



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 160 019**

② Número de solicitud: 009801920

⑤ Int. Cl.⁷: A01H 4/00

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

② Fecha de presentación: **11.09.1998**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **16.10.2001**

Fecha de concesión: **01.04.2002**

④ Fecha de anuncio de la concesión: **01.05.2002**

④ Fecha de publicación del folleto de patente:
01.05.2002

⑦ Titular/es:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
C/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES
Centre Nationale de la Recherche**

⑦ Inventor/es: **Chamarro Lapuerta, Jesús;
Pozueta Romero, Javier;
Schantz, Rodolphe y
Houlné, Guy**

⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Procedimiento para la propagación vegetativa y transformación genética de tomate, pimiento y otras dicotiledoneas, mediante Agrobacterium tumefaciens.**

⑤ Resumen:

Procedimiento para la propagación vegetativa y transformación genética de tomate, pimiento y otras dicotiledoneas, mediante *Agrobacterium tumefaciens*. La invención se basa en que, durante la germinación, el endospermo y el embrión poseen los nutrientes y, particularmente, los reguladores del crecimiento, necesarios para el desarrollo de la planta. A medida que avanza la germinación el agotamiento de dichos nutrientes se sustituye por la progresiva producción de los mismos por los cotiledones y la radícula. La eliminación del meristemo primario y los secundarios, conservando un cotiledón y la radícula, priva al explanto de los órganos necesarios para continuar el crecimiento vegetativo. En la zona de corte se forma un callo con células indiferenciadas totipotentes. La aportación de nutrientes y reguladores del crecimiento por parte del cotiledón y de la radícula proporciona los elementos que estimulan la diferenciación de las células del callo para la formación de yemas y tallos. A partir de los mismos se forman las raíces y, finalmente, se obtiene una planta adulta.

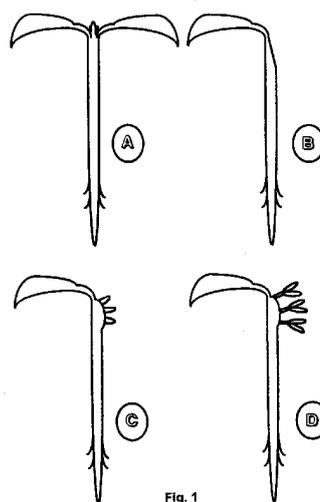


Fig. 1

ES 2 160 019 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCION

Procedimiento para la propagación vegetativa y transformación genética de tomate, pimiento y otras dicotiledoneas, mediante agrobacterium tumefaciens.

Estado de la técnica

La transformación genética de plantas, basada en la utilización de explantos, e infección con *Agrobacterium tumefaciens*, es, en general, un proceso complejo. Para el éxito del sistema es necesario disponer de un sistema con una elevada capacidad organogénica con células receptoras a la infección y a la transformación con *Agrobacterium* capaz de diferenciarse y formar una planta adulta.

En cualquier caso el desarrollo de sistemas con elevada capacidad organogénica continua teniendo un potencial biotecnológico importante para el desarrollo de estrategias de micropropagación [Hicks, G.S. (1994). Shoot induction and organogenesis in vitro: a developmental perspective. *In Vitro Cell Dev Biol*, **30**, 10-15].

En la transformación del pimiento el factor limitante es la obtención de, explantos con una buena capacidad organogénica. En el tomate, los principales problemas son los rendimientos bajos en la transformación y las limitaciones intervarietales de los sistemas de transformación.

Aunque existen numerosas publicaciones en las que se describe el uso de *Agrobacterium tumefaciens* mediante la regeneración de brotes adventicios [McCormick, S., Niedermeyer, J., Fry, J.E., Barnason, A., Horsh, R.B., and Fraley, R.T. 1986. Leaf disc transformation of cultivated tomato (*L. esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports* **5**:81-84; Koornef et al. 1987, M., Jongasma, M., Weide, R., Zabel, P., and Hille, J. 1987. Transformation of tomato. In: *Tomato Biotechnology*, Anonymous Alan R. Liss, Inc., p. 169-178; Fillati, J.J., Kiser, J., Rose, B., & Comai, L. (1987). Efficient transformation of tomato and the introduction and expression of a gene for herbicide tolerance. *Unknown*, 199-210- Chyi, Y.-S., & Phillips, G.C. (1987). High efficiency *Agrobacterium* mediated transformation of *Lycopersicon* based on conditions favorable for regeneration. *Plant Cell Reports*, **6**, 105-108; Bird, C.R., Smith, C.J.S., Ray, J., Moreau, P., Bevan, M.W., Bird, A.S., Hughes, S., Morris, P.C., Grierson, D., & Schuch, W. (1988). The tomato polygalacturonase gene and ripening-specific expression in transgenic plants. *Plant Molecular Biology*, **11**, 651-662; Hamza and Chupeau 1993; VanRoekel, J.S.C., Damm, B., Melchers, L.S., & Hoekema, A. (1993). Factors influencing transformation frequency of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Cell Reports*, **12**, 644-647], la eficacia en la transformación del tomate manifiesta un amplio espectro de variabilidad en función de la variedad, raza de *Agrobacterium*, del antibiótico utilizado en la selección. Por otra parte, la transformación genética del pimiento ha estado limitada por la dificultad para desarrollar un sistema eficaz para la regeneración in vitro de la planta. El factor limitante para la regeneración del pimiento parece ser la elongación de yemas y [Philips y Hubstenberger, 1985; Liu,

W., Parrott, W.A., Hildebrand, D.E., Collins, G.B., & Williams, E.G. (1990). *Agrobacterium* induced gall formation in bell pepper (*Capsicum annuum* L.) and formation of shoot-like structures expressing introduced genes. *Plant Cell Reports*, **9**, 362-364; Arroyo y Revilla 1991; Valera-Montero y Ochoa-Alejo 1992]. Si exceptuamos los procedimientos de [Ezura, H., Nishimiya, S., & Kasumi, M. (1993). Efficient regeneration of plants independent of exogenous growth regulators in bell pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Reports*, **12**, 676-680; Ramírez-Malagón y Ochoa-Alejo, 1996], la regeneración del pimiento se ha realizado utilizando reguladores del crecimiento a partir de cultivos de protoplastos (Saxena et al. 1981, Diaz et al., 1988) de anteras (Vagera y Havranek 1985), mediante embriogénesis somática (Harini y Sita 1993, Binzel et al 1996) y mediante organogénesis de yemas y brotes obtenidos a partir de explantos de plantulas [Agrawal et al. 1989; Arroyo y Revilla, 1991, Phillips y Hubstenberger, 1985; Valera-Moreno y Ochoa-Alejo, 1992; Ebida, A.I.A., & Hu, C. (1993). In vitro morphogenetic responses and plant regeneration from pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Early California Wonder) seedling explants. *Plant Cell Reports*, **13**, 107-110; Christopher, T., & Rajam, M.V. (1994). In vitro cional propagation of *Capsicum* ssp. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **38**, 25-29; Szász et al. 1995, Camille y Phillips 1996]. En cualquier caso, los criterios utilizados para seleccionar las combinaciones de hormonas es mas empírico que científico y los resultados obtenidos dependen del procedimiento utilizado y manifiestan grandes diferencias varietales [Valera-Montero y Ochoa-Alejo, 1992-1 Szász, A., Nervo, G., & Fári, M. (1995). Screening for in vitro shoot-forming capacity of seedling explants in bell pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes and efficient plant regeneration using thidiazuron. *Plant Cell Reports*, **14**, 666-669]. Aunque existen algunos informes sobre transformación genética del pimiento [Lee et al., 1993; Tsafaris, A. (1996). The development of herbicidetolerant transgenic crops. *Field Crops Research*, **45**, 115-123; Zhu et al., 1996, Kim et al., 1997; Manoharan et al., 1998] su eficacia y fiabilidad no ha sido suficientemente contrastada.

Descripción de la invención

La presente invención presenta un nuevo sistema simple, eficaz, que no necesita la adición de hormonas exógenas con una elevada capacidad organogénica útil para la reproducción vegetativa de plantas y de un sistema eficaz para la transformación genética de plantas mediante *Agrobacterium* aplicable a diferentes cultivares de pimiento y tomate basado en la capacidad natural de regeneración de estas especies en un medio exento de reguladores del crecimiento exógenos.

Un pre requisito para obtener un buen sistema de transformación es que el sistema de explantos utilizado posea una elevada capacidad organogénica. Para ello se recurre con frecuencia a complejos estudios con diferentes tipos de explantos, medios nutritivos y combinaciones de reguladores del crecimiento, de carácter cuasi empírico. La revisión de [Hicks, G.S. (1994). Shoot induction and organogenesis in vitro; a developmental

perspective. *In Vitro Cell Dev Biol*, **30**, 10-15], pone en evidencia la complejidad de esta problemática de la que constituyen un ejemplo los trabajos de Ebida, A.I.A., & Hu, C. (1993). In vitro morphogenetic responses and plant regeneration from pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Early California Wonder) seedling explants. *Plant Cell Reports*, **13**, 107-110 para pimiento y Van Roeckel et al. (1993) para tomate. Además dichos procedimientos solamente funcionan satisfactoriamente en un reducido número de cultivares y el rendimiento de explantos que producen plantas transformadas es, en general, bajo (en torno al 5-8%).

La invención se basa en que, durante la germinación, el endospermo y el embrión poseen los nutrientes y, particularmente, los reguladores del crecimiento, necesarios para el desarrollo de la planta. A medida que avanza la germinación el agotamiento de dichos nutrientes se sustituye por la progresiva producción de los mismos por los cotiledones y la radícula. La eliminación del meristemo primario y los secundarios, conservando un cotiledón y la radícula, priva al explanto de los órganos necesarios para continuar el crecimiento vegetativo. En la zona de corte se forma un callo con células indiferenciadas totipotentes. La aportación de nutrientes y reguladores del crecimiento por parte del cotiledón y de la radícula proporciona, de una manera natural, los elementos que estimulan la diferenciación de las células del callo para la formación de yemas y tallos. A partir de los mismos se forman, posteriormente, las raíces y, finalmente, se obtiene una planta adulta.

Un aspecto de la presente invención lo constituye la utilización de un nuevo tipo de explanto al que, por su forma, denominamos "pico de flamenco".

Las principales etapas de dicho proceso son:

- a) Los explantos se obtienen mediante germinación de semillas en medio MSO, en condiciones estériles.
- b) Para la preparación de explantos a partir de plantulas de tomate y pimiento, las primeras hojas verdaderas deben encontrarse en el estadio de primordio o escasamente desarrolladas (Fig.1A).
- c) Con una cuchilla estéril se elimina, cuidadosamente, uno de los cotiledones, el meristemo apical y los meristemos secundarios (Fig.1B).
- d) Al cabo de 2 y 3 semanas de cultivo para tomate y para pimiento, respectivamente, en medio MSO sólido, se desarrolla un callo prominente, en la superficie de corte, del cual emergen yemas y brotes adventicios (Fig.1C).
- e) Los brotes adventicios, cuando han alcanzado 1.5-2 cm de longitud, se separan del callo y se cultivan de nuevo en medio MSO para su enraizamiento (Fig. 1D).
- f) Las plantas enraizadas se transfieren a suelo.

Los explantos en pico de flamenco obtenidos tal como se describe en el párrafo (c) del apartado anterior se precultivan en medio MSO durante 24-48 h. A continuación se infectan durante 48 h con *Agrobacterium* y se pasan a medio MSO que contiene 300 mg/l de cefatoxime, para controlar la proliferación de *Agrobacterium*, y el antibiótico de selección, generalmente 50 mg/l de kanamicina o 10 mg/l de higromicina. Al cabo de 3-4 semanas, los tallos elongados, que emergen de la superficie de corte se escinden y se colocan en nuevo medio MSO selectivo, para su enraizamiento.

Una vez las plantas enraizadas, se pasan a suelo se aclimatan y se transfieren a invernadero.

Descripción de las figuras

Figura 1. Representación secuencial de las etapas de regeneración de plantas a partir de. A) Plantula de pimiento. En esta etapa del desarrollo son visibles los primordios foliares. B) Los explantos en "pico de flamenco" se preparan por excisión de uno de los cotiledones y del meristemo primario y secundarios. C) Desarrollo del callo y regeneración de meristemos a partir de la superficie de corte de los explantos en "pico de flamenco" después de 10-14 días de la excisión.

Figura 2. Eficiencia de la regeneración adventicia de tallos de tomate (cv. Ailsa Craig) y pimiento (cv. Yolo Wonder) a partir de explantos en "pico de flamenco" (círculos abiertos y cerrados respectivamente). Los resultados corresponden a explantos en "pico de flamenco" a las cuatro semanas de la excisión.

Figura 3. Análisis Southern del DNA genómico de varias plantas transformadas obtenidas a partir de un solo explanto en "pico de flamenco" después de la digestión con HindIII. Los explantos se cocultivaron con una cepa LBA4404 (*35SΩGUS*). B: Los explantos se cocultivaron con una cepa C58 (*35SGUS-int*). En ambos casos se utilizó una sonda Gus marcada con ³²P.

Ejemplo de realización de la invención

Capacidad organogénica de los explantos en "pico de flamenco"

Se siembran semillas de pimiento y tomate, esterilizadas superficialmente, en medio MSO, en condiciones asépticas. Al cabo de 10-12 días las plantulas tienen los cotiledones completamente desarrollados y, en algunos casos, se inicia el desarrollo del epicótilo y la formación de los primordios foliares. En este estadio se preparan los explantos escindiendo con una cuchilla, cuidadosamente, uno de los cotiledones juntamente con el meristemo principal y los secundarios. Al cabo de otros 10-14 días de cultivo en medio MSO, en la zona de corte se ha formado un callo prominente del que emergen numerosos tallos adventicios. El número de tallos regenerados, a partir de cada explanto, es bastante variable con un promedio de 4.35 y 1.4 para tomate y pimiento respectivamente (Fig. 2). El promedio de tallos que regeneran de cada explanto son 1.4, 1.2, y 2.2 respectivamente para las variedades de pimiento Permagreen, Golden Summer y Piquillo (n = 50). Cuando los tallos alcanzan 1.5-2 cm., alrededor de una semana mas tarde, se escinden del callo y se pasan a medio de enraizamiento. Y después de 5-7 días de aclimatación se transfieren a inverna-

dero.

Aunque la mayoría de los procedimientos desarrollados para la regeneración de pimiento y tomate se basan en la utilización de reguladores del crecimiento, nosotros hemos observado que, aquellos que no necesitan la adición de hormonas exógenas, se encuentran entre los más eficientes. Por ejemplo, [Chyi, Y.-S., & Phillips, G.C. (1987). High efficiency Agrobacterium mediated transformation of *Lycopersicon* based on conditions favorable for regeneration. *Plant Cell Reports*, **6**, 105-108] analizan la capacidad organogénica natural de segmentos de tallo del híbrido interespecífico, altamente regenerable *L. esculentum* x *L. pennelli*, y observan una media de 2.2 yemas regeneradas per explanto. Por otra parte, Ezura, H., Nishimiya, S., & Kasumi, M. (1993). Efficient regeneration of plants independent of exogenous growth regulators in bell pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Reports*, **12**, 676-680, Ramírez-Malagón y Ochoa-Alejo (1996) observaron que aproximadamente el 60% de los explantos de diferentes cultivares de pimiento producían espontáneamente una media de 2 yemas, aunque solo el 50% de ellas eran capaces de elongarse para producir tallos. Al comparar estos valores con los obtenidos por nosotros, los rendimientos obtenidos en la regeneración de tallos adventicios, tanto en pimiento, como en tomate, se encuentran entre los más elevados.

Entre los factores involucrados en la regeneración y elongación espontánea de yemas y tallos, en los explantos en "pico de flamenco", diferentes indicios sugieren que, especialmente en el caso del pimiento, el balance de hormonas producido por raíces y cotiledones es necesario para una regeneración y elongación eficiente de los tallos:

Los explantos en "pico de flamenco", tanto de pimiento, como de tomate, a los que se ha escindido la radícula, regeneran un número reducido de yemas que no llegan a elongarse. Después de unos días de cultivo en MSO sólido, estos explantos regeneran raíces en las zonas basales y unos días más tarde, de la superficie de corte, emergen nuevas yemas capaces de elongar normalmente (no se muestran los resultados). Estos resultados sugieren que la presencia de la radícula en los explantos es un factor crítico para una organogénesis eficiente de los tallos adventicios y concuerda con los resultados obtenidos por Ezura, H., Nishimiya, S., & Kasumi, M. (1993). Efficient regeneration of plants independent of exogenous growth regulators in bell pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Reports*, **12**, 676-680 con embriones decapitados de distintos cultivares de pimiento.

Los explantos en "pico de flamenco" de pimiento y de tomate difieren en su capacidad organogénica en relación con la presencia del cotiledón en el explanto. Así, mientras la eliminación de ambos cotiledones en los explantos en "pico de flamenco" permite la regeneración de yemas y tallos en tomate, no ocurre lo mismo en pimiento. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Ramírez Malagón y Ochoa-Alejo (1996)§ con guindilla y ponen de manifiesto que, a diferencia con el tomate, el balance de hormonas producido por la radícula y cotiledones, y su transporte a las zo-

nas en regeneración, es crítico para una inducción eficiente de la organogénesis de tallos.

Cuando las yemas adventicias regeneran a partir de la superficie de corte, del pimiento en los explantos en "pico de flamenco" la diferenciación y elongación de los tallos se produce únicamente si se escinde el cotiledón. Estos resultados son particularmente interesante dado que esta abundantemente documentado que la elongación de las yemas para formar tallos es el paso limitante en la regeneración (Liu, W., Parrott, W.A., Hildebrand, D.E., Collins, G.B., & Williams, E.G. (1990). Agrobacterium induced gall formation in bell pepper (*Capsicum annuum* L.) and formation of shoot-like structures expressing introduced genes. *Plant Cell Reports*, **9**, 362-364; Arroyo y Revilla 1991). Por otra parte, estos resultados indican que los factores que inhiben la elongación de los tallos adventicios regenerados en el pimiento podrían ser sintetizados en el cotiledón.

Análisis histoquímico del proceso de diferenciación de las yemas

Para conocer el modo en que las células de la superficie de corte de los explantos en "pico de flamenco" se diferencian a yemas, hemos realizado el análisis histoquímico de la evolución de la superficie de corte de los explantos en "pico de flamenco". Para detectar las células meristemáticas en división activa, se utilizó Safranina, que tiñe específicamente las paredes celulares lignificadas y los núcleos. Por otra parte el Alcian blue tiñe las membranas y permite distinguir los diferentes tipos de células en diferenciación durante la formación del callo.

Los resultados muestran que las yemas en las superficies de corte de los "picos de flamenco", se forman de novo, a partir de células indiferenciadas. Durante los cuatro primeros días de cultivo no se observan cambios histológicos en los explantos (no se muestran datos). Aproximadamente una semana después de la excisión de los explantos en "pico de flamenco", se observa la formación del callo, a partir del cual se diferencian múltiples meristemas. Conviene resaltar que, en contraste con el método de Ezura, H., Nishimiya, S., & Kasumi, M. (1993). Efficient regeneration of plants independent of exogenous growth regulators in bell pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Reports*, **12**, 676-680, que produce meristemas y tallos adventicios, a partir de las células epidérmicas situadas alrededor de la superficie de corte del explanto, el método descrito por nosotros se caracteriza por la regeneración de meristemas a partir tanto de las células del callo, como de las células que rodean la superficie de corte. Estos meristemas están compuestos por células con grandes núcleos y una forma geométrica peculiar que, posteriormente, se diferenciará en epidermis, cortex y tejidos vasculares. En este estadio no existen conexiones vasculares entre los meristemas y la planta madre. Estas conexiones se producen en los explantos a los 10-14 días cuando los brotes han diferenciado primordios foliares y el ápice meristemático.

Empleo de los explantos en "pico de flamenco" para la transformación genética mediante agrobacterium

Tanto el tomate como el pimiento son huéspedes

des naturales para el *Agrobacterium* y, en consecuencia, accesibles a las técnicas de transformación habituales. Nuestro objetivo es aprovechar la capacidad natural de regeneración de estas dos especies, en el sistema de explantos en "pico de flamenco", para diseñar un protocolo que permita un elevado rendimiento de infección y transformación por *Agrobacterium*, así como una regeneración eficiente de las plantas transformadas. Dado que la construcción 35SGUS-intron garantiza la expresión Gus en las células vegetales y no en las bacterias contaminantes, hemos utilizado esta construcción para detectar los procesos de transformación, en los primeros momentos, en tomate y en pimiento. La cepa bacteriana utilizada para la transferencia del TDNA es una C58 que contiene un plásmido Ti octopina capaz de infectar el tomate (van Roekel et al. 1993) y el pimiento (Liu, W., Parrott, W.A., Hildebrand, D.E., Collins, G.B., & Williams, E.G. (1990) *Agrobacterium* induced gall formation in bell pepper (*Capsicum annuum* L.) and formation of shoot-like structures expressing introduced genes. *Plant Cell Reports*, 9, 362-364; Zhu et al. 1996). Los criterios para admitir que se ha producido una transformación en este sistema han sido la concurrencia de resistencia a la kanamicina y la expresión GUS.

Inicialmente, después de la infección con *Agrobacterium*, los explantos se colocaban en el medio de selección en posición erecta. En estas condiciones, los explantos producían abundantes tallos a las 2-3 semanas de cultivo, sin embargo, la mayoría de ellos eran escapes y la frecuencia de transformación era muy baja (1.4% para tomate, n=69). Estos resultados indicaban que el procedimiento utilizado para la selección con kanamicina no era adecuado. En una segunda serie de experiencias con pimiento (cv. Yolo Wonder) y tomate (cv. Alisa Craig) los explantos se colocaron en posición horizontal con el hipocótilo totalmente sumergido en MSKC. En estas condiciones el número de escapes se redujo drásticamente y al cabo de 2-3 semanas de cultivo en medio selectivo, el 10.2% de los explantos de pimiento (n=39) y el 47% de los explantos de tomate (n=51) produjeron meristemos transformados a partir de los callos desarrollados en las superficies de corte. Estos resultados indican que la selección con kanamicina favorece la competencia de las células transformadas sobre las no transformadas durante la regeneración adventicia y, en consecuencia, la selección es importante para la recuperación de transformantes. Estos resultados indican también que el sistema de explantos en "pico de flamenco" es aplicable para la transformación de estas especies.

A continuación estudiamos la capacidad de los meristemos para desarrollarse y producir yemas y tallos. Un elevado porcentaje de los explantos produjeron tallos transformados al cabo de 4 semanas de cultivo (45.2, n=42 explantos), lo que pone de manifiesto que el sistema de explantos en "pico de flamenco" resulta muy eficiente para la regeneración de plantas vía *Agrobacterium*. La mayoría de los tallos transformados no eran quiméricos de acuerdo con las tinciones histoquímicas GUS. Los tallos regenerados enraiza-

ban bien después de 2 semanas en medio MSKC y su paso a suelo y aclimatación se realizó con facilidad.

Capacidad organogénica de las plantas transformadas con agrobacterium mediante el sistema en "pico de flamenco"

Aunque el sistema de explantos en "pico de flamenco" presenta unos niveles elevados de regeneración de plantas transformadas, sin el concurso de hormonas exógenas, el rendimiento en la transformación puede aumentarse considerablemente si, al cabo de 10 días en medio selectivo, con cefotaxime, se transfieren a medio MSCK al que se ha añadido 0.1 mg/l de zeatina (57.8 y 100% de eficiencia en dos experimentos independientes n=57 y n=23, respectivamente).

La eficiencia del sistema de explantos en "pico de flamenco" para producir meristemos y tallos transformados se ha comparado con un protocolo estándar basado en el empleo de explantos de cotiledones y reguladores del crecimiento. Los rendimientos obtenidos con este procedimiento tanto en pimiento como en tomate fueron muy inferiores al sistema de explantos en "pico de flamenco".

La eficacia del sistema de explantos en "pico de flamenco" para producir meristemos y tallos transformados se comparó con un protocolo estándar en el que se utilizan explantos de cotiledones y reguladores del crecimiento. En este caso los rendimientos de transformación fueron mucho más bajos y únicamente se obtuvieron 4 tallos transformados a partir de 112 explantos de cotiledón en el caso del tomate y ninguno cuando se partió de 350 explantos de cotiledón de pimiento.

Nuestras experiencias anteriores han puesto de manifiesto que el sistema de regeneración en "pico de flamenco" puede aplicarse a diferentes cultivares de tomate y pimiento. Con objeto de explorar la utilidad de este método de transformación a un número más amplio de cultivares, se realizaron transformaciones con los cultivares UC82B y Rutgers utilizando la construcción 35SGUS-intron y después de 25 días en medio MSKC se obtuvieron rendimientos de transformación del 42% para Rutgers y del 66% para UC82B.

Influencia de la cepa bacteriana

Las cepas salvajes de *Agrobacterium* difieren en su capacidad para transferir el T-DNA a varias especies vegetales (Godwin et al. 1991, Liu, W., Parrott, W.A., Hildebrand, D.E., Collins, G.B., & Williams, E.G. (1990). *Agrobacterium* induced gall formation in bell pepper (*Capsicum annuum* L.) and formation of shoot-like structures expressing introduced genes. *Plant Cell Reports*, 9, 362-364). Las experiencias de transformación expuestas anteriormente se efectuaron con bacterias con un fondo cromosómico C58 y un plásmido Ti octopina. Nosotros hemos contrastado estos resultados con los obtenidos con un sistema binario con un fondo cromosómico LBA 4404 y un plásmido Ti octopina. Aunque las bacterias LBA4404 se han utilizado con éxito para transformar otras especies vegetales, nosotros no pudimos obtener ningún meristemo transformado, a partir de cotiledones de tomate (n=262) ni de pimiento (n=230). Mas aun, al utilizar el sistema de explantos en "pico de flamenco" no pudimos

regenerar ningún meristemo transformado en pimiento y solamente algunos tallos putativamente transformados de un solo explanto de tomate. Los explantos cocultivados con la cepa LBA4404 no producen callos verdes turgentes sino callos blancos duros que no forman tallos. La elevada eficacia de transformación obtenida con la cepa C58 (35GUS-intron) en relación con la LBA4404 podría explicarse por la diferencia en la eficiencia para transferir el T-DNA a las células infectadas. La baja eficiencia de transformación de la cepa LBA4404 ha sido confirmada utilizando otras construcciones (no se muestran los resultados). La mayor parte de la literatura que describe la eficiencia de transformación en tomate utiliza C58. Solo en un trabajo, en el que se usa la cepa LBA4404, se informa sobre elevadas proporciones de transformación (70%) (Fillatti, 1987). En contraste con estas inusualmente elevadas proporciones de transformación, todavía no confirmadas, Koorneef et al. (1987) informan que solo el 6% de cotiledones cocultivados con esta cepa, producen callos transformados. Bird, C.R., Smith, C.J.S., Ray, J., Moreau, P., Bevan, M.W., Bird, A.S., Hughes, S., Morris, P.C., Grierson, D., & Schuch, W. (1988). The tomato polygalacturonase gene and ripening-specific expression in transgenic plants. *Plant Molecular Biology*, 11, 651-662; McBride et al. (1990) y Meissner et al. (1997) afirman haber obtenido transformantes con la cepa LBA4404 pero, en ningún caso, informan sobre la frecuencia de la transformación.

Análisis genético de las plantas transformadas

Para el análisis genómico del DNA de las plantas transformadas se seleccionó un explanto en "pico de flamenco" infectado con la construcción 35SGUS-intron y otra con la 35 Ω GUS. Los fragmentos de restricción del DNA genómico de los transformantes hibridados con una sonda GUS muestran diferentes pautas de hibridación, que evidencian la existencia de transformantes que tienen una sola inserción (Fig. 3B, líneas 2 y 4-7), y dos inserciones (Fig. 3B, líneas 1 y 3), de la

construcción 35SGUS-intron. Por otra parte las plantas transformadas con la 35 Ω GUS manifiestan una pauta simple de hibridación (Fig. 3A), lo que confirma además que, bajo las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo, las cepas bacterianas basadas en la LBA4404 son menos efectivas para la transformación del tomate que aquellas que tienen un fondo cromosómico C58.

Variación somaclonal de las plantas transformadas

Cualquier método para la transformación de plantas debe evitar los problemas de variación somaclonal que se producen en muchos sistemas de regeneración de plantas in vitro (Larkin y Scowcroft 1981). Bulk et al. (1990) informa que, entre las diferentes variaciones fenotípicas observadas en las plantas de tomate regeneradas, solo la variación en ploidia se transmite a la progenie y la frecuencia depende del tipo de explanto. Estos autores también informan que el 50% de los regenerantes derivados de explantos de hipocótilo son poliploides. Nuestro análisis citométrico de plantas transgénicas regeneradas de distintos explantos en "pico de flamenco" pusieron de manifiesto que el 33% de estas plantas eran tetraploides (n=27), y la razón de esta elevada proporción de poliploidismo es probablemente las características polisomáticas de algunos tejidos de tomate (Bulk et al. 1990).

La herencia mendeliana de los genes foráneos en tomate, ha sido puesta de manifiesto (McCormick, S., Niedermeyer, J., Fry, J.E., Barnason, A., Horsh, R.B., and Fraley, R.T. 1986. Leaf disc transformation of cultivated tomato (*L. esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports* 5:81-84). Semillas de la progenie R1 de transformantes diploides que contenían una sola copia de la construcción 35SGUS-intron se utilizaron para determinar la estabilidad y heredabilidad del gen en tomate. Los resultados ponen de manifiesto que el T-DNA insertado se transmite a la siguiente generación y se expresa en la relación esperada para un solo gen dominante.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la propagación vegetativa y transformación genética, aplicable a plantas del género *Lycopersicon*, *Capsicum* y otras dicotiledóneas, **caracterizado** porque los explantos se precultivan en medio MSO durante 24-48 horas y a continuación se siguen las siguientes etapas:

- a) Se infectan durante 48 h con *Agrobacterium* y se pasan a medio MSO que contiene 300 mg/l de cefotaxime, para controlar la proliferación de *Agrobacterium*, y el antibiótico de selección, generalmente 50 mg/l de kanamicina o 10 mg/l de higromicina,
- b) Al cabo de 3-4 semanas, los tallos elongados, que emergen de la superficie de corte se escinden y se colocan en nuevo medio MSO selectivo, para su enraizamiento.
- c) Una vez las plantas enraizadas, se pasan a

suelo se aclimatan y se transfieren a invernadero.

2. Procedimiento según reivindicación 1 **caracterizado** porque el explanto utilizado se obtiene mediante germinación de semillas en medio MSO, en condiciones estériles, a partir de plántulas de tomate y pimiento, cuando las primeras hojas verdaderas se encuentran en el estadio de primordio o escasamente desarrolladas y con una cuchilla estéril se elimina, cuidadosamente, uno de los cotiledones, el meristemo apical y los meristemas secundarios, para que al cabo de 2 y 3 semanas de cultivo para tomate y para pimiento, respectivamente, en medio MSO sólido, se desarrolle un callo prominente, en la superficie de corte, del cual emergen yemas y brotes adventicios, los cuales una vez alcanzado 1.5-2 cm de longitud, se separan del callo y se cultivan de nuevo en medio MSO para su enraizamiento, transfiriendo las plantas enraizadas al suelo.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

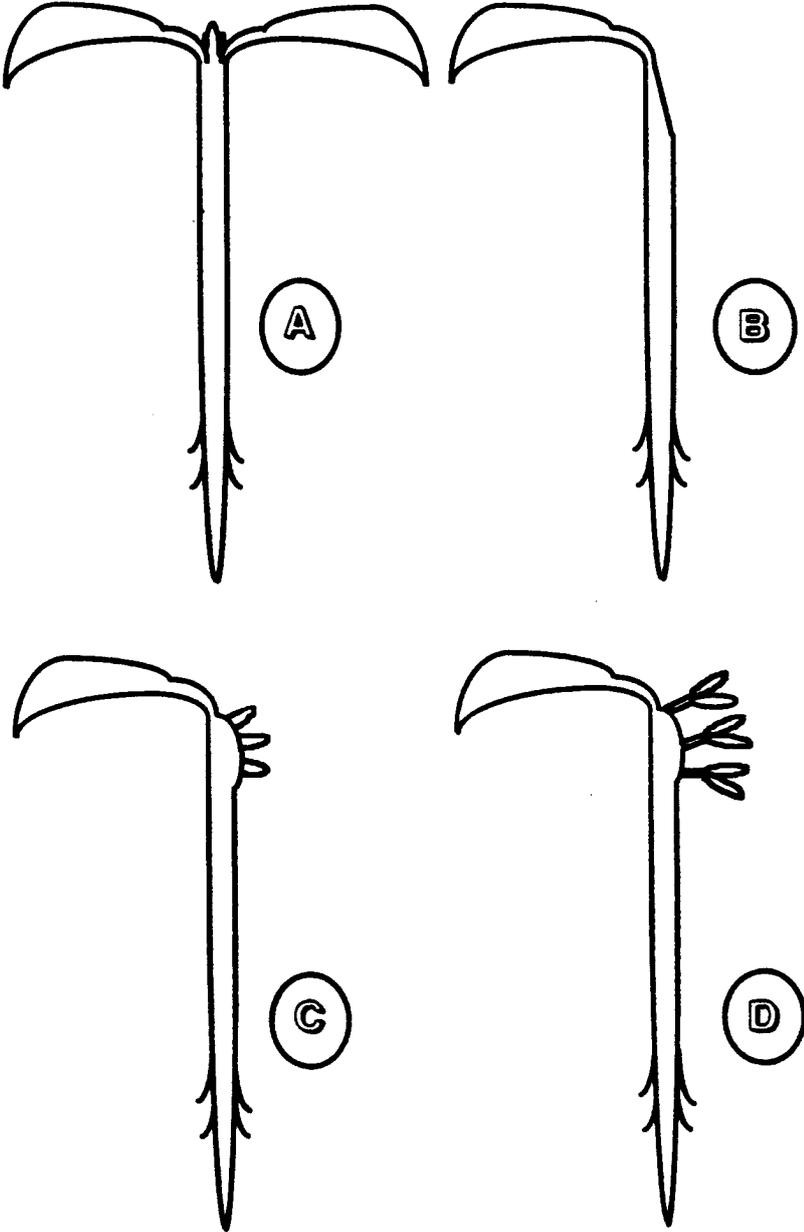


Fig. 1

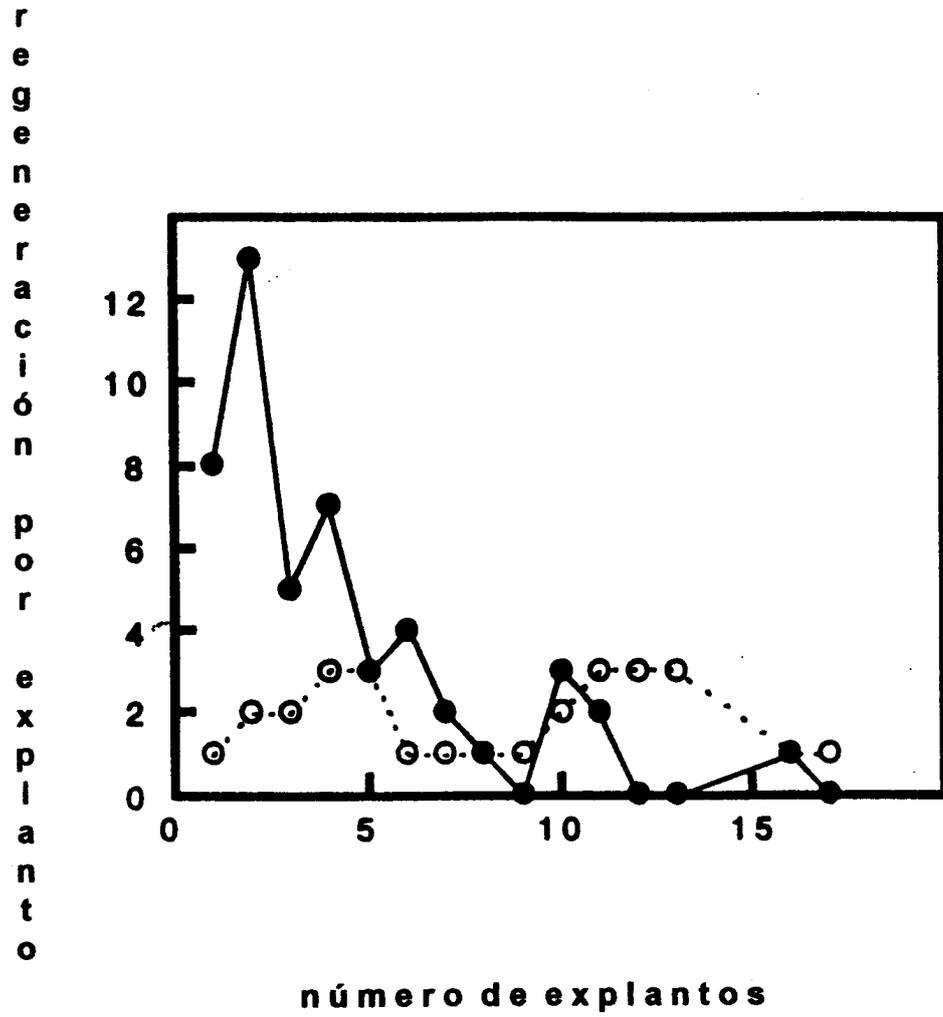


Fig. 2

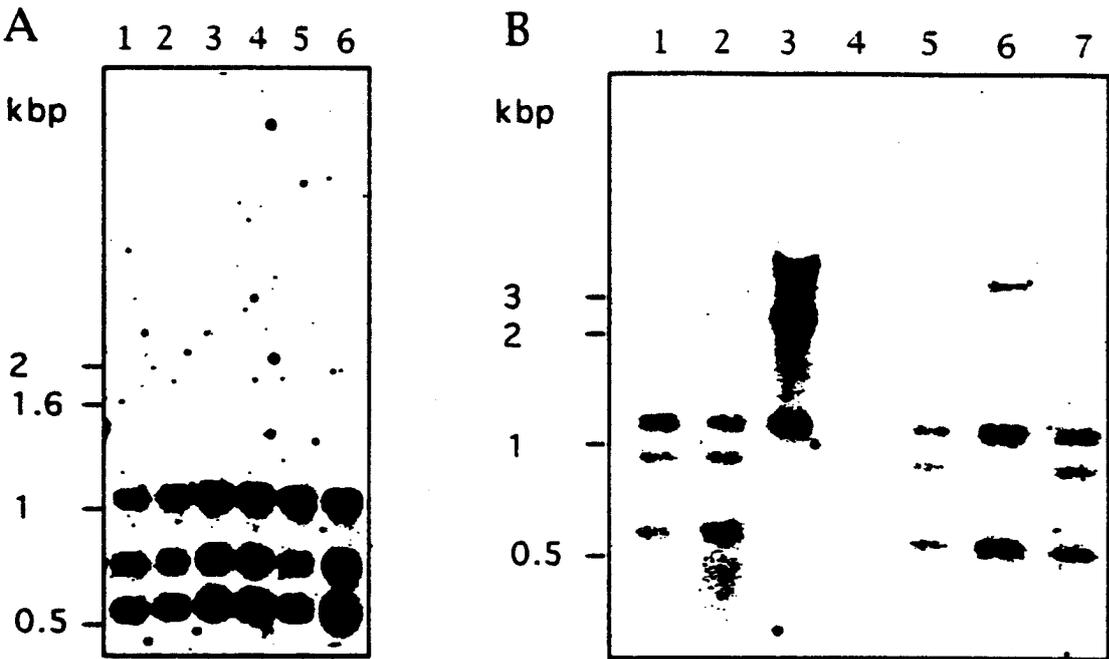


Fig. 3



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.⁷: A01H 4/00

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	EP 249432 A (CALGENE INC.) 16.12.1987, todo el documento.	1
X	ES 2017024 A (THE TEXAS A & M UNIVERSITY SYSTEM COLLEGE STATION) 16.12.1990, página 2, líneas 15-30.	1
A	WO 9217056 A (FLORIGENE B.V.) 15.10.1992, todo el documento.	1-2
A	WO 9309665 A (FRESHWORLD L.P.) 27.05.1993, todo el documento.	1-2
A	ES 2016428 A (PHYTOGEN) 01.11.1990, todo el documento.	1-2

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 n.º:

Fecha de realización del informe
21.06.2001

Examinador
G. González Limas

Página
1/1