico de tejido funcional en plantas.
- 30 6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que dicho promotor específico de tejido funcional en plantas es el promotor de la cinamil-CoA reductasa (CCR) de *Eucalyptus gunnii* (EgCCR).
7. Procedimiento según la reivindicación 5 ó 6, en el que dicho plásmido comprende un promotor específico de tejido funcional en plantas operativamente unido a una secuencia de nucleótidos de interés.
- 35 8. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la cepa de *Agrobacterium* utilizada en la transformación contiene un plásmido que comprende un promotor de expresión ubicua funcional en plantas.
9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que dicho promotor de expresión ubicua funcional en plantas es el promotor de la subunidad 35S del virus del mosaico del tabaco (CaMV35S).
- 40 10. Procedimiento según la reivindicación 8 ó 9, en el que dicho plásmido comprende un promotor constitutivo funcional en plantas operativamente unido a una secuencia de nucleótidos de interés.
- 45 11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 que comprende, además, la regeneración de la planta a partir del material vegetal transformado.
- 50
- 55
- 60
- 65

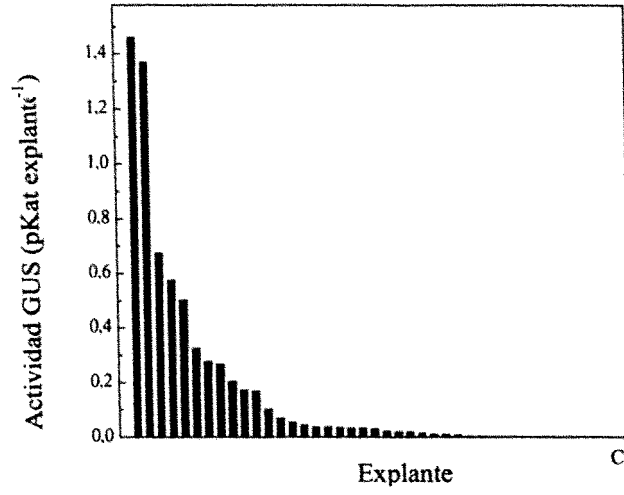


Figura 1

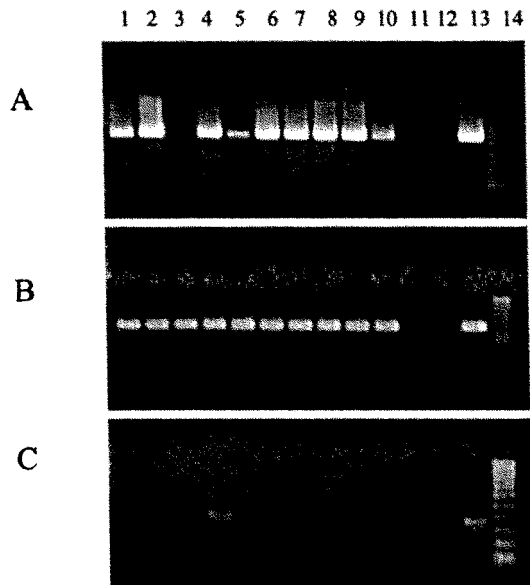
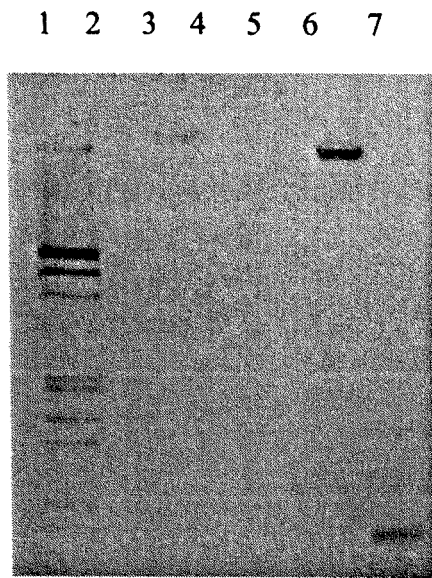
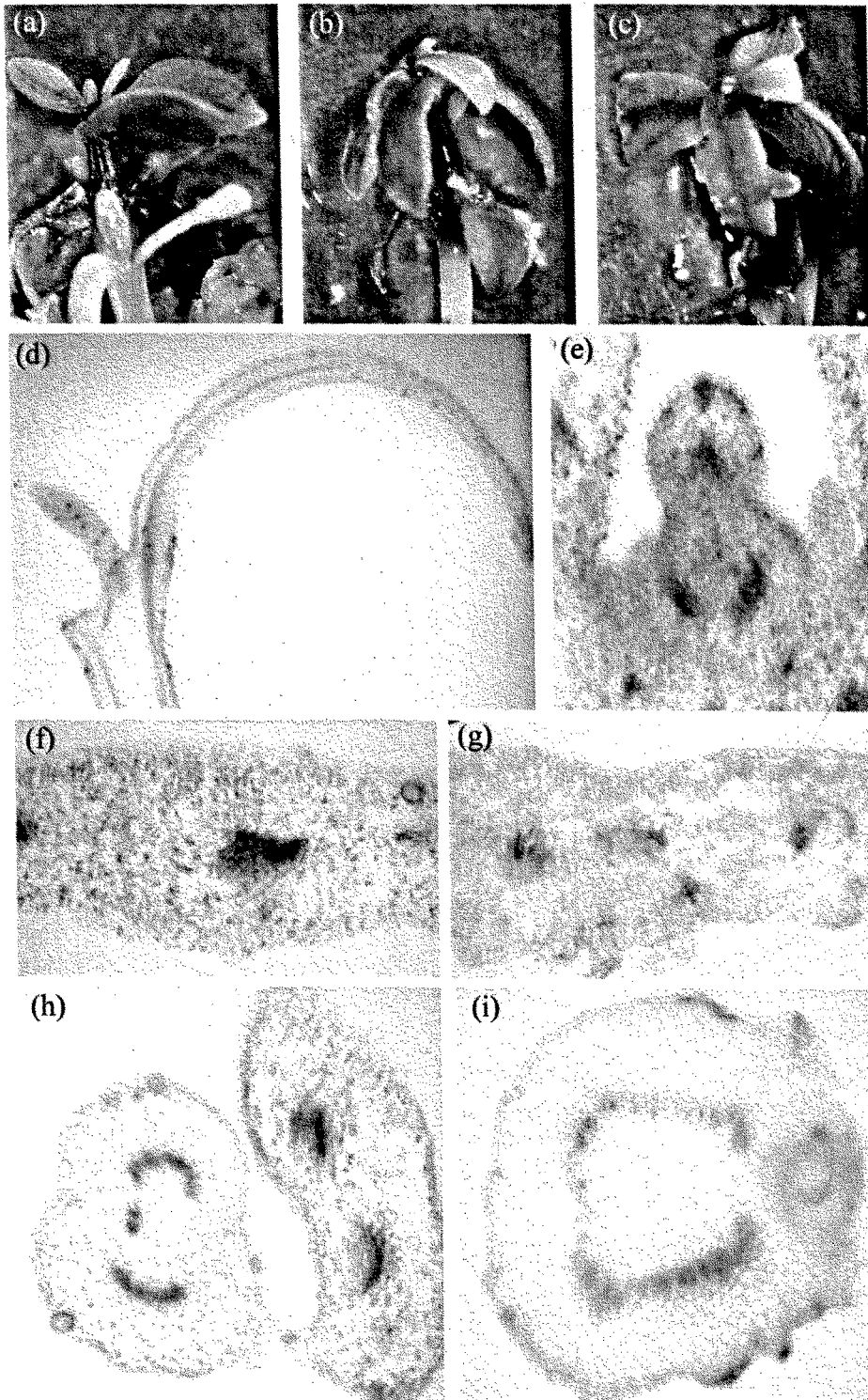


Figura 2



**Figura 3**



**Figura 4**



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 299 285

② Nº de solicitud: 200402854

③ Fecha de presentación de la solicitud: 26.11.2004

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | ⑥ Documentos citados  | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|---|----------------------------|
| Y         | EP 1448777 A2 (SUZANO PAPEL & CELULOSESUZANO PAPEL & CELULOSE) 25.08.2004, reivindicaciones.                  | 1-14                       |
| Y         | WO 9948355 A1 (FORBIO LTD; TEASDALE ROBERT DIXON; MOURADOVA EKATERINA) 30.09.1999, resumen; reivindicaciones. | 1-14                       |
| A         | US 2002112261 A1 (ROJAS BRENDA et al.) 15.08.2002, todo el documento.   | 1-14                       |
| A         | WO 0112828 A1 (PARADIGM GENETICS INC; KLOTI ANDREAS S) 22.02.2001, todo el documento.                         | 1-14                       |
| A         | WO 0063400 A2 (SAMUEL ROBERTS NOBLE FOUNDATIO; HARRISON MARIA J; BURLIEGH) 26.10.2000, todo el documento.     | 1-14                       |
| A         | EP 1306441 A1 (JAPAN TOBACCO INC) 02.05.2003, todo el documento.  | 1-14                       |
| A         | WO 9625504 A1 (SHELL INT RESEARCH; EDWARDS GLYN ALYN; FUELL KEITH JAN) 22.08.1996, todo el documento.         | 1-14                       |

**Categoría de los documentos citados**

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

**Fecha de realización del informe**

23.04.2008

**Examinador**

J. Manso Tomico

**Página**

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**C12N 15/82** (2006.01)

**C12N 5/14** (2006.01)

**A01H 5/00** (2006.01)