



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 281 373**

51 Int. Cl.:
C12N 15/82 (2006.01)
A01H 4/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00989221 .7**
86 Fecha de presentación : **06.12.2000**
87 Número de publicación de la solicitud: **1235921**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **04.09.2002**

54 Título: **Regeneración y transformación de remolacha.**

30 Prioridad: **07.12.1999 US 169512 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.10.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.10.2007

73 Titular/es: **Monsanto Technology L.L.C.**
800 North Lindbergh Boulevard
St. Louis, Missouri 63167, US

72 Inventor/es: **Connor-Ward, Dannette y**
Hinchee, Maud, A., W.

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

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

Regeneración y transformación de remolacha.

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a la preparación de plantas de remolacha genéticamente transformadas. En particular, se describen procedimientos y materiales para la transformación de plantas de remolacha por medio de transferencia genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

10 **Antecedentes de la invención**

La sacarosa, conocida comúnmente como azúcar, explica aproximadamente el 11% de la ingesta calórica de los seres humanos en todo el mundo. La remolacha (*Beta vulgaris*) es una de las dos fuentes agrícolas principales de azúcar comestible. Aproximadamente el 40% del suministro de azúcar de todo el mundo deriva de la remolacha, con la caña de azúcar como la otra fuente agrícola principal de azúcar, que explica aproximadamente el 60%. Países en Europa y en la antigua Unión Soviética producen prácticamente todo su azúcar a partir de plantas de remolacha. En los Estados Unidos, aproximadamente 30% del azúcar consumido deriva de la remolacha.

Las plantas de remolacha son susceptibles de sufrir una variedad de patógenos y plagas. Los daños virales, fúngicos, bacterianos y producidos por insectos pueden reducir mucho el rendimiento y la calidad del azúcar recogido. Las mejoras en la resistencia a estos factores han sido lentas mediante procedimientos clásicos de hibridación. La transformación de plantas de remolacha por medio de técnicas modernas de biología molecular es atractiva, aunque hasta recientemente, la remolacha ha probado ser altamente resistente a la transformación.

Lindsey y Jones (Plant Cell Rep., 8: 71-74, 1989) describen la transformación de protoplastos de remolacha por electroporación.

Catlin (Plant Cell Rep., 9: 285-288, 1990) informó del efecto de antibióticos en la inhibición de la inducción de formación de callos y de regeneración de plantas a partir de cotiledones de remolacha. Se descubrió que la formación de callos es dependiente del genotipo. Se descubrió que los antibióticos inhiben la formación de brotes. Catlin propone que la regeneración por medio de explantes de cotiledones combinada con protocolos de selección de antibióticos probaría tener utilidad en la selección de callos transformados de remolacha.

Jacq y col. (Plant Cell Rep., 12: 621-624, 1993) informaron de los efectos del genotipo, acetosiringona, duración del precultivo y cocultivo en la transformación de remolacha mediada por *Agrobacterium*. Se escindieron explantes de hipocótilos y de cotiledones de plántulas y se cocultivaron con *Agrobacteria*. Los transformantes se cuantificaron por medio de ensayos histoquímicos y fluorométricos de GUS. No se demostraron plantas transformadas.

Hall y col. (Documento WO 95/10178) describen un procedimiento para transformar protoplastos de remolacha por medio de un procedimiento con polietilenglicol, seguido por selección y regeneración. Las frecuencias de transformación fueron de entre $2,5 \times 10^{-5}$ y $6,1 \times 10^{-4}$.

Lindsey y Gallois (J. Exp. Botany, 41: 529-536, 1990) describen la transformación de remolacha con *Agrobacterium tumefaciens* que contiene vectores binarios. Se inocularon cortes de tejidos de bases de brotes por inmersión en una suspensión bacteriana líquida, se indujo la producción de brotes con 6-aminobencilpurina, y se seleccionó por resistencia a antibióticos. Se transfirieron los brotes a medio de inducción de raíces que contenía ácido 1-naftalenacético y kanamicina. Se obtuvo muy poco o ningún éxito en la regeneración de brotes a partir de tejidos de hojas.

Hall y col. (Nature Biotechnol. 14: 1133-1138, 1996) describen un procedimiento para generar plantas de remolacha transgénicas a partir de células guarda de los estomas de protoplastos. Se llevó a cabo una transformación de ADN con polietilenglicol en protoplastos derivados de células guarda de estomas. La selección de transformantes se logró por resistencia a bialafos. La eficacia de transformación estable para protoplastos fue entre $1,2$ y $5,2 \times 10^{-4}$. Los protoplastos se regeneraron en callos y plantas.

Hayakawa y col. (Proc. Jap. Sugar Beet Technol. 36: 130-135, 1994) describen un procedimiento para transformación de remolacha mediado por *Agrobacterium*. Las semillas germinaron y se retiraron los cotiledones. Se dejaron crecer los cotiledones hasta la aparición de hojas. Se cortaron trozos de hojas y se transfirieron al medio para permitir la formación de brotes. Se usaron los brotes para formar explantes, que posteriormente se transformaron con *Agrobacterium*. Se permitió que los explantes transformados formaran brotes, y enraizaran posteriormente en medio adecuado.

Fry y col. (Poster, Gordon Research Conference on Plant Cell and Tissue Culture, 11-16 de Junio, 1989) describieron la transformación y regeneración de explantes de cotiledones de remolacha inoculados con *Agrobacterium tumefaciens* que contenían secuencias de ácidos nucleicos exógenas.

A pesar de la cantidad de procedimientos de transformación de remolacha disponibles, existe la necesidad de un procedimiento de transformación más eficaz, que proporcione una fuente constante de material de plantas para pos-

teriores experimentos, y que proporcione una alternativa a los procedimientos existentes. La presente invención usa explantes de hojas en un procedimiento de transformación mediado por *Agrobacterium* que permite que el material de las plantas restante se propague *in vitro* para futuros experimentos de transformación. La presente invención proporciona procedimientos mejorados de producción de plantas de remolacha transgénicas para impartir cualidades deseables por ingeniería genética.

Resumen de la invención

En un esfuerzo para desarrollar procedimientos para la transformación eficaz de plantas de remolacha, se descubrió que varias etapas de la invención son beneficiosas para lograr mejores resultados y simplicidad experimental.

En un aspecto de la presente invención, se descubrió que los explantes de hojas son beneficiosos para la transformación posterior y tales explantes se prepararon fácilmente a partir de hojas de brotes micropropagados. Los cultivos micropropagados permiten al científico mantener un cultivo continuo, reduciendo significativamente el tiempo que supone la preparación de plantas de remolacha transgénicas. Con la facilidad de mantenimiento de los cultivos micropropagados, un científico no tiene que germinar semillas cada vez que comienza un procedimiento de transformación. La micropropagación es además beneficiosa para reducir o eliminar la aparición de tejidos quiméricos indeseados.

Las características y detalles de la invención se apreciarán más a la luz de la siguiente descripción detallada de la invención.

Descripción de las figuras

Las siguientes figuras forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen además para demostrar ciertos aspectos de la presente invención. La invención puede entenderse mejor por referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de formas de realización detalladas presentadas en este documento.

Figura	Descripción
1	Mapa del plásmido pMON17303
2	Mapa del plásmido pMON13819
3	Mapa del plásmido pMON13835
4	Mapa del plásmido pMON13851
5	Vista superior del cultivo micropropagado de remolacha
6	Vista lateral del cultivo micropropagado de remolacha

Descripción detallada de la invención

La presente invención describe un procedimiento para la transformación eficaz de plantas de remolacha usando la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* como un agente de administración de una secuencia de ácido nucleico exógena. La secuencia de ácido nucleico exógena está de preferencia en la forma de un vector de transformación de plantas. En la presente invención puede usarse cualquier vector adecuado para la transformación de plantas. Un plásmido o vector adecuado para la transformación de plantas contiene típicamente un marcador de selección o de información y elementos reguladores asociados como se describen, junto con uno o más ácidos nucleicos capaces de expresarse en una planta en una manera suficiente para conferir una característica o un fenotipo particular deseable a la planta. Los ejemplos de genes estructurales adecuados de interés abarcados por la presente invención incluyen, pero no se limitan a, genes para la tolerancia a insectos o plagas (bacterianas, fúngicas, por nematodos); tolerancia a herbicidas; genes para mejoras de la calidad tales como rendimiento, mejoras nutricionales; tolerancias ambientales o de estrés; o cualquier cambio deseable en la fisiología, crecimiento, desarrollo, morfología de la planta o producto(s) de la(s) planta(s).

Como alternativa, las secuencias codificadoras de ADN pueden afectar estos fenotipos codificando una molécula de ARN no traducible que causa la inhibición dirigida de la expresión de un gen endógeno, por ejemplo por medio de mecanismos mediados por cosupresión o antisentido (ver, por ejemplo, Bird y col., Biotech. Gen. Engin. Rev. 9:207, 1991). El ARN podría ser también una molécula catalítica de ARN (es decir, una ribozima) modificada por ingeniería genética para escindir un producto de ARNm endógeno deseado (ver por ejemplo, Gibson y Shillito, Mol. Biotech. 7:125, 1997). Por ello, cualquier gen que produce una proteína o ARNm que expresa un cambio de fenotipo o de morfología de interés es útil para la práctica de la presente invención.

Los ejemplos de ácidos nucleicos que pueden introducirse por medio de los procedimientos de la presente invención incluyen por ejemplo, secuencias de ADN o genes de otras especies, o genes o secuencias que se originan con o están presentes en las mismas especies, pero se incorporan en células receptoras por procedimientos de ingeniería genética más que por técnicas clásicas de reproducción o hibridación. Sin embargo, el término exógeno se refiere

también a genes que no están normalmente presentes en la célula que se está transformando; o tal vez simplemente no están presentes en la forma, estructura, etc., como se encuentran en el segmento de ADN o gen transformante; o genes que normalmente están presentes además del que uno desea, por ejemplo, sobreexpresar. Por ello, el término gen o ADN “exógeno” pretende referirse a cualquier gen o segmento de ADN que se introduce en una célula receptora, sin tener en cuenta si un gen similar pueda ya estar presente en tal célula. El tipo de ADN incluido en ADN exógeno puede incluir ADN que ya está presente en la célula de la planta, ADN de otra planta, ADN de un organismo diferente, o un ADN generado de manera externa, tal como una secuencia de ADN que contiene un mensaje complementario de un gen, o una secuencia de ADN que codifica una versión sintética o modificada de un gen.

Los vectores de transformación de plantas generalmente contienen una o más secuencias de ácido nucleico codificadoras de interés bajo el control transcripcional de secuencias reguladoras 5' y 3'. Tales vectores generalmente comprenden, unidos operativamente en la secuencia en la dirección 5' a 3', una secuencia promotora que dirige la transcripción de una secuencia estructural de ácido nucleico secuencia abajo en una planta; opcionalmente, una secuencia líder 5' no traducida; una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de interés; y una región 3' no traducida que codifica una señal de poliadenilación que funciona en células de plantas para causar la terminación de la transcripción y la adición de nucleótidos de poliadenilato al extremo 3' del ARNm que codifica la proteína. El promotor puede ser homólogo o heterólogo a la secuencia estructural del ácido nucleico. Las secuencias reguladoras 5' a 3' típicas incluyen un sitio de inicio de la transcripción, un sitio de unión a ribosoma, una señal de procesamiento del ARN, un sitio de terminación de la transcripción, y/o una señal de poliadenilación. Los vectores de transformación de plantas también contienen generalmente un marcador de selección o de información. La expresión de la secuencia del marcador de selección o de información da como resultado un fenotipo que permite la diferenciación de tejidos de remolacha transgénica y no transgénica.

En la presente invención puede usarse cualquier marcador de selección adecuado para la transformación de plantas. Los ejemplos de marcadores de selección informados como funcionales en plantas incluyen EPSPS (Klee y col., Mol. Gen. Genet. 210(3): 437, 1987), neomicina fosfotransferasa (Loopstra y col., Plant Mol. Biol. 15(1): 1, 1990), higromicina fosfotransferasa (Meijer y col., Plant Mol. Biol. 16(5): 807, 1991), resistencia a metotrexato (Irdani y col., Plant Mol. Biol. 37(6): 1079, 1998), fosfinotricina acetil transferasa (Shen y col., J. Gen. Virol. 76: 965, 1995), y resistencia a clorsulfuron (Lee y col., Plant Cell 2(5): 415, 1990). Los marcadores de información descritos como funcionales en plantas incluyen GFP (Niwa y col., Plant J. 18(4): 455, 1999), GUS (Suzuki y col., Plant Cell. Physiol. 40(3): 289, 1999), CAT (Leisy y col., Plant Mol. Biol. 14(1): 41, 1990), y luciferasa (Macknight y col., Plant Mol. Biol. 27(3): 457, 1995). En algunos casos, la secuencia codificadora estructural de ácido nucleico puede también funcionar como la secuencia del marcador de selección o de información.

A la luz de esta descripción, resultarán evidentes para los expertos en la técnica otros numerosos genes marcadores de selección o de información posibles, elementos reguladores, y otras secuencias de interés. Por consiguiente, la anterior discusión tiene la intención de ser ejemplar más que exhaustiva.

En particular, la invención está dirigida hacia un procedimiento para la preparación de plantas transgénicas de remolacha, comprendiendo el procedimiento: seleccionar una plántula de remolacha, comprendiendo la plántula una región cotiledónea y una región de hipocótilo; retirar la región cotiledónea y la mitad superior de la región de hipocótilo de la plántula; poner en contacto la región cotiledónea y la mitad superior de la región de hipocótilo con medio de micropropagación para formar un brote de micropropagación, comprendiendo el brote de micropropagación al menos una hoja o porción de la misma que incluye la base de la hoja en la que dicha base de hoja comprende la posición inferior de la hoja donde la hoja está unida al brote micropropagado; retirar una hoja del brote de micropropagación separando la hoja en la base de la hoja; y poner en contacto el explante de la hoja en el área de la base de la hoja con *Agrobacteria*. La hoja puede separarse en la base de la hoja previo a la inoculación con *Agrobacterium* por cualquier cantidad de procedimientos, pero de preferencia se corta la hoja en la base de la hoja usando un instrumento adecuado tal como un escalpelo y el área de corte se pone en contacto con el cultivo de *Agrobacterium*. El explante se cocultiva con *Agrobacteria*, en el que la *Agrobacteria* comprende un vector, comprendiendo el vector, operativamente unido en la orientación 5' a 3': un promotor que dirige la transcripción de una secuencia estructural de ácido nucleico; una secuencia estructural de ácido nucleico; y un terminador de transcripción 3', y tras la incubación con *Agrobacterium*, el explante infectado de la hoja comprende una célula transgénica de remolacha.

El explante de hoja comprende la base de la hoja definida en este documento como la porción inferior de la hoja donde la hoja contacta con la región de la base del explante (ver Figuras 5 y 6 para ilustraciones del cultivo micropropagado de remolacha). En la presente invención puede usarse cualquier hoja que comprende una base de hoja. Puede usarse la hoja entera o cualquier porción de la misma que comprende la base de la hoja. De preferencia, para el procedimiento de transformación se escinde la hoja en la base de la hoja y se usa la hoja intacta que comprende la base de la hoja. La base de la hoja comprende la porción inferior de las hojas donde las hojas están unidas al brote micropropagado. Por consiguiente el explante de hoja incluye cualquier hoja o porción de una hoja que incluye la base de la hoja. En consecuencia, el explante de hoja puede incluir pero no está limitado al 10% inferior de la hoja, el 25% inferior, 50%, o la hoja entera o porciones de la misma, comprendiendo todos una base de hoja. El cultivo micropropagado de remolacha comprende múltiples capas de hojas que están unidas en la base de hoja. Por consiguiente, puede usarse cualquier hoja en cualquier capa incluyendo cualquier hoja interna o externa que comprende una base de hoja (ver Figuras 5 y 6). De preferencia, se seleccionan las hojas más externas de modo que las hojas más internas se dejan intactas. Las hojas restantes pueden micropropagarse o almacenarse y cultivarse *in vitro*. Las hojas restantes y las hojas emergidas nuevas pueden usarse más tarde como una fuente de explante para futuros experimentos.

La *Agrobacteria* puede ser generalmente cualquier *Agrobacteria*, y de preferencia es *Agrobacterium tumefaciens*. Las cepas de preferencia incluirán pero no están limitadas a la cepa C58 de *Agrobacterium tumefaciens*, una cepa de tipo nopalina que se usa para mediar la transferencia de ADN en células de plantas, cepas de tipo octopina tales como LBA4404 o cepas de tipo succinamopina, por ejemplo, EHA101 o EHA105. El uso de estas cepas para la transformación de plantas ha sido reseñado y los procedimientos son familiares para los expertos en la técnica. La secuencia estructural de ácido nucleico puede ser cualquier secuencia transcribible que confiere una propiedad deseable a la planta. De preferencia, la secuencia estructural de ácido nucleico codifica una proteína o una secuencia de ARN complementaria.

Una forma de realización alternativa está dirigida hacia procedimientos para la preparación de plantas transgénicas de remolacha a partir de un cultivo de micropropagación. Se cultiva un cultivo de micropropagación para formar un brote micropropagado, comprendiendo el brote micropropagado al menos un explante de hoja que incluye una base de hoja; retirando una hoja en la base de la hoja del brote micropropagado; y poniendo en contacto el explante de hoja en la base de la hoja con *Agrobacteria* en el que: la *Agrobacteria* comprende un vector, comprendiendo el vector, operativamente unido en la orientación 5' a 3': un promotor que dirige la transcripción de una secuencia estructural de ácido nucleico; una secuencia estructural de ácido nucleico; y un terminador de transcripción 3'. Tras la incubación con *Agrobacterium* el explante de hoja infectado comprende una célula transgénica de remolacha. La *Agrobacteria* puede generalmente ser cualquier *Agrobacteria*, y de preferencia es *Agrobacterium tumefaciens*. La secuencia estructural de ácido nucleico puede ser cualquier secuencia transcribible que confiere una propiedad deseable a la planta. De preferencia, la secuencia estructural de ácido nucleico codifica una proteína o una secuencia de ARN complementaria.

Como se estableció anteriormente, la invención proporciona un procedimiento para la preparación de plantas transgénicas de remolacha. El procedimiento; de preferencia comprende seleccionar una plántula de remolacha, comprendiendo la plántula de remolacha una región cotiledónea y una región de hipocótilo; retirar la región cotiledónea y la mitad superior de la región del hipocótilo de la plántula; poner en contacto la región cotiledónea y la mitad superior de la región del hipocótilo con medio de micropropagación para formar un brote micropropagado, comprendiendo el brote micropropagado al menos una hoja que comprende una base de hoja; retirar una hoja del brote micropropagado en la base de la hoja; poner en contacto la hoja con *Agrobacteria* en el área de la base de la hoja para formar una hoja infectada en la que: la *Agrobacteria* comprende un vector, vector que comprende, unido operativamente en orientación 5' a 3': un promotor que dirige la transcripción de una secuencia estructural de ácido nucleico, una secuencia estructural de ácido nucleico, y un terminador de transcripción 3'; cultivar el explante de hoja infectada para formar un brote transgénico; cultivar el brote transgénico para formar un brote transgénico con raíz; y hacer crecer el brote enraizado transgénico para formar una planta transgénica de remolacha. La *Agrobacteria* puede generalmente ser cualquier *Agrobacteria*, y de preferencia es *Agrobacterium tumefaciens*. La secuencia estructural de ácido nucleico puede ser cualquier secuencia transcribible que confiere una propiedad deseable a la planta. De preferencia, la secuencia estructural de ácido nucleico codifica una proteína o una secuencia de ARN complementaria. La semilla de remolacha puede esterilizarse por cualquier procedimiento aceptable, y de preferencia poniendo en contacto la semilla de remolacha con hidróxido de sodio, hipoclorito de sodio, etanol o captano. La semilla de remolacha se hace germinar de preferencia en la oscuridad o en condiciones de baja luminosidad. El medio de micropropagación puede generalmente ser cualquier medio de micropropagación aceptado en la técnica. Los ejemplos de medios adecuados incluirían pero no se limitan a medios basados en MS (Murashige and Skoog, *Physiol. Plant*, 15:473, 1962) o medios basados en N6 (Chu y col., *Scientia Sinica*, 18:659, 1975) suplementados con aditivos de medios que pueden incluir pero no se limitan a aminoácidos, macroelementos, hierro, microelementos, vitaminas y sustancias orgánicas, carbohidratos, componentes indefinidos de medios tales como hidrolizados de caseína, un agente gelificante adecuado tal como una forma de agar, tal como una agarosa de bajo punto de fusión o Gelrite si se desea. Resulta familiar para los expertos en la técnica la diversidad de medios de cultivo de tejidos, que cuando se suplementan adecuadamente, soportan el crecimiento y desarrollo de tejidos de plantas y son adecuados para la transformación y regeneración de plantas. Estos medios de cultivo de tejidos pueden adquirirse como una preparación comercial, o prepararse y modificarse a medida. El medio seleccionado puede suplementarse con aditivos adecuados dependiendo de la etapa en el procedimiento de transformación. Por ejemplo, para micropropagación, puede usarse un medio denominado en este documento como medio de micropropagación que soporta el crecimiento y mantenimiento de tejido de plantas *in vitro*. Por consiguiente, en otras etapas del procedimiento de transformación que incluyen pero no se limitan a germinación, inducción de brotes, e inducción de raíces, se usan medios suplementados con aditivos adecuados y pueden incluir pero no se limitan a medios tales como Linsmaier y Skoog (Linsmaier and Skoog, *Physiol. Plant.*, 18:100, 1965), Uchimiya y Murashige (Uchimiya y Murashige, *Plant Physiol.* 54:936, 1974), medio de Gamborg (Gamborg y col., *Exp. Cell Res.*, 50:151, 1968), Medio de McCown para Plantas Leñosas (McCown y Loyd, *Hort. Science*, 16:453, 1981), Nitsch y Nitsch (Nitsch y Nitsch, *Science* 163:85-87, 1969), y Schenk y Hildebrandt (Schenk y Hildebrandt, *Can J. Bot.* 50:199, 1972) o derivaciones de estos medios suplementados adecuadamente. Los expertos en la técnica saben que los medios y suplementos de medios tales como nutrientes y reguladores de crecimiento para uso en diversas etapas del mantenimiento y transformación de la planta, y en las etapas de regeneración además de otras condiciones de cultivo tales como la intensidad de luz durante la incubación, pH, y temperaturas de incubación pueden optimizarse para una variedad particular de planta.

El siguiente protocolo experimental es ilustrativo de la invención. Un experto apreciará que pueden hacerse diversas modificaciones en materiales, medios, duración de los procedimientos, temperatura, y condiciones de luminosidad sin apartarse de la invención.

Esterilización de las Semillas

Las semillas pueden esterilizarse usando cualquier procedimiento aceptable. El siguiente procedimiento ha demostrado ser eficaz.

Se agregan semillas de remolacha a una solución que contiene hidróxido de sodio aproximadamente 1N y se agitan durante aproximadamente una hora a temperatura ambiente. Se decanta el líquido, y se aclaran las semillas con agua destilada para eliminar el hidróxido de sodio residual. Se agrega agua fría, y se agitan las semillas durante aproximadamente una hora. Se retiran las semillas del líquido, y se retira una pequeña porción de la cubierta de la semilla de cada embrión para exponer una porción del embrión de la semilla. Se aclaran las semillas brevemente con etanol al 95%. Se decanta la solución de etanol, y se agitan las semillas en una solución diluida al 2,5% p/v de hipoclorito de sodio durante aproximadamente veinte minutos. Se elimina el líquido, y se aclaran las semillas en agua destilada estéril tres veces. Se agrega captano (un polvo humedecible usado como una solución acuosa para el control de ciertas enfermedades fúngicas, Micro Flo Co., Lakeland, FL) y una pequeña cantidad de agua estéril suficiente para cubrir las semillas. Se empapan las semillas durante al menos una hora. Si se desea se puede continuar empapando las semillas durante la noche.

Germinación de las Semillas

Las semillas pueden hacerse germinar usando cualquier procedimiento aceptable. El siguiente procedimiento ha demostrado ser eficaz. En vez de las formulaciones de medios que se describen a continuación, pueden resultar adecuadas otras formulaciones de medios que incluyen pero no se limitan a aquellas descritas anteriormente para promover la germinación.

Se transfieren las semillas desde la suspensión de captano a placas que contienen medio MSMO (Tabla 1). Se colocan aproximadamente 15 semillas en cada placa de germinación de 100 X 25 mm. Se colocan las placas en bolsas, de preferencia en bolsas plásticas sin agujeros. De preferencia las semillas se hacen germinar en la oscuridad y se colocan las bolsas en la oscuridad a aproximadamente 20°C-25°C, de preferencia a aproximadamente 23°C-24°C. La incubación en la oscuridad puede realizarse de cualquier manera que incluye pero no se limita a colocar las bolsas en una caja de cartón sellada. La duración óptima de almacenamiento en la oscuridad varía por genotipo de remolacha, pero típicamente variará entre dos y cuatro semanas. El recubrimiento de las semillas se retira cuidadosamente de las plántulas germinadas, y posteriormente se transfieren las plántulas a recipientes que contienen medio MSMO. Se incuban las plántulas a aproximadamente 23°C-24°C durante aproximadamente 1-5 días, de preferencia aproximadamente 2 días. El fotoperíodo durante la incubación se mantiene en un ciclo de aproximadamente 16:8 luz:oscuridad.

TABLA 1
Medio MSMO

Componente	Concentración
Sales de MSMO (Sigma M-6899)	4,4 g/l
Sacarosa	30 g/l
Fitagar	7 g/l

Inicio y Mantenimiento de Cultivos de Brotes Micropropagados

Los cultivos de brotes micropropagados pueden iniciarse usando cualquier procedimiento aceptable. El siguiente procedimiento ha demostrado ser eficaz en el laboratorio. Otras formulaciones de medios como las descritas anteriormente pueden ser adecuadas para iniciar los cultivos de brotes micropropagados en lugar de las formulaciones de medios que se describen a continuación.

Se retira cuidadosamente la mitad inferior de la región del hipocótilo de las plántulas germinadas. Se transfieren la porción de las plántulas que contiene cotiledones y la porción superior del hipocótilo al medio MSMO que contiene 0,1 mg/l de 6-bencilaminopurina. Tras tres semanas de incubación con iluminación como anteriormente, se transfieren los brotes a medio fresco. Tras otras tres semanas, las hojas pueden usarse para la transformación. De preferencia, se usan las hojas más externas y las hojas más internas se usan para mantener el tejido *in vitro*. Para mantenimiento de los cultivos micropropagados, tras retirar las hojas para la transformación posterior, se transfiere la región apical y más interna de la hoja (generalmente aproximadamente 0,5-3,0 cm) a medio fresco para mantener los cultivos de brotes micropropagados (ver Figuras 5 y 6). La Figura 5 ilustra una vista superior de un cultivo micropropagado de remolacha. La Figura 6 ilustra una vista lateral que representa las hojas externas, hojas internas, el área de base de hojas, y el área de corte o de herida donde se retiran las hojas en la base de la hoja. Los cultivos micropropagados de remolacha de preferencia se transfieren a medio fresco al menos una vez al mes para mantener cultivos sanos y una fuente lista de tejidos para transformación. Manteniendo el tejido de remolacha de esta manera, se dispone

ES 2 281 373 T3

constantemente de material de explante adecuado para transformación sin necesidad de iniciar cultivos a partir de semillas, ahorrando al menos un mes en el procedimiento.

Preparaciones de Cultivos Bacterianos

Los cultivos bacterianos pueden prepararse usando cualquier procedimiento aceptable. El siguiente procedimiento ha demostrado ser eficaz en el laboratorio. Otras formulaciones de medios pueden ser adecuadas para preparar cultivos bacterianos en lugar de las formulaciones de medios descritas a continuación. Puede usarse cualquier cepa adecuada de *Agrobacterium* para la participación en los procedimientos de la invención, y resulta de preferencia *Agrobacterium tumefaciens*. Los procedimientos para el crecimiento y mantenimiento de cultivos de *Agrobacterium* son conocidos por aquellos expertos en la técnica.

Los *Agrobacterium tumefaciens* que contienen la secuencia de ADN exógeno para transferir a la remolacha se plaquean típicamente en medio LB que contiene antibióticos selectivos (ver por ejemplo medio LBsck suplementado con espectinomicina, cloranfenicol, y kanamicina, Tabla 2). Las bacterias se cultivan a temperatura ambiente durante aproximadamente dos a tres días. Las bacterias se usan para iniciar los cultivos líquidos en LBsck dos días antes de la transformación con el objeto de lograr una densidad celular adecuada. Las bacterias se diluyen aproximadamente 100 veces en medio ABsck (Tabla 3) o medio YEP (Tabla 4). Se usan aproximadamente 2 ml de medio por cultivo, aunque un experto en la técnica reconocerá que variar la escala del cultivo no impactará significativamente en el crecimiento de las bacterias. Se deja incubar los cultivos durante la noche en un agitador orbital. Los cultivos bacterianos se diluyen aproximadamente 12,5 veces en medio ABsck o medio ABsck suplementado con acetosiringona 200 μ M, de preferencia con un volumen total de aproximadamente 50 ml. Se colocan los cultivos en un agitador orbital y se incuban aproximadamente a 26°C durante la noche. Se controla el cultivo hasta que alcanza una densidad celular de aproximadamente $3,0 \times 10^9$ células/ml, que corresponde a una DO_{600} de aproximadamente 1. Se ajusta el volumen con medio TXD (Tabla 5) para dar una densidad celular de aproximadamente 1×10^9 células/ml.

TABLA 2

Medio LBsck

Componente	Concentración
Peptona	10 g/l
Extracto de levaduras	5 g/l
Cloruro sódico	5 g/l
Bactoagar Difco	15 g/l
Espectinomicina	100 mg/l
Cloranfenicol	25 mg/l
Kanamicina	50 mg/l

TABLA 3

Medio ABsck

Componente	Concentración
Glucosa	5 g/l
Fitagar	7,5 g/l
Sales de AB	25 ml/l
Tampón de AB	25 ml/l
Espectinomicina	0,1 mg/l
Cloranfenicol	0,025 mg/l
Kanamicina	0,05 mg/l

ES 2 281 373 T3

Sales de AB (500 ml): 10 g de NH_4Cl , 12,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,5 g de KCl , 0,1 g de CaCl_2 o 0,132 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 25 mg de FeSO_4 o 45,55 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Tampón de AB (500 ml): 39,33 g de $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ o 30,0 g de K_2HPO_4 , 11,5 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

TABLA 4

Medio YEP

Componente	Concentración
Extracto de levaduras	10 g/l
Peptona	10 g/l
Cloruro sódico	5 g/l
pH = 7	

TABLA 5

Medio TXD

Componente	Concentración
Sales de MS con vitamina B5 (Sigma M0404)	4,4 g/l
PCPA	4 mg/l
Kinetina	5 $\mu\text{g/l}$
Sacarosa	30 g/l
pH ajustado hasta 5,8	

40 Preparación de Placas de Cocultivo

Las placas de cocultivo pueden prepararse usando cualquier formulación de medio aceptable. Pueden resultar adecuadas otras formulaciones diferentes de las descritas a continuación.

45 Se vierte en las placas que contienen 1/10 de medio MS (Tabla 6) de preferencia suplementado con acetosiringona 200 μM y ácido galacturónico 1 mM. La acetosiringona y el ácido galacturónico se agregan al medio MS tras el autoclavado. Se coloca un papel de filtro estéril en la parte superior del medio sólido y se humedece con medio TXD previo al uso con los explantes.

TABLA 6

Medio MS

Componente	Concentración
Sales de MS (Sigma)	4,4 g/l
Sacarosa	30 g/l
Vitamina SB N° 1	2 ml/l
Vitamina SB N° 2	1 ml/l
pH = 5,95	

Explantos de Base de Hoja

Los explantes pueden realizarse usando cualquier procedimiento aceptable. El siguiente procedimiento ha demostrado ser eficaz. Otras formulaciones de medios como las descritas anteriormente pueden resultar adecuadas para realizar explantes en lugar de las formulaciones de medios que se describen a continuación.

Se escinden hojas de los brotes micropropagados y se transfieren a una placa de petri que contiene papel de filtro estéril humedecido con medio TXD. En la presente invención pueden usarse hojas de cualquier parte del brote micropropagado. En consecuencia, puede usarse cualquier hoja interna o externa para posterior transformación. De preferencia se usan las hojas más externas. La hoja incluye el filo de la hoja y la base de la hoja y puede escindirse de cualquier manera. De preferencia se retiran las hojas cortando la hoja en la base de la hoja (ver Figura 6) para que la hoja esté intacta en primer lugar y el sitio de la herida esté en la base de la hoja. Tras escindir aproximadamente 25 hojas de los brotes micropropagados, se transfieren los explantes al cultivo bacteriano diluido y se incuban. La duración de la incubación de los explantes de hojas con *Agrobacterium* puede durar cualquier período de tiempo. De preferencia el período de incubación con *Agrobacterium* es de hasta sesenta minutos, de más preferencia aproximadamente quince a veinte minutos y la incubación se realiza de una manera que expone el sitio de la herida al cultivo de *Agrobacterium*. De preferencia el sitio más bajo de la herida del explante de hoja en la base de la hoja está en contacto con el cultivo de *Agrobacterium*. Se retiran los explantes del cultivo bacteriano, se secan con papel de filtro estéril tal como papel de filtro Whatman, y se transfieren a placas de cocultivo.

El período de cocultivo puede durar cualquier período de tiempo, De preferencia la duración del cocultivo es de hasta cinco días. De más preferencia, el período de cocultivo es desde aproximadamente dos hasta cinco días. De más preferencia aún, el período de cocultivo es de cuatro días. Se colocan las placas de cocultivo en bolsas plásticas selladas y se incuban durante aproximadamente cuatro días a aproximadamente 22°C-24°C. Se usa un fotoperíodo de aproximadamente 16:8 luz:oscuridad para la incubación.

De manera opcional, pueden escindirse las hojas de brotes micropropagados como se describió anteriormente, y transferirse directamente a placas de cocultivo durante un período de precultivo durante la noche a aproximadamente 22°C-24°C previo al agregado del cultivo bacteriano. Aunque es de preferencia el precultivo durante la noche, resulta también eficaz precultivar al menos durante aproximadamente seis horas. Tras el período de precultivo, se infectan los explantes con *Agrobacterium* agregando la suspensión bacteriana directamente a los explantes en las placas de cocultivo. Tras una incubación de aproximadamente veinte minutos, pueden eliminarse las bacterias por cualquier manera que incluye la aspiración y los explantes pueden permanecer en las mismas placas durante el período de cocultivo.

Condiciones de Cultivo y Selección

Los explantes pueden cultivarse y seleccionarse usando cualquier procedimiento aceptable. El siguiente procedimiento ha demostrado ser eficaz. Otras formulaciones de medios como las descritas anteriormente pueden ser adecuadas para cultivo y selección en lugar de las formulaciones de medios que se describen a continuación.

Los explantes se transfieren de las placas de cocultivo a un medio de cultivo. De preferencia, el medio de cultivo es un medio basado en MS suplementado con 0,5 mg/l de bencilaminopurina (BAP) o benciladenina (BA), 0,05 mg/l de ácido 1-naftalenacético, 500 mg/l de carbenicilina, y 100 mg/l de cefotaxima. Las condiciones de cocultivo pueden variar dependiendo del marcador de selección. Para la selección con glifosato de (N-fosfonometilglicina), se colocan los explantes infectados en un medio de retardo sin el agregado del agente selectivo glifosato. La duración del período de retardo depende del genotipo usado. Se realizan experimentos con cada genotipo para determinar la duración óptima del período de retardo. Típicamente, el período de retardo puede presentarse durante hasta diez días. De preferencia el período de retardo sin selección es de aproximadamente dos a siete días. De más preferencia aún, el período de retardo sin selección es de aproximadamente seis días a aproximadamente 24°C de preferencia en bolsas plásticas con agujeros. Se realizan experimentos con cada genotipo para determinar el nivel óptimo de agente selectivo. Para la selección con glifosato, tras un período de retardo, se transfieren los explantes infectados del medio de retardo (sin glifosato) a un medio basado en MS suplementado con 0,50 mg/l de benciladenina, 0,05 mg/l de ácido 1-naftalenacético, 500 mg/l de carbenicilina, 100 mg/l de cefotaxima, y glifosato 0,05-0,10 mM (de preferencia glifosato aproximadamente 0,075 mM). Los explantes pueden cultivarse durante aproximadamente dos a cuatro semanas en el medio de selección. De preferencia, los explantes se cultivan durante aproximadamente tres, cuatro semanas aproximadamente a 24°C, de preferencia en bolsas plásticas con agujeros. Se usa un fotoperíodo de aproximadamente 16:8 luz:oscuridad para el período de cultivo. Los explantes se transfieren al mismo medio que contiene el agente de selección adecuado cada tres semanas. Generalmente, son suficientes dos a tres transferencias para identificar una planta transgénica.

Procedimientos de Micropropagación y Enraizamiento

La micropropagación y el enraizamiento pueden realizarse usando cualquier procedimiento adecuado. El siguiente procedimiento demostró ser eficaz. Otras formulaciones de medios como las descritas anteriormente pueden resultar adecuadas para la micropropagación y el enraizamiento en lugar de las formulaciones de medios que se describen a continuación.

ES 2 281 373 T3

La micropropagación es beneficiosa para reducir o eliminar tejidos quiméricos indeseables. El uso de micropropagación es especialmente útil para obtener las plantas transgénicas deseadas y ahorra tiempo al eliminar la necesidad de obtener material de plantas de partida a partir de semillas.

- 5 El tejido puede mantenerse en una cantidad de recipientes de cultivo de tejidos que incluyen pero no se limita a placas de petri y copas de sundae.

Los brotes transformados se transfieren al medio de micropropagación que contiene medio basado en MS suplementado con 0,5 mg/l de 6-benciladenina, 500 mg/l de carbenicilina, y 100 mg/l de cefotaxima. Los brotes se cultivan y dividen en este medio hasta la obtención del número deseado de brotes. De preferencia, para la selección con glifosato, puede agregarse glifosato al medio de micropropagación para ayudar en la selección del material clónico. Por material clónico como se usa en este documento se entiende que el brote entero está transformado y no contiene material quimérico de plantas que está constituido por tejido transformado y no transformado. Se enraizan los brotes individuales en 1/2 de medio MS suplementado con 5 mg/l de ácido indolbutírico, 100 mg/l de cefotaxima, y 500 mg/l de carbenicilina. Las raíces deberían aparecer en aproximadamente 4-12 semanas. Los brotes enraizados pueden transplantarse en el suelo, de preferencia Metro Mix 350 (Metro Mix es una marca registrada de Scotts Company, Marysville, OH).

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar formas de realización de preferencia de la invención. Los expertos en la técnica apreciarán que las técnicas descritas en los ejemplos que siguen representan técnicas que los autores de la invención han descubierto que funcionan bien en la práctica de la invención, y por lo tanto puede considerarse que constituyen modos de preferencia para su práctica. Sin embargo, los expertos en la técnica podrían, a la luz de la presente descripción, apreciar que pueden realizarse muchos cambios en las formas de realización específicas que se describen y obtenerse un resultado igual o similar sin apartarse del espíritu y alcance de la invención.

25 Ejemplos

Ejemplo 1

30 Construcciones de plásmidos

Todas las construcciones descritas en los Ejemplos son vectores de transformación de plantas de doble borde que contienen un origen de replicación de *E. coli* (ori322), un origen de replicación de un amplio intervalo de huéspedes (ori-V), y una región codificadora (Spc/Str) para Tn7 adeniltransferasa, que confiere resistencia a espectinomicina y a estreptomycin. Para la transformación de plantas, la cepa bacteriana huésped usada fue *Agrobacterium tumefaciens*, cepa ABI. El promotor, región codificadora y terminadores 3' se indican entre paréntesis.

P-e35S es el promotor para ARN 35S de CaMV que contiene una duplicación de la región -90 a -300 como se describe en la Patente de EEUU N° 5.424.200; P-FMV es el promotor 35S del Virus del Mosaico de Figwort como se describe en la Patente de EEUU N° 5.378.619; P-aa-chit es el promotor para quitinasa ácida de *Arabidopsis* como describen Samac y Shah (Plant Cell 3:1063, 1991); AEPSPS/CTP2 es la región del péptido de tránsito de EPSPS de *Arabidopsis* (ácido 5-enolpiruvil-3-fosfoshikímico sintasa) como se describe en la Patente de EEUU N° 5.633.435; CP4syn es la región codificadora para CP4 EPSPS (secuencia sintética) como se describe en la Patente de EEUU N° 5.633.435; fbp es la secuencia codificadora para fructosa 1,6-bisfosfatasa de *E. coli* como describen Hamilton y col. (Nucleic Acids Res. 16: 8707, 1988); glgC16 es un gen de ADP glucosa fosforilasa de *E. coli* como se describe en la Patente de EEUU N° 5.648.249; mz SPS es la región codificadora para sacarosa fosfato sintasa de maíz como se describe en la Patente de EEUU N° 5.750.869; E9 3' es el extremo 3' del gen rbc del guisante E9, que funciona como una señal de poliadenilación; 7S es la señal de terminación 3' del gen de la proteína de almacenamiento de semillas de soya 7S; GUS: 1 es la secuencia codificadora del gen de beta-glucuronidasa de *E. coli* (Jefferson, R. A., Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU. 83: 8447-8451, 1987) modificada para contener un sitio de restricción NcoI (CCATGG) en el codón de inicio.

Ejemplo 2

55 Transformación con ABI pMON17303

Se escindieron las hojas más externas directamente de los brotes micropropagados de remolacha y se usaron como explantes para transformación. Se cortaron las hojas en la base de la hoja y se incubaron con *Agrobacterium* para que el área de la base de la hoja estuviera en contacto con el cultivo de *Agrobacterium*. La cepa ABI de *Agrobacterium tumefaciens* contenía la construcción pMON17303 (P-e35S/mz SPS/E9 3', P-FMV/CP4syn/E9 3'; Figura 1) y el procedimiento de transformación fue como el descrito en la Descripción Detallada de la Invención. No se usó precultivo en las transformaciones que usan esta construcción. La selección de células transformadas se realizó usando glifosato 0,075 mM. A partir de 573 explantes, se obtuvieron 3 plantas transformadas para una eficacia de transformación de 0,5%.

65

Ejemplo 3

Transformación con la Construcción ABI pMON13819

5 Se escindieron las hojas más externas directamente de los brotes micropropagados de remolacha y se usaron como explantes para transformación. Se cortaron las hojas en la base de la hoja y se incubaron con *Agrobacterium* para que el área de la base de la hoja estuviera en contacto con el cultivo de *Agrobacterium*. La cepa ABI de *Agrobacterium tumefaciens* contenía la construcción pMON13819 (P-e35S/fbp/E9 3', P-FMV/CP4syn/E9 3'; Figura 2). La transformación y la selección se realizaron como se describió en el Ejemplo 2 y en la Descripción Detallada de la Invención. 10 A partir de 1875 explantes, se obtuvieron 52 plantas transformadas para una eficacia de transformación de 3%.

Ejemplo 4

Transformación con la Construcción ABI pMON13835

15 Se escindieron las hojas más externas directamente de los brotes micropropagados de remolacha y se usaron como explantes para transformación. Se cortaron las hojas en la base de la hoja y se incubaron con *Agrobacterium* para que el área de la base de la hoja estuviera en contacto con el cultivo de *Agrobacterium*. La cepa ABI de *Agrobacterium tumefaciens* contenía la construcción pMON13835 (P-e35S/mz SPS/E9 3', P-FMV/CP4syn/E9 3'; Figura 3). 20 La transformación y la selección se realizaron como se describió en el Ejemplo 2 y en la Descripción Detallada de la Invención. A partir de 2580 explantes, se obtuvieron 12 plantas transformadas para una eficacia de transformación de 0,5%.

Ejemplo 5

Transformación con la Construcción ABI pMON13851

25 Se escindieron las hojas más externas directamente de los brotes micropropagados de remolacha y se usaron como explantes para transformación. Se cortaron las hojas en la base de la hoja y se incubaron con *Agrobacterium* para que el área de la base de la hoja estuviera en contacto con el cultivo de *Agrobacterium*. La cepa ABI de *Agrobacterium tumefaciens* contenía la construcción pMON 13851 (P-e35S/mzSPS/E93'/P-FMV/CP4syn/E93'; Figura 4). La transformación y la selección se realizaron como se describió en el Ejemplo 2 y en la Descripción Detallada de la Invención, con el agregado de una etapa de precultivo durante la noche previo a contactar el tejido de las plantas con *Agrobacteria*. 30 A partir de 2890 explantes, se obtuvieron 14 plantas transformadas para una eficacia de transformación de 0,5%. 35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la preparación de una planta transgénica de remolacha, comprendiendo el procedimiento:

seleccionar una plántula de remolacha, comprendiendo la plántula una región cotiledónea y una región de hipocótilo;

retirar la región cotiledónea y la mitad superior de la región de hipocótilo de la plántula;

poner en contacto la región cotiledónea y la mitad superior de la región de hipocótilo con medio de micropropagación para formar un brote de micropropagación, comprendiendo el brote de micropropagación al menos una hoja o porción de la misma que comprende una base de la hoja, en la que dicha base de hoja comprende la posición inferior de la hoja donde la hoja está unida al brote micropropagado;

retirar una hoja del brote de micropropagación en la base de la hoja;

poner en contacto la base de la hoja con *Agrobacteria* formando un tejido que comprende una célula transgénica de remolacha;

cultivar dicho tejido para formar un brote transgénico;

cultivar el brote transgénico para formar un brote transgénico enraizado; y

hacer crecer el brote transgénico enraizado para formar una planta transgénica de remolacha capaz de expresar una secuencia estructural de ácido nucleico exógeno,

en el que:

la *Agrobacteria* comprende un vector; y

el vector comprende, operativamente unido en orientación 5' a 3': un promotor que dirige la transcripción de una secuencia estructural de ácido nucleico exógeno; una secuencia estructural de ácido nucleico exógeno; y un terminador de transcripción 3'.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la hoja o porción de la misma comprende una hoja externa o porción de la misma.

3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la hoja o porción de la misma comprende una hoja interna o porción de la misma.

4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la semilla de remolacha se germina en la oscuridad.

5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el medio de micropropagación comprende medio MSMO y aproximadamente 0,1 mg/l de 6-aminobencilpurina.

6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el agente de selección comprende glifosato.

7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la *Agrobacteria* es *Agrobacterium tumefaciens*.

8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la secuencia estructural de ácido nucleico codifica una proteína o una secuencia de ARN complementaria.

9. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la hoja o porción de la misma que comprende una base de hoja se precultiva previamente a la etapa de contacto con *Agrobacteria*.

Figura 1

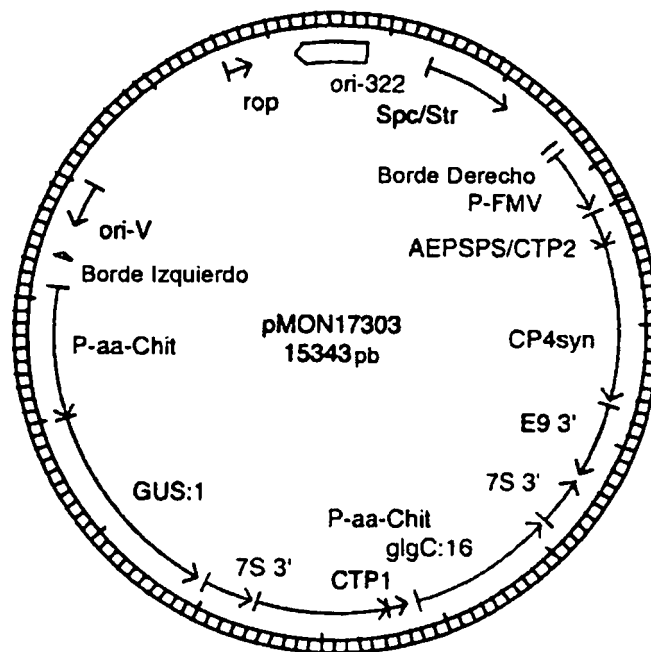


Figura 2

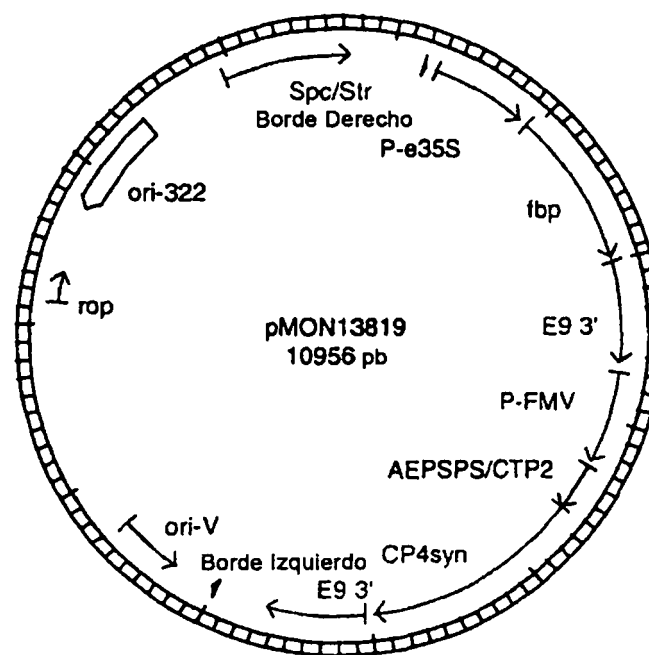


Figura 3

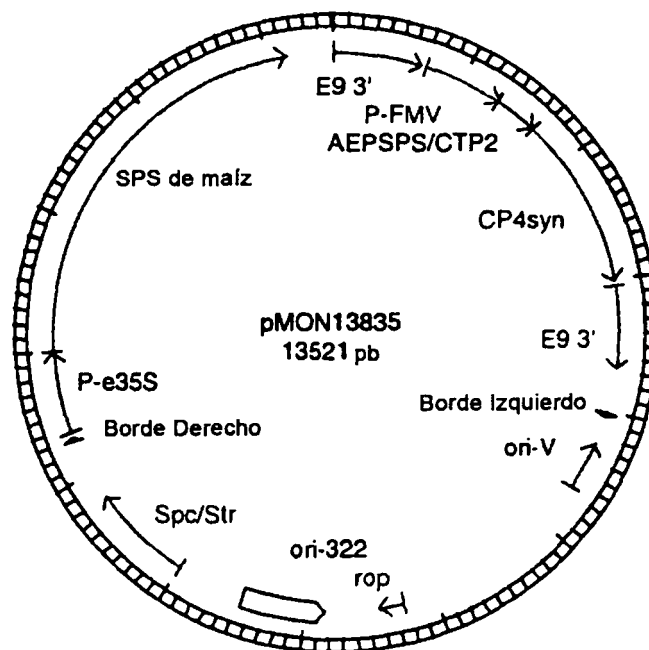
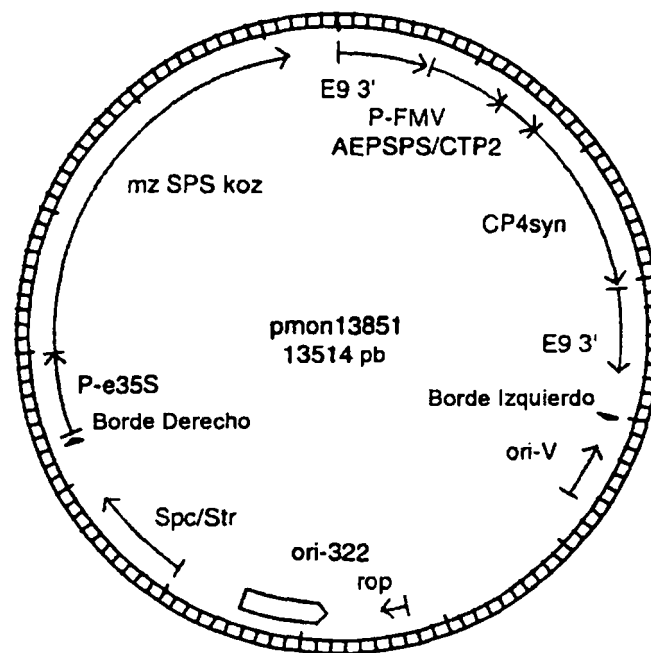


Figura 4



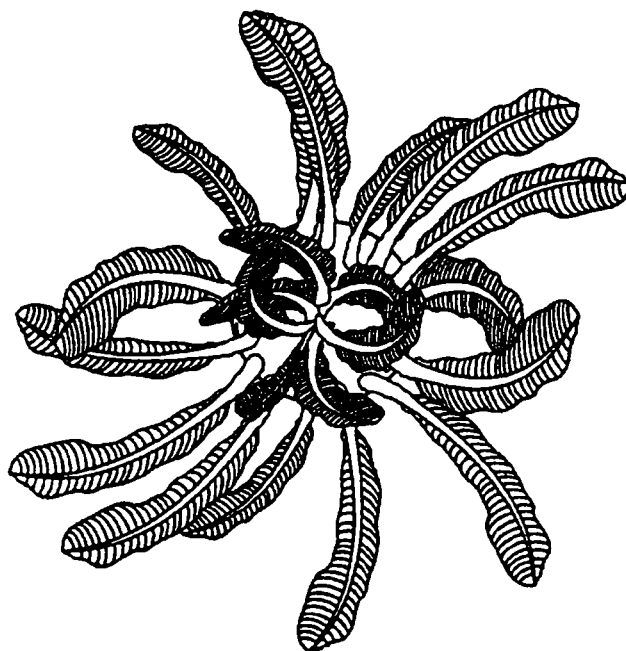


FIG. 5

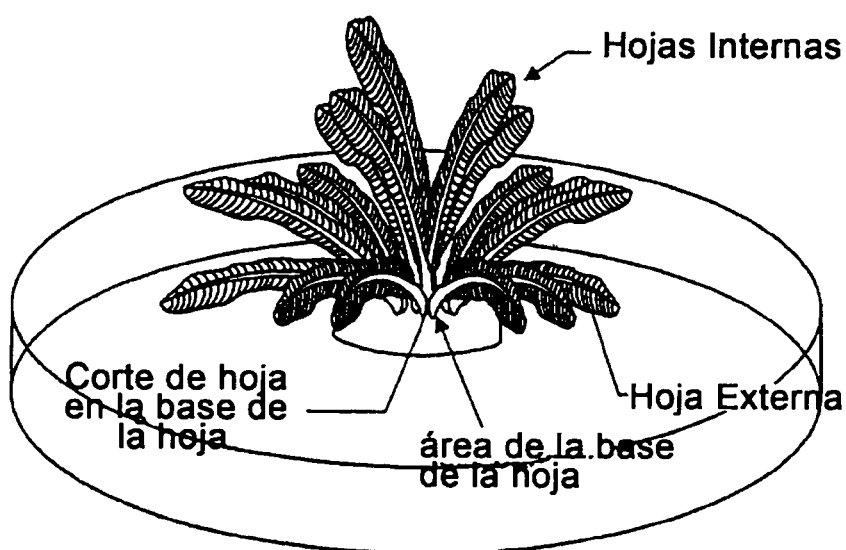


FIG. 6