



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 163 400**

⑤1 Int. Cl.⁷: C12N 15/82

A01H 5/00

C12N 15/87

C12N 15/89

①2

TRADUCCION DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧6 Número de solicitud europea: **92911778.6**

⑧6 Fecha de presentación: **11.05.1992**

⑧7 Número de publicación de la solicitud: **0 539 563**

⑧7 Fecha de publicación de la solicitud: **05.05.1993**

⑤4 Título: **Método de creación de una planta de arroz transformada.**

③0 Prioridad: **15.05.1991 US 701416**

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

④5 Fecha de la publicación de la mención BOPI:
01.02.2002

⑦2 Inventor/es: **Christou, Paul;**
Ford, Tameria, L. y
Kofron, Matt

④5 Fecha de la publicación del folleto de patente:
01.02.2002

⑦4 Agente: **Isern Jara, Jorge**

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).

DESCRIPCION

Método de creación de una planta de arroz transformada.

Antecedentes de la invención

La presente invención se refiere al campo de la biología molecular de las plantas. En particular, se refiere a la creación de plantas de arroz transformadas mediante partículas aceleradas.

Antecedentes

El arroz, *Oryza sativa*, es un importante cultivo alimentario que proporciona más calorías por hectárea que cualquier otro cereal y ocupa el segundo lugar después del trigo en el área cosechada del mundo entero. Existe un gran interés en las nuevas variedades de arroz, pero los métodos convencionales de reproducción tienen varias limitaciones inherentes a los mismos. Se requieren varias generaciones de autofecundación para la homocigosis, por lo cual los programas de crianza para nuevas variedades de arroz pueden durar varios años. Los rasgos genéticos de las variedades de arroz silvestre son potencialmente útiles para aumentar la resistencia del arroz contra las plagas, enfermedades, y ambiente adverso, pero las variedades de arroz silvestre no se cruzan bien con el arroz doméstico.

Debido a los límites de la reproducción de la planta convencional, el arroz ha sido tratado por ingeniería genética. Luo y Wu, *Plant Molec. Biol. Rep.* 6 [3]: 165-174 (1988) y *Plant Molec. Biol. Rep.* 7 [1]: 69-77 (1989), han dado a conocer un método para transferir ADN externo a los flósculos de un arroz recientemente polinizado, que ellos denominan transformación por la "ruta del tubo de polen". El proceso de la ruta del tubo de polen comprende el cortado de la punta del flósculo del arroz de forma que el estigma quede cortado y el estilo tenga un final agudo. Una gota de una solución que contiene el ADN se coloca en el extremo cortado del flósculo y se deja que fluya hacia abajo por el tubo de polen. Eventualmente, se recogen las semillas y se germinan. Sin embargo, la transformación por la ruta del tubo de polen, no ha sido repetida por otros y no parece ser reproducible.

Los protoplastos del arroz, las células de la planta de arroz aisladas de la pared celular, han sido un objetivo popular de la ingeniería genética. Un método corriente de transformación consiste en incubar los protoplastos con ADN y polietilenglicol (PEG) y a continuación cultivar los protoplastos en plantas en presencia de un agente selectivo. Por ejemplo, Uchimiya y col., *Mol Gen Genet.* 204-207 (1986), describe la transformación inducida por PEG de protoplastos de arroz para producir la expresión de genes foráneos en callos transformados. Otros ejemplos de transformación de protoplastos inducida por PEG se encuentran en Hayashimoto y col., *Plant Physiol.* 93: 857-863 (1990) y Peng y col., *Plant Cell Reports* 9: 168-172 (1990).

Los protoplastos de arroz han sido también transformados mediante electroporación. En la mayoría de métodos de electroporación, los protoplastos de arroz se mezclan con una solución de ADN y se someten a un impulso eléctrico. De manera similar a la transformación inducida por

PEG, las moléculas de ADN atraviesan la membrana celular y se integran en el genoma celular. Recientemente, Terada y Shimamoto, *Mol. Gen. Genet.* 2201 389-392 (1990), han descrito la transformación de los protoplastos del arroz vía electroporación para producir plantas de arroz maduras que expresan el gen foráneo. Tada y col., *Theor. Appl. Genet.* 80: 475-480 (1990), y Battraw y Hall, *Plant Molec. Biol.* 15: 527-538 (1990), han informado recientemente también, la transformación del arroz vía electroporación. Shimamoto y col., *Nature* 338: 274-276 (1989), electroporaron un gen de resistencia a la higromicina en protoplastos y detectaron el gen foráneo en la descendencia de las plantas.

El arroz ha sido transformado con una mezcla de PEG y electroporación en Yang y col., *Plant Cell Reports* 7: 421-425 (1988). La transformación se confirmó mediante ensayos enzimáticos en clones resistentes a la canamicina escogidos al azar.

Los métodos de transformación basados bien sobre el PEG o bien sobre la electroporación, son también limitados debido a que dependen de la regeneración del total de plantas de arroz transformadas a partir de los protoplastos de arroz transformados. Hay muchos problemas y limitaciones inherentes al proceso de regeneración del cultivo de los protoplastos. Los procesos corrientes de regeneración de los protoplastos dan como resultado una alta frecuencia de variaciones somaclonales, albinismo y esterilidad. Además, y esto es muy importante, no todas las variedades de arroz pueden ser regeneradas a partir de los protoplastos. El arroz se divide en dos grandes grupos de variedades, que reciben los nombres de Japonica e Indica. Las variedades Japonica e Indica difieren por su distribución geográfica y los elementos morfológicos y fisiológicos. Las variedades Japonica e Indica difieren también en cuanto a la facilidad del cultivo de tejidos y métodos de regeneración. En general las variedades Japonica tienen un gran rendimiento en callos y una alta capacidad de regeneración, y en cambio, las variedades Indica tienen un pobre crecimiento de los callos y un pobre potencial de regeneración. Las variedades de Indica son en general las mas deseables, comercialmente.

Las plantas de arroz transformadas producidas por los procedimientos descritos más arriba fueron de la variedad Japonica. Luo y Wu, *Plant Molec. Biol.* 7 [1]: 69-77 (1989), incluyeron una variedad Indica en sus experimentos de la ruta del tubo de polen. Sin embargo, los resultados publicados de una transformación positiva, no han sido repetidos y no pueden ser confirmados. Datta y col., en *Biotechnology* ("Biotecnología") 8: 736-740 (1990), han establecido un protocolo de transformación inducida con PEG para regeneración de plantas a partir de protoplastos del tipo Indica. Los análisis Southern y ensayos enzimáticos han demostrado que los genes foráneos estaban establemente integrados y transmitidos a la descendencia. Este método, sin embargo, sólo funciona en una variedad Indica específica no comercial. Este es el único método perfeccionado informado hasta la fecha en variedades de arroz Indica, que da como resultado plantas transformadas. En ge-

neral, aunque se ha dedicado mucho esfuerzo en el desarrollo de un sistema reproducible para regenerar variedades Indica, no se ha publicado hasta la fecha ningún procedimiento.

El arroz ha sido transformado mediante la infección con *Agrobacterium* de embriones maduros. La primera técnica de ingeniería genética de plantas ampliamente empleada, se basó en la capacidad natural del microorganismo *Agrobacterium tumefaciens*, que vive en el suelo, de introducir una porción de su ADN en la célula de una planta, como una parte de su normal proceso patogénico. Si un gen foráneo se inserta en la bacteria mediante determinados procedimientos, el *Agrobacterium* puede emplearse para transferir el gen foráneo en una planta. Las técnicas de transformación del *Agrobacterium* han sido desarrolladas para un número de plantas, la mayor parte dicotiledóneas, pero la utilidad de la técnica ha variado de unas especies de plantas a otras especies. Los sistemas de transformación basados en el *Agrobacterium* son limitados, debido a que requieren cultivos celulares o de tejidos y técnicas de regeneración de plantas. Las líneas de plantas varían en su facilidad a los cultivos de tejidos y métodos de regeneración. Las monocotiledóneas, como el arroz, son especialmente pobres candidatas para la transformación inducida con el *Agrobacterium*. Sin embargo, Raineri y col., *Biotechnology* 8: 33-38 (1990), informa la transformación inducida por el *Agrobacterium* de tejidos de arroz, como confirma por análisis de hibridación del ADN. Los embriones inoculados formaron tejido de callo tumorigeno. No se informó de ninguna planta y parece que es imposible regenerar plantas a partir de estos tejidos.

Una nueva técnica de transformación trata de conseguir la creación de plantas transformadas, por bombardeo de células o tejidos vegetales con partículas aceleradas que transportan material genético. La primera indicación de la utilidad de esta técnica fue una demostración de que las construcciones de ADN podían aplicarse como recubrimiento sobre partículas de tungsteno y ser aceleradas en el interior de una piel de cebolla, en donde los genes fueron temporalmente expresados. Patente U.S. n° 4.945.050. Un problema en el desarrollo de un procedimiento de transformación por partículas aceleradas es la dificultad de obtener la transformación de la línea germinal de la planta. Con el término "transformación de la línea germinal" se quiere decir que se han transformado las células germinales de la planta, de forma que la descendencia de la planta heredará la construcción del ácido nucleico foráneo, que se ha insertado junto con las partículas, en el tejido de la planta parental. La transformación genética de la planta ha sido lograda mediante el método de partículas aceleradas. La patente U.S. n° 5.015.580 describe la transformación de la línea germinal de plantas de soja y líneas de plantas. Un método describe que la solicitud de la patente publicada es la aceleración de partículas recubiertas por ADN dentro de ejes embrionarios cortados de plantas de soja. Si los ejes embrionarios de soja bombardeados se tratan con medio alto de citoquinina, se inducen retoños de los ejes embrionarios tratados. Cuando los retoños se culti-

van para dar plantas de soja completas, un tanto por ciento significativo de las plantas tendrán las líneas germinales transformadas. De manera similar al bombardeo de partículas, la transformación del arroz ha sido intentada con un aparato de cañón de aire. Oard y col., *Plant Physiol.* 92: 334-339 (1990) informan sobre la expresión temporal de genes cuando se bombardea un callo embriogénico de arroz. Sin embargo, para los intentos de transformación inducidos con partículas, es mucho más fácil obtener una actividad temporal en el callo que obtener plantas con la línea germinal transformada.

La técnica de la biología molecular vegetal necesita un método eficiente de creación de una planta de arroz Indica transformada. Este método no dependería óptimamente del cultivo y regeneración del protoplasto, sería independiente del genotipo, y crearía fácilmente plantas con la línea germinal transformada que producirían descendencia transgénica. Sería también deseable que el mismo procedimiento estuviera disponible igualmente para las variedades Japonica.

Resumen de la invención

La presente invención es tanto un método de creación de plantas de arroz transformadas como de plantas de arroz Indica transformadas. El método empieza con la preparación de copias de una construcción de ácido nucleico. Con estas copias se recubren partículas de carga biológicamente inerte. En una versión de la presente invención, las partículas de carga recubiertas de ácido nucleico se aceleran físicamente contra embriones inmaduros de arroz. En otra versión, se cortan discos del meristema de un plantón de arroz. Estos discos son bombardeados con partículas de carga recubiertas de un ácido nucleico. Tanto los embriones bombardeados como los discos, se cultivan hasta obtener los retoños, y el tanto por ciento de retoños transformados recuperados, se enriquece exponiendo los retoños a un agente de selección. Estos retoños se cultivan hasta obtener plantas completas sexualmente maduras. La presencia de la construcción de ácido nucleico se comprueba bien en los retoños o bien en las plantas sexualmente maduras. Además, se verifica también la transmisión por herencia de la construcción de ácido nucleico.

Un objeto de la presente invención es la producción de una planta de arroz Indica transformada.

Otro objeto de la presente invención es la producción de una planta de arroz Indica con descendencia transformada.

Una ventaja del método de la presente invención es que tiene éxito en todas las variedades de arroz.

Otra ventaja del método de la presente invención es que no depende del cultivo del protoplasto, o del cultivo de la suspensión embriogénica, siendo los protocolos de regeneración para los mismos, mucho más dependientes del genotipo.

Otros objetos, ventajas y características de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente especificación, cuando se describe conjuntamente con los dibujos que se acompañan.

Descripción de las figuras

La figura 1 es una vista esquemática despiezada, de un dispositivo de aceleración de partículas, de utilidad para la presente invención.

La figura 2 es una vista en planta del dispositivo de la figura 1.

La figura 3 es una ilustración del plásmido pCMC2114 empleado en el ejemplo.

Descripción de las versiones preferidas

La presente invención es un método para la obtención de plantas de arroz transformadas. El método general es el bombardeo de tejidos de meristema para lograr una transformación de la línea germinal. Los tejidos de meristema son tejidos en los cuales las células de la planta se dividen. Las hierbas y las monocotiledóneas afines, tales como el arroz, tienen tejidos meristemáticos en la proximidad de los nodos, que son las áreas de unión de las hojas. Los embriones de arroz contienen también células meristemáticas.

En los procedimientos para la transformación genética inducida con partículas, nos encontramos con que solamente se ha transformado un pequeño porcentaje de las células tratadas. Una parte difícil del procedimiento es la identificación de, o la selección para, las células o plantas transformadas. Este problema ha conducido a algunos investigadores a trabajar con sistemas de células individuales tales como los protoplastos, o cultivos en suspensión, sobre la teoría de que cualquier planta regenerada que surgiera a partir de las células individuales, lo haría evitando la aparición de plantas quiméricas. Sin embargo, el empleo de estos sistemas de células individuales tiene una grave desventaja, a saber, que solamente ciertos genotipos de arroz pueden ser regenerados a partir de dichos cultivos.

Otro método consiste en acelerar partículas de carga cargadas con ADN, al interior de un tejido diferenciado, y éste es el método que se ha empleado aquí. Este método no depende de los cultivos de células individuales y es por lo tanto independiente del genotipo. Un teórico inconveniente de seguir este método es que podrían predominar acontecimientos quiméricos, haciendo difícil la identificación o detección de cualquier acontecimiento transformante de la línea germinal. Sorprendentemente se ha descubierto que los retoños clonales con la línea germinal transformada, pueden recuperarse con una frecuencia práctica, a partir del bombardeo de tejido meristemático de arroz.

En una versión de la presente invención, los embriones inmaduros de arroz son los tejidos diana. Los embriones son bombardeados con partículas recubiertas con ácido nucleico, inducidos a formar callos embriogénicos u organogénicos, y las plantas transformadas se regeneran a partir de los callos. A partir de las plantas producidas a través de la embriogénesis, se encuentran plantas clonales con la línea germinal transformada, con una frecuencia razonable. En una segunda versión de la versión, se cortan discos de la región del meristema de un plantón de arroz. Estos discos de meristema se cultivan y a continuación se bombardean con partículas recubiertas con ácido nucleico. En ambas versiones, los embriones o discos bombardeados se cultivan a continuación

para producir retoños, y el porcentaje de retoños transformados recuperados se enriquece mediante la exposición de los retoños a un agente de selección. Estos retoños son regenerados en plantas completas, sexualmente maduras. La presencia de la construcción del ácido nucleico puede verificarse bien en los retoños o bien en la planta sexualmente madura. Además, se verifica también la transmisión por herencia de la construcción de ácido nucleico.

A. Preparación de embriones de arroz y discos del meristema

1. Preparación de los embriones

En la primera versión de la invención, deben aislarse embriones inmaduros de arroz. La semilla de arroz se aísla a partir de la panícula de una planta madura de arroz, y se esteriliza. El embrión de arroz, el cual se compone del scutellum (el cotiledón) y el eje retoño/raíz, se separa de la cubierta de la semilla, eliminando el endosperma. De preferencia, se separan los embriones inmaduros. Por "inmaduro" se entiende los embriones que tengan aproximadamente de 0,5 mm a 1,5 mm de longitud y aproximadamente 10-18 días a partir de la antesis. Los embriones maduros pueden emplearse en la presente invención pero es más difícil cultivar estos embriones. Los embriones muy inmaduros pueden emplearse pero el tamaño de los embriones puede hacer muy difícil su manipulación, los embriones pueden dañarse con más facilidad por rotura, y estos embriones tan pequeños tienen también poca eficacia de transformación en los experimentos de expresión temporal.

Después de la separación, los embriones de arroz se acondicionan previamente para la transformación. Por "pre-acondicionamiento" se entiende que el tejido cortado se coloca en un medio adecuado para el cultivo del embrión inmediatamente antes de la transformación. Por razones que permanecen todavía oscuras, el procedimiento de preacondicionamiento parece aumentar la eficiencia del procedimiento de transformación, dando como resultado un mayor número de transformados que los que se obtienen sin él. Para variedades de Indica, un medio de cultivo adecuado es el medio CC definido por Potrykus *y col.*, *Theor. Appl. Genet.* 54: 209-214 (1979), y detallado en la tabla 1. Este medio contiene sales, azúcares y la auxina 2,4-D. En nuestro caso, hemos suplementado típicamente el medio CC con una cantidad adicional de 2,4-D y un hidrolizado de caseína. Para las variedades de Japonica un medio adecuado es el medio MS conteniendo 0,5 mg/litro de 2,4-D. El medio MS está definido por Murashige y Skoog, *Physiol. Plant* 15: 473-497, 1962.

Típicamente, los embriones separados permanecen en el medio de preacondicionamiento durante 24-48 horas a 25°C en la oscuridad. El eje del embrión debe tocar el medio, y el scutellum debe estar al descubierto. Después del preacondicionamiento, los embriones se bombardean con partículas recubiertas con un ácido nucleico como se describe más adelante. Cuando se prefiere este preacondicionamiento, no es absolutamente necesario para una correcta transformación que el preacondicionamiento se efectúe con un determi-

nado medio en particular.

En general, parece como si fuera una ventaja la separación de este explante de tejido 24-48 horas antes del bombardeo con partículas. Aunque el medio particular no parece ser crítico, los embriones separados y envejecidos (24-48 horas) dan como resultado un significativo aumento en la actividad de la expresión temporal de los genes insertados cuando se comparan con embriones de comparación que han sido bombardeados enseguida.

TABLA 1
Medio CC

KNO ₃	1212,0	mg/litro
NH ₄ NO ₃	640,0	mg/litro
CaCl ₂ .2H ₂ O	588,0	mg/litro
MgSO ₄ .7H ₂ O	247,0	mg/litro
KH ₂ PO ₄	136,0	mg/litro
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	mg/litro
Na ₂ EDTA	37,3	mg/litro
H ₃ BO ₃	3,1	mg/litro
MnSO ₄ .4H ₂ O	11,15	mg/litro
ZnSO ₄ .7H ₂ O	5,76	mg/litro
KI	0,83	mg/litro
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,24	mg/litro
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	mg/litro
CoSO ₄ .7H ₂ O	0,028	mg/litro
Acido nicotínico	6,0	mg/litro
Tiamina.HCl	8,5	mg/litro
Piridoxina.HCl	1,0	mg/litro
Glicina	2,0	mg/litro
m-inositol	90,0	mg/litro
Agua de coco*	100,0	ml/litro
Sucrosa	20,0	g/litro
Manitol	36,43	g/litro
pH (KOH)	5,8	g/litro
2,4-D	2,0	mg/litro
Filtro esterilizado		

*Gibco n° 570-5180 sin diluir

2. Preparación de discos de meristema

Otra versión de la invención comprende la transformación de plantas de arroz a partir de tejidos de un disco de meristema. No existen diferencias entre nuestros métodos de preparación y regeneración de discos de meristema, bien procedan de la variedad Japonica de arroz o bien de la variedad Indica, aunque las variedades Indica parece ser que responden algo más. Para obtener discos de meristema, la semilla de arroz madura y seca, se trata con arena para eliminar el pericarpo y se esteriliza. Las semillas se tratan a continuación para inducir la germinación. Las semillas se plaquean en un medio y en condiciones de luz y temperatura que proporcionan las condiciones necesarias para el crecimiento de los plántones. Típicamente consiste en un fotoperíodo de dieciséis horas a 26°C. Un medio adecuado para el crecimiento es el medio 1/2 MS suplementado con sucrosa, Carbencillin, Cefotaxime y Benlate. Después de 5-7 días se habrán formado pequeños

plántones de aproximadamente tres pulgadas.

Se corta un disco de meristema de estos plántones practicando pequeños cortes horizontales en la unión de la rizosfera y el ápice del retoño. Puede cortarse un disco de aproximadamente 0,5 a 1,5 mm de grueso, de esta unión. Los discos se precondicionan en un medio adecuado al cultivo celular, tal como un medio CC con suplemento de 2,4-D e hidrolizado de caseína. Típicamente, los discos se precondicionan durante 24 horas a 25°C en la oscuridad en condiciones pobres en oxígeno, logradas burbujeando nitrógeno puro a través de los recipientes en los cuales están colocados los tejidos. Después del precondicionamiento, los discos se bombardean con partículas recubiertas de ácido nucleico.

B. Preparación de las partículas recubiertas con ácido nucleico

Se preparan múltiples copias de la construcción de ácido nucleico, bien sea ARN o bien ADN, mediante técnicas de biología molecular ya conocidas. Por "construcciones de ácido nucleico" se entiende comprendida cualquier molécula de ARN ó ADN capaz de funcionar dentro de una célula de arroz. Una construcción adecuada de ácido nucleico podría ser un gen aislado o construido con acompañamiento de señales reguladoras, o podría ser una población de moléculas de ARN ó ADN. El ácido nucleico podría tener como origen el propio arroz o cualquier otra especie.

Para ser de utilidad en un procedimiento de transformación inducido por partículas, la construcción de ácido nucleico debe ser capaz de realizar alguna función útil en las células de los tejidos de la planta diana. La construcción genética de transformación, será normalmente una construcción quimérica en el sentido de que su material genético se origina a partir de más de una clase de organismos. La construcción genética puede ser tal que sea capaz de expresar un producto génico en los tejidos diana. Estos productos génicos serán típicamente una proteína foránea, pero podrían ser también otros productos génicos, como por ejemplo una construcción de ARN antisentido, con la que se pretende inhibir un sistema endógeno de la planta.

Las construcciones genéticas foráneas están a menudo incorporadas en vectores cassette de expresión para células de plantas, muchos de los cuales ya se conocen en la especialidad. Típicamente un sistema vector de expresión de una planta de este tipo, incluye la secuencia codificadora para el gen foráneo deseado y las secuencias reguladoras apropiadas. Las secuencias reguladoras apropiadas podrían incluir una secuencia promotora capaz de iniciar la transcripción, y un terminador de la traducción. Algunos promotores y terminadores de la transcripción los cuales son efectivos en otras plantas, son también efectivos en el arroz. Un potenciador de la traducción o un potenciador transcripcional puede también incorporarse entre el promotor y la región de codificación de la secuencia genética.

La construcción de ácido nucleico transformadora, puede incluir un gen marcador que puede proporcionar una capacidad de selección ó de investigación de los tejidos tratados de la planta. Los marcadores para seleccionar se prefieren ge-

neralmente para los casos de transformación de plantas, pero no existen para todas las especies de plantas. Unas condiciones de marcador seleccionables para un rasgo en las células de la planta transformada, pueden ser seleccionadas mediante la exposición de los tejidos de la planta a un agente selectivo. Los marcadores adecuados para seleccionar pueden ser genes resistentes a un antibiótico o herbicida, los cuales una vez insertados en algunas células de una planta en cultivo, comunicarían a aquellas células particulares la capacidad de resistir la exposición al antibiótico o al herbicida.

Otro tipo de gen marcador es uno que puede ser seleccionado mediante un ensayo histoquímico o bioquímico. Un gen marcador adecuado que se ha encontrado de utilidad en la experiencia de transformación de una planta es el gen GUS. Jefferson y col., *EMBO J.*, 6: 3901-3907 (1987), describe el protocolo general para un ensayo GUS. El gen GUS codifica una enzima que cataliza la escisión del 5-bromo-4-cloro-3-indolil glucurónido, un sustrato que tiene un color azul después de la escisión. De esta forma, el empleo de un gen GUS proporciona un ensayo adecuado para la detección de la expresión del ADN introducido en los tejidos de la planta mediante un análisis histoquímico de los tejidos de la planta. En un típico procedimiento de transformación, el gen que pretendía ser expresado en la planta podría ser acoplado formando un tándem con el gen GUS. La construcción tándem podría ser transformada dentro de los tejidos de la planta, y los tejidos resultantes de la planta podrían ser analizados para detectar la expresión de la enzima GUS.

En nuestros ejemplos, hemos utilizado el plásmido pCMC2114, descrito en la figura 3. Este plásmido contiene el gen codificador GUS y el gen *Bar*. El gen *Bar* codifica la resistencia a determinados herbicidas, tales como el Bialaphos, y proporciona un agente de selección puesto que las plantas transformadas pueden crecer en presencia del herbicida.

El procedimiento de transformación requiere partículas de carga de un material duradero, denso, biológicamente inerte. El oro es un material adecuado para emplear como partícula de carga. Las partículas de carga son de un tamaño extremadamente pequeño, típicamente en el margen de una a tres micras, de forma que son pequeñas en relación al tamaño de las células de arroz diana. Los inventores y sus colaboradores han empleado dos formas físicas de partículas de carga de oro. Una forma consiste en pequeñas partículas esféricas de oro que se encuentran en el comercio en un margen de tamaño nominal (en micras) y que varían típicamente $\pm 50\%$ en tamaño con cada partida. La otra forma consiste en oro microcristalino u oro en polvo en el cual el metal tiene el aspecto, por examen microscópico, de copos o cristales aplanados de forma irregular los cuales varían muy ampliamente de tamaño. De preferencia, se utilizan como partículas de carga las partículas de oro microcristalinas. Una fuente preferida de partículas de oro microcristalinas es el "Polvo de oro A1570" de Engelhart Corporation de East Brunswick, Nueva Jersey. Se ha descubierto que las partículas microcristalinas

de carga de tamaño irregular alcanzan una mayor eficiencia de transformación que la alcanzada por partículas esféricas de oro.

El material genético que hay que insertar dentro de las células, se aplica como recubrimiento sobre las partículas de carga. Esto puede lograrse fácilmente precipitando soluciones de ADN o ARN sobre las propias partículas de carga. Pueden añadirse estabilizadores adecuados a la mezcla para contribuir a la longevidad del material genético sobre las partículas de carga.

Un método típico de aplicar las construcciones de ácido nucleico sobre perlas de oro es como sigue: 10 mg de oro cristalino amorfo se mide en el fondo de un tubo de microfuga Eppendorf de 1,5 ml. Debe tenerse cuidado de asegurar que el oro no se derrame por los lados del tubo, dado que sería difícil resuspender el oro en los pequeños volúmenes empleados en el procedimiento de preparación. Se añade 100 μ l de un tampón, y el tubo se agita suavemente con el Vortex, estando compuesto el tampón de 150 mM de NaCl, 10 mM de Tris.HCl, pH 8,0. Se añaden 20,0 microgramos de ADN de plásmido al tubo de microfuga, y el tubo se agita suavemente con el Vortex durante 5-10 segundos. Se añaden 100 μ l de solución 0,1 M de espermidina (base libre) a este tubo de microfuga, y se agita con el Vortex dicho tubo de microfuga. Se añaden 100 μ l de solución 25 % de PEG (p.m. 1300-1600), y se vuelve a agitar bien con el Vortex. Mientras la mezcla ADN/partícula de carga/PEG se agita con el Vortex, se añade al tubo gota a gota, 100 μ l de CaCl_2 2,5 M. Se para el Vortex, y el tubo se incuba a temperatura ambiente durante 10 minutos. En este momento, el ácido nucleico habrá precipitado sobre el oro, separándose de la solución.

La mezcla de ADN y partículas de carga se centrifuga brevemente en una microfuga. El sobrenadante transparente se elimina completamente. El precipitado, el cual consiste en el ADN y partículas de carga, se resuspende en 10 ml de etanol 100 %. El ADN resuspendido y la mezcla de partículas de carga se trata con ultrasonidos dos a tres veces durante un segundo en un baño de agua de ultrasonidos. Esta preparación puede ser almacenada durante algún tiempo. A continuación, la suspensión resultante se aplica como recubrimiento sobre una hoja de carga de 18 x 18 mm en una proporción de 163 μ l por hoja de carga, o una proporción calculada de 0,05 miligramos por centímetro cuadrado de la hoja de carga. En resumen, las partículas de oro se recubren con ADN a un nivel de aproximadamente 2 μ g de ADN/1 mg de partículas, y las partículas se resuspenden a una concentración de 0,5 - 1,0 mg de partículas / 1 ml de etanol.

C. Bombardeo de los embriones cultivados y de los discos de meristema

El aparato utilizado en la presente invención debe ser capaz de introducir las partículas recubiertas de ácido nucleico dentro de las células de la planta de tal manera que puedan transformarse un número adecuado de células. A una determinada frecuencia las partículas de carga se introducen dentro de las células de arroz, y a través de un proceso muy poco conocido, el material genético abandona las partículas de carga y se integra en

el ADN de las células de arroz anfitrionas. Muchos tipos de sistemas mecánicos pueden acelerar las partículas de carga en el interior de las células de la planta. Los mecanismos posibles incluyen la aceleración explosiva balística de partículas, aceleración centrífuga de partículas, aceleración electrostática de partículas u otros sistemas análogos capaces de proporcionar momento y velocidad a partículas pequeñas.

El mecanismo que hemos empleado en el ejemplo se basa en la aceleración de partículas a través de un dispositivo de descarga de chispas de voltaje eléctrico regulable, el cual es capaz de acelerar una hoja plana de carga contra una superficie diana. Este aparato será descrito más adelante con referencia a las figuras 1 y 2.

El aparato de aceleración de partículas está indicado de manera general con el n° 10 de la figura 1. El aparato consiste en una cámara de descarga de chispas 12, dentro de la cual se han insertado dos electrodos 14 separados uno de otro por una distancia de aproximadamente uno a dos milímetros. La cámara de descarga de chispas 12 es un rectángulo que se extiende horizontalmente, y tiene dos aberturas, 16 y 18 las cuales se extienden hacia el exterior de su cara superior. La abertura 16 está tapada por una placa de acceso 20. La abertura 18, situada sobre el lateral del rectángulo de la cámara de descarga de chispas, opuesto al electrodo 14, se cubre finalmente con una hoja de carga 22.

El electrodo 14 se conecta a una fuente adecuada de voltaje de descargas eléctricas (no mostrada). Una fuente adecuada de voltaje de descargas eléctricas comprende un condensador eléctrico del tamaño de uno a dos microfaradios. El voltaje de la carga introducida dentro del condensador debe poderse ajustar. Un voltaje ajustable puede introducirse fácilmente en un condensador de este tipo a través de un autotransformador el cual puede ajustarse en un margen de uno a cincuenta mil voltios. De preferencia, va provisto de un interruptor de alto voltaje eléctrico de forma que el condensador pueda descargarse con seguridad a través de los electrodos 14 sin peligro para el operador.

Se coloca una hoja de soporte 22 sobre la abertura 18 de la cámara de descarga de chispas 12. La hoja de soporte 22 es una hoja plana de un material relativamente rígido que es capaz de llevar pequeñas partículas inertes de carga que se encuentran sobre la misma contra la superficie diana. De preferencia la hoja de soporte 22 es una delgada hoja de Mylar aluminizado, recubierto de Saran. Es de preveer que puedan utilizarse otros materiales planos, relativamente rígidos, para la hoja de soporte 22. La función de la hoja de soporte 22 es la de convertir una fuerza aparentemente extraordinaria producida por los electrodos, en una fuerza horizontal ampliamente distribuida capaz de acelerar un gran número de partículas de carga en paralelo con una fuerza uniforme. Pueden emplearse otras clases de fuerza distintas de la descarga eléctrica para propulsar la hoja de soporte hacia 22 arriba. La fuerza debe poder ajustarse de forma que la fuerza del recorrido de la hoja de soporte 22 puede ser ajustada.

Con referencia nuevamente al aparato de las

figuras 1 y 2, una pantalla de retención 24 se encuentra aproximadamente 15 milímetros encima de la abertura 18 y la cámara de descarga 12. Una superficie diana 26 está situada encima de la pantalla de retención 24 a una distancia entre 5 y 25 milímetros. La superficie diana 26 es cualquier superficie de cultivo adecuada sobre la cual puede colocarse fácilmente el tejido de arroz que se va a transformar. Hemos encontrado que puede emplearse una cápsula de Petri vuelta al revés para la transformación de tejidos de una planta. Empleando un medio con una base de agar sólido en el fondo de una cápsula de Petri, es posible colocar tejidos de arroz sobre el agar en donde quedarán retenidos. La misma cápsula de Petri puede servir como superficie diana al retener los tejidos de arroz sobre el agar.

Las partículas recubiertas con el ADN se disponen en forma de una capa sobre la parte superior de la hoja soporte 22. La aplicación en forma de capa se hace para distribuir un modelo relativamente plano de partículas de carga, a través de toda la superficie superior de la hoja de soporte 22. De preferencia las partículas de carga recubiertas, se aplican a la hoja soporte en una proporción de 0,025 a 0,050 miligramos de partículas de carga recubiertas, por centímetro cuadrado de hoja soporte. La hoja soporte 22 se coloca encima de la abertura 18. La superficie diana 26 con el tejido de arroz en la misma, se coloca en su posición encima de la pantalla de retención 24. Una pequeña gota de agua, de preferencia 10 microlitros, se coloca en la cámara formando un puente entre los extremos de los dos electrodos 14. La cubierta de acceso 20 se coloca en su posición sobre la parte superior de la cámara de descarga de chispas 12.

En este momento, se encierra todo el aparato dentro de una cámara de vacío y se aplica un vacío del orden de aproximadamente 500 milímetros de mercurio. Cuando el vacío está hecho se absorbe una cantidad de helio en la cámara de vacío. De esta forma, la cámara de vacío tiene un relativo vacío comparado con la atmósfera, y la atmósfera dentro del vacío contiene helio. La más baja densidad del helio, combinada con la presión reducida disminuye la resistencia tanto sobre la hoja soporte 22 como sobre las partículas de carga. Al mismo tiempo, dado que la placa de acceso 20 y la hoja soporte 22 están colocadas tapando la cámara de descarga 12 desde antes de aplicar el vacío, dentro de la cámara de descarga 12 permanece una alta presión de aire puro que todavía no ha sido desplazado por el helio.

El procedimiento de transformación mediante partículas aceleradas se inicia en este punto. El voltaje del condensador se descarga eléctricamente a los electrodos 14. Los voltajes empleados en el presente procedimiento han sido del orden de 10-25 kV. Se prefiere un valor de 10-16 kV. El voltaje se descarga mediante el empleo de un interruptor eléctrico apropiado, descrito más arriba. La fuerza de la descarga eléctrica origina una chispa la cual salta en el hueco entre los electrodos 14 y vaporiza la pequeña gota de agua que se había colocado entre los electrodos. La fuerza de vaporización crea una onda de choque atmosférica violenta dentro de la cámara de

descarga de chispas 12. La onda de choque irradia hacia fuera a partir de los electrodos en todas las direcciones. Debido a los lados fijos de la cámara, el impacto de la onda de choque radiante sobre el interior de la cámara de descarga 12 se enfoca hacia la hoja de soporte 22, la cual a continuación es propulsada hacia arriba con gran velocidad. La hoja de soporte 22 que se desplaza hacia arriba, acelera hacia arriba con gran fuerza hasta que choca con la pantalla de retención 24. El desplazamiento de la atmósfera residual en la cámara con helio ayuda en el desplazamiento de la hoja de soporte 22, dado que el helio proporciona menos resistencia al desplazamiento de la hoja de soporte, así como también sobre las propias partículas de carga. En la pantalla de retención 24, la hoja de soporte 22 impacta contra la pantalla de retención 24 y es retenida. Las partículas recubiertas de ácido nucleico en cambio, salen disparadas fuera de la hoja soporte y se desplazan libremente hacia los tejidos de arroz diana. A continuación, las pequeñas partículas de carga, impactan contra el tejido de arroz sobre la superficie diana y siguen su camino hasta el interior de las células del tejido.

D. Regeneración de las plantas de arroz

Deben crearse las plantas a partir de los tejidos bombardeados de los embriones y de los discos de meristema. Bien a nivel celular o a nivel de la planta, las plantas deben ser investigadas o seleccionadas para separar los tejidos y plantas transformados, de los tejidos y plantas no transformados, debido a que en la mayoría de casos de transformación de plantas inducida mediante partículas, las plantas no transformadas serán la mayoría de las plantas recuperadas. En los métodos de la invención se utilizan técnicas de selección. Por ejemplo, los embriones de arroz y discos de meristema bombardeados con pCMC2114 pueden hacerse crecer en presencia del herbicida Bialaphos, y una vez crecidas se seleccionan las plantas transformadas de las plantas no transformadas. Para realizar la selección, puede emplearse o bien una exposición continuada al agente selectivo o bien tiene lugar un breve contacto con el agente. Para determinar si la planta tiene una línea germinal transformada, debe ensayarse la descendencia de la planta para detectar la presencia del gen o genes foráneos. El protocolo de selección no se ha demostrado como totalmente eficaz, debido a un número importante de fallos no transformados. Sin embargo, el empleo de una selección es de utilidad, puesto que enriquece el grupo de plantas potencialmente transformadas, el cual debe seleccionarse en el sentido de que se obtendrá un tanto por ciento mayor de plantas seleccionadas que se habrán transformado, comparado con el tanto por ciento recuperado de plantas sin seleccionar.

1. Regeneración a partir de embriones de Indica

En primer lugar, deben inducirse los callos a partir de las células transformadas. Los métodos de inducción de callos son ya bien conocidos en la técnica de la biología vegetal. Por ejemplo, Hartke y Lorz, *J. Genet. & Breeding* 43: 205-214 (1989), han descrito la embriogénesis somática y

regeneración vegetal de varios genotipos de Indica. Puede también emplearse un medio MS con adición de 2,4-D, pero parece dar resultados menos óptimos. Los embriones bombardeados se transfieren a un medio que promueve el crecimiento de los callos. Un medio adecuado es el medio CC suplementado con 1 g/litro de hidrolizado de caseína y 2 mg/litro de 2,4-D. Una condición adecuada para el crecimiento es la de 25°C en la oscuridad. Después de aproximadamente cuatro semanas, se forma el callo.

Los retoños deben inducirse a partir de los callos transformados. Un medio adecuado de inducción de los retoños, es el medio CC que contiene 0,05 mg/litro de zeatina y 1 mg/litro de IAA (esta combinación recibe el nombre de "CCIZ1"). Condiciones de crecimiento adecuadas son 16 horas de fotoperíodo a 26°C. Los retoños aparecen típicamente después de 10-20 días. A continuación, se separan los retoños para un subcultivo sobre CCIZ1. Estos retoños o cualquier otro tejido bombardeado o transformado, puede ser ensayado para detectar la presencia del gen foráneo. Los retoños se enraízan en un medio adecuado tal como el medio 1/2 MS con 20 g/litro de sucrosa y 0,5 mg/litro de IBA, y se desarrollan en plantas maduras de arroz. Las plantas maduras de arroz pueden ser ensayadas para detectar la presencia del gen foráneo.

A continuación, se verifica la capacidad de que el gen foráneo sea heredado.

2. Regeneración de embriones de Japonica mediante la embriogénesis

La regeneración de los embriones de Japonica es muy similar a la de los embriones de Indica. Sin embargo, se prefiere generalmente el medio MS sobre el medio CC para Japonica. Después de los bombardeos, se coloca el embrión de Japonica en medio MS que contenga 0,5 mg/litro de 2,4-D para inducir el crecimiento de los callos. Después de aproximadamente dos semanas, los callos se transfieren a un medio para el desarrollo de los retoños, como por ejemplo el medio MS conteniendo 50 g/litro de sucrosa, 2 mg/litro de quinina, 1 mg/litro de NAA, 0,8 % de agar lavado y 300 mg/litro de hidrolizado de caseína. (esta combinación recibe el nombre de "MS+"). Las condiciones adecuadas para el crecimiento son 16 horas de fotoperíodo a 26°C. Los retoños se desarrollan después de 7-14 días y se pasan a un medio que promueve un desarrollo posterior, como por ejemplo el medio MS conteniendo 1 mg/litro de IAA y 1 mg/litro de zeatina. Se colocan retoños individuales sobre un medio acondicionador para enraizamiento, como por ejemplo medio 1/2 MS con 20 g/litro de sucrosa y 0,5 mg/litro de IBA, y se desarrollan en plantas maduras. Como con las Indicas, se investiga o bien el tejido transformado o bien las plantas maduras, para detectar el gen foráneo. A continuación, se verifica la capacidad de herencia del gen foráneo.

Independientemente de la variedad, Japonica o Indica o de la mezcla, la regeneración de las plantas puede hacerse más fácilmente por embriogénesis, pero puede abarcar también retoños organogénicos. La embriogénesis se refiere al procedimiento mediante el cual un embrión somático se desarrolla a través de un modelo de desarrollo

similar a una embriogénesis zigótica y forma una planta completa. Los retoños embriogénicos predominan en los protocolos de regeneración descritos más arriba. Los retoños embriogénicos parece como si se originasen a partir de células individuales principales ya que los mismos son clonales, o no quiméricos. Los procedimientos organogénicos abarcan el desarrollo de la estructura orgánica (a saber, retoños ó raíces) de estructuras de tejido diferenciado y darán normalmente origen a plantas quiméricas. Sorprendentemente en estos cultivos de callos, predomina la regeneración embriogénica y los embriones transformados clónicos se recuperan a frecuencias relativamente altas.

3. *Regeneración de discos de meristema empleando la organogénesis*

Después que los discos de meristema han sido bombardeados, los discos deben transferirse inmediatamente a un medio que promueve la aparición de retoños. Un medio adecuado es el medio MSR (medio MS con BAP a 0,38 mg/litro e IBA a 0,4 mg/litro con un fotoperíodo de 16 horas a 26°C. Después de que estos discos empiezan a formar retoños, el disco debe transferirse al medio MS+ (descrito *más arriba*). Típicamente se formarán múltiples retoños y raíces. Estos retoños deben transferirse a un medio promotor de raíces como por ejemplo medio 1/2 MS con 0,5 mg/litro de IBA para una posterior aparición de raíces para desarrollar plantas maduras. Como ocurre con los embriones regenerados, o bien los retoños o las plantas maduras, pueden ensayarse para detectar la presencia del gen foráneo. A continuación, se verifica la capacidad de transmitir el gen foráneo por herencia.

Ejemplos

A. transformación de embriones de arroz empleando el procedimiento Japonica

Se recogieron semillas de un arroz Gulfmont cultivado en invernadero, una variedad popular en los U.S. Cuando se realizó este experimento, se creía que el Gulfmont era una variedad Japonica pura. La posterior información detallada del pedigree indicó que éste no es el caso y que el Gulfmont puede incluir tanto una herencia Indica como una herencia Japonica. Las semillas inmaduras se esterilizaron sumergiéndolas en solución de hipoclorito durante cinco minutos y a continuación se enjuagó intensivamente en una solución de SDW (agua destilada estéril) y CCB (carbencillín a 400 mg/litro, cefotaxime a 100 mg/litro, y benomyl a 50 mg/litro). Las brácteas que rodeaban las semillas se eliminaron microscópicamente y las semillas se colocaron de nuevo en una mezcla de SDW y CCB. Las semillas inmaduras se esterilizaron de nuevo en hipoclorito al 50 % durante un minuto y se enjuagaron cuatro veces en una mezcla de SDW y CCB.

Los embriones inmaduros se cortaron de las semillas esterilizadas. Estos embriones eran de un tamaño entre 0,5 y 1,5 mm. Los embriones cortados se plaquearon con el scutellum en medio CC conteniendo adicionalmente 2,0 mg/litro de 2,4-D y 1 g/litro de hidrolizado de caseína y se guardaron en la oscuridad a 25°C durante 24 horas.

Después de 24 horas de preacondicionado, los embriones se bombardearon con partículas de

carga recubiertas con el plásmido pCMC2114 (figura 3). En este ejemplo, se bombardearon aproximadamente 100 embriones a 10-16 kV. A los dos días después del bombardeo, los explantes se plaquearon sobre medio MS al cual se había añadido 2,4-D a 0,5 mg/litro y Bialaphos a 10 mg/litro. La selección con Bialaphos se mantuvo a través del cultivo sobre el medio MS+. A continuación, los embriones se mantuvieron dos semanas sobre el medio de inducción de callos.

Después de la inducción de los callos, los callos se transfirieron al medio MS+ y se expusieron durante dieciséis horas a un fotoperíodo a 26°C. Los retoños se desarrollaron a partir de este callo. Una vez los retoños se hubieron desarrollado, se retiraron para un cultivo posterior sobre medio MS conteniendo adicionalmente 1 mg/litro de IAA y 1 mg/litro de zeatina. Los retoños individuales enraizaron sobre un medio 1/2 MS que contenía 20 g/litro de sucrosa y 0,5 mg/litro de IBA.

De cada 100 explantes, se recuperaron dieciocho retoños. Cuando se sometieron a un ensayo histoquímico del gen GUS, resultaron por lo menos tres retoños parcialmente positivos. Un retoño se ensayó destructivamente y resultó completamente azul. Otro retoño mostró una reacción positiva en un ensayo de la reacción en cadena de la polimerasa, PCR, pero pareció ser un transformado no de la línea germinal. Otro retoño que había dado un ensayo PCR positivo para una sección pequeña del retoño, se pasó al invernadero y se plantó en una mezcla para arroz (partes iguales de arena, turba, perlita, y tierra). Esta planta ha madurado ahora y tiene descendencia. La propia planta (RO) se encontró que expresaba tanto los genes GUS como los genes BAR en todas las hojas de la planta. Un análisis Southern blot del ADN de la planta verificó la presencia del ADN para ambos genes. Estos resultados indican que esta planta de arroz tiene una línea germinal transformada. La descendencia de la planta se encontró que expresaba los productos de los genes codificados por pCMC2114. La segregación de los transgenes en la primera generación de la progenie (R1) fue en la proporción esperada de 3:1.

Varios cientos de la progenie R1 de la planta se cultivan ahora hasta la madurez. El análisis Southern blot ha confirmado una integración estable y la transmisión por herencia del ADN insertado. Las plantas son también muy resistentes a la aplicación del herbicida inhibidor de la glutamina sintasa. La aplicación del herbicida BASTA (un nombre comercial del Bialaphos) a una proporción de 500 ppm en aplicación foliar no ha lesionado visiblemente las plantas, las cuales continúan creciendo y mantienen su vigor. En ensayos destructivos (para el GUS), los embriones clonales transformados pudieron recuperarse en una proporción entre 10 % y 50 % de los embriones recuperados, con o sin selección.

B. transformación de embriones de arroz Indica

El método de transformación del arroz Indica practicado aquí es muy similar al del arroz Japonica. Los embriones de Indica bombardeados han sido cultivados en un medio más óptimo para su crecimiento.

Las semillas fueron recogidas de los panículos del arroz IR54 de invernadero, una variedad de Indica. Las semillas inmaduras se esterilizaron sumergiéndolas en hipoclorito al 50 % durante 5 minutos y se enjuagaron a fondo en una mezcla de SDW y CCB. Se eliminaron microscópicamente las brácteas que rodeaban la semilla, y la semilla se colocó en una mezcla de SDW y CCB. La semilla inmadura se esterilizó de nuevo con hipoclorito al 50 % durante un minuto y se enjuagó cuatro veces en SDW y CCB.

Se cortó la cubierta de la semilla de los embriones inmaduros de 0,5 mm a 1,5 mm, y se preconditionaron para la transformación en un medio CC (tabla 1) suplementado con 1 g/litro de hidrolizado de caseína y 2 mg/litro de 2,4-D. Los embriones se colocaron en la oscuridad a 25°C. Después de 24 horas en este medio los embriones fueron bombardeados con partículas de carga recubiertas de ácido nucleico, como se ha descrito más arriba. En este ejemplo, fueron bombardeados aproximadamente 100 embriones a 10 kV con partículas recubiertas con el plásmido pCMC1515. El plásmido pCMC1515 es similar al pCMC2114 excepto que en lugar de una secuencia que codifica el gen *BAR*, incluye una secuencia que codifica la resistencia a la higromicina.

Después del bombardeo, los embriones se colocaron en un medio CC con 1 g/litro de hidrolizado de caseína y 2 mg/litro de 2,4-D y permanecieron en la oscuridad a 25°C durante cuatro semanas. Dos días después del bombardeo, se efectuó la selección con higromicina durante dos semanas. Después de cuatro semanas, los callos fueron transferidos a un medio CC conteniendo 0,05 mg/litro de zeatina y un mg/litro de IAA con un fotoperíodo de 16 horas a 26°C. Los retoños aparecieron y se separaron para subcultivar en CCIZ1. Los retoños separados se enraizaron en medio 1/2 MS con 20 g/litro de sucrosa y 0,5 mg/litro de IBA.

Hemos ensayado un gran número de retoños para detectar la actividad GUS por medio del ensayo histoquímico estándar. Han sido recuperadas regularmente plantas transformadas pero no en la línea germinal. Ha sido identificada también una planta transformada en la línea germinal, la cual es PCR positiva para ambos transgenes, y la cual expresa el GUS en todos sus tejidos.

C. transformación de discos de meristema, y regeneración mediante organogénesis

La transformación mediante discos de meristema es independiente del genotipo de arroz. Aunque la planta de arroz de la cual se tomaron los discos del ejemplo que sigue fue un arroz Indica, el arroz Japonica puede ser transformado de una forma casi idéntica. Las semillas secas se eliminaron de plantas de arroz crecidas en un invernadero y se trataron con arena para eliminar el pericarpo. Las semillas tratadas con arena se esterilizaron enjuagando una vez en etanol al 95 %. A continuación, las semillas se enjuagaron en SDW con Carbencillin (400 mg/litro), Cefotaxime (100 mg/litro), y Benlate (0,05 g/litro).

Las semillas esterilizadas se empaparon a continuación en una mezcla de SDW y CCB (descritos más arriba) más 1 % de "Antilife". El Antilife es una mezcla de Bravo (WP 75 %) 10,0 g/litro,

Benomyl (DF 50 %) 10 g/litro, y Captan (WP 50 %) 10,0 g/litro. Las semillas se empaparon a 28°C en la oscuridad durante 24 horas. Después de empaparse, las semillas se sumergieron en hipoclorito al 50 % durante diez minutos. Las semillas esterilizadas se enjuagaron cinco veces en una mezcla de SDW y CCB.

Las semillas esterilizadas se plaquearon con el lado del embrión hacia arriba, en medio 1/2 MS con 20 mg/litro de sucrosa, 400 mg/litro de Carbencillin, 100 mg/litro de Cefotaxime y 0,05 g/litro de Benlate a 26°C con un fotoperíodo de 16 horas. Durante este tiempo aparecieron pequeños plantones de arroz. Después de aproximadamente 5-7 días, se cortaron los discos de los plantones en la región de unión de la rizosfera y el ápice del retoño. Esta es la región del meristema del retoño. Estos discos se cortaron haciendo dos cortes horizontales en esta unión. Se obtuvo un disco de 0,5 a 1,5 mm de grueso.

Los discos de meristema se preconditionaron durante veinticuatro horas en la oscuridad en medio CC suplementado con 2 mg/litro de 2,4-D en condiciones pobres de oxígeno. Después de veinticuatro horas de preconditionamiento, los discos de meristema estaban preparados para ser bombardeados. En este ejemplo, se bombardearon 50 discos de meristema a 12-18 kV con partículas recubiertas con plásmido pCMC2114 (figura 3). Las condiciones del bombardeo fueron las mismas que se han descrito más arriba.

Después del bombardeo los discos fueron transferidos inmediatamente al medio MSR. Los discos bombardeados se plaquearon con el extremo basal hacia abajo, en medio MSR con un fotoperíodo de dieciseis horas a 26°C. Después de aproximadamente 2 semanas los discos empezaron a formar retoños. Cuando los retoños alcanzaron de 5 a 10 mm, después de aproximadamente 3-5 días, el complejo disco/retoño completo se transfirió a un medio MS+ durante una a dos semanas. En este momento, se formaron múltiples retoños y raíces. A continuación se transfirió todo el complejo a un cultivo en medio MS al 50 %, al cual se habían añadido 20 g/litro de sucrosa y 0,5 mg/litro de IBA, y se cultivó durante una semana antes de la división. El complejo se dividió en retoños individuales y se transfirió a un medio 1/2 MS con 0,5 mg/litro de IBA para un posterior enraizado.

Hasta el momento actual no ha sido obtenida por este método ninguna planta transformada en la línea germinal. Sin embargo, hay que esperar transformados de la línea germinal en base al número de plantas quiméricas que hemos visto hasta la fecha. De los 50 discos bombardeados, se encontraron 9 retoños que fueron positivos cuando se ensayaron mediante PCR. Los retoños que dieron un PCR positivo se transfirieron a un invernadero para un posterior crecimiento. En otras especies y sistemas, la recuperación de plantas quiméricas con esta eficacia ha conducido también a la recuperación, con una baja eficacia, de casos de transformados de la línea germinal.

D. Selección de los transformados

En los sistemas de recuperación de embriones para Japonica e Indica, descritos más arriba, la

selección y/o enriquecimiento de posibles transformados mediante estrés herbicida o antibiótico, parece ser funcional. Se transfirieron varios cultivos de callos a un medio de inducción embrionica al cual se había añadido Bialaphos a 10 mg/litro. En experimentos repetidos terminados por un ensayo terminal (para detectar la presencia

de GUS), los callos suministraron grandes cantidades de retoños, de los cuales muchos resultaron por análisis como clonalmente transformados. De esta forma, aunque la selección puede no ser completa, el enriquecimiento de la población de retoños recuperados parece justificar dicha selección.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un método de creación de una planta de arroz transformado, que comprende los siguientes pasos:

(a) Preparación de copias de una construcción de ácido nucleico;

(b) Recubrimiento con las copias de la construcción de ácido nucleico, de partículas de carga biológicamente inertes;

(c) Aislamiento de los embriones inmaduros de arroz;

(d) Colocación de los embriones cultivados sobre una superficie diana;

(e) Bombardeo de los embriones cultivados con las partículas de carga recubiertas con ácido nucleico, en donde las partículas se aceleran físicamente contra la superficie diana de tal manera que algunas partículas se introducen en el interior de por lo menos algunas de las células de los embriones;

(f) Cultivo de los embriones bombardeados de forma que los retoños surgen de los embriones bombardeados y se enriquece el porcentaje de retoños recuperados que han sido transformados, mediante la exposición de los retoños a un agente de selección;

(g) Cultivo de los retoños formados en el paso (f), en plantas maduras sexualmente completas;

(h) Verificación de la presencia de la construcción de ácido nucleico en los retoños formados en el paso (f) ó en las plantas formadas en el paso (g); y

(i) Verificación de la capacidad de transmisión por herencia, de la construcción de ácido nucleico.

2. El método de la reivindicación 1, en donde los embriones se preconditionan antes del paso (e).

3. El método de la reivindicación 1, en donde el preconditionamiento incluye el cultivo de los embriones en presencia de una auxina.

4. El método de la reivindicación 1, en donde la longitud del embrión cortado es aproximadamente de 0,5 a 1,5 mm.

5. El método de la reivindicación 1, en donde el embrión cortado es una variedad de Indica.

6. El método de la reivindicación 1, en donde el embrión cortado es una variedad de Japonica.

7. El método de la reivindicación 1, en donde el paso (f) incluye la inducción de un cultivo embriogénico de los callos de cada embrión y cultivo de los embriones de los callos embriogénicos en

retoños.

8. El método de la reivindicación 1, en donde el agente de selección es el herbicida Bialaphos.

9. Un método de creación de una planta de arroz transformada que comprende los pasos siguientes:

(a) Preparación de copias de una construcción de ácido nucleico;

(b) Recubrimiento con las copias de la construcción de ácido nucleico, de partículas de carga biológicamente inertes;

(c) Aislamiento de un disco de meristema a partir de una semilla de arroz;

(d) Colocación del disco de meristema sobre una superficie diana;

(e) Bombardeo del disco de meristema con las partículas de carga recubiertas con ácido nucleico, en donde las partículas se aceleran físicamente contra la superficie diana de tal manera que algunas partículas se introducen en el interior de por lo menos algunas de las células del meristema;

(f) Cultivo de los discos de meristema bombardeados, de tal manera que aparecen retoños de por lo menos algunos de los discos bombardeados, y enriqueciendo el porcentaje de retoños recuperados que se han transformado, mediante exposición de los retoños a un agente de selección;

(g) Cultivo de los retoños formados en el paso (f) obteniendo plantas completas sexualmente maduras;

(h) Verificación de la presencia de la construcción de ácido nucleico en los retoños formados en el paso (f) ó en las plantas formadas en el paso (g); y

(i) Verificación de la capacidad de transmisión por herencia de la construcción de ácido nucleico.

10. El método de la reivindicación 9, en donde el disco de meristema cortado se preconditiona antes del paso (e).

11. El método de la reivindicación 9, en donde el preconditionamiento incluye el tratamiento con una auxina.

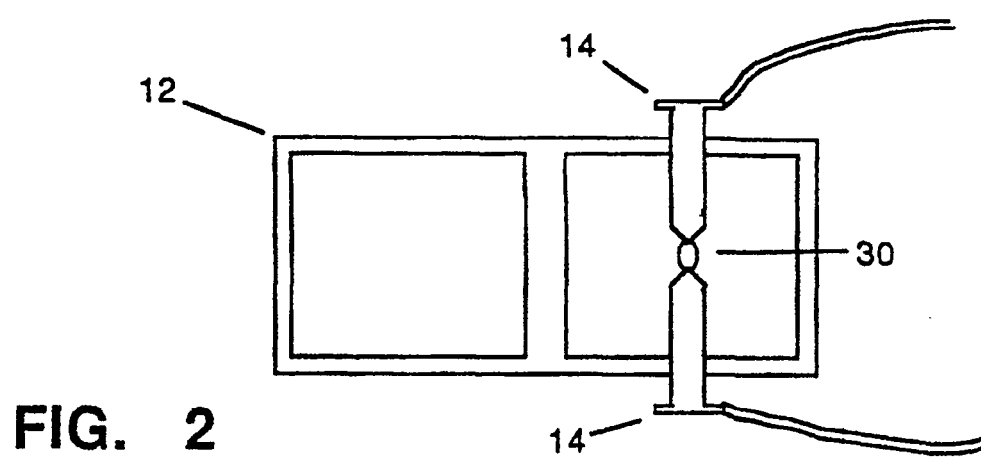
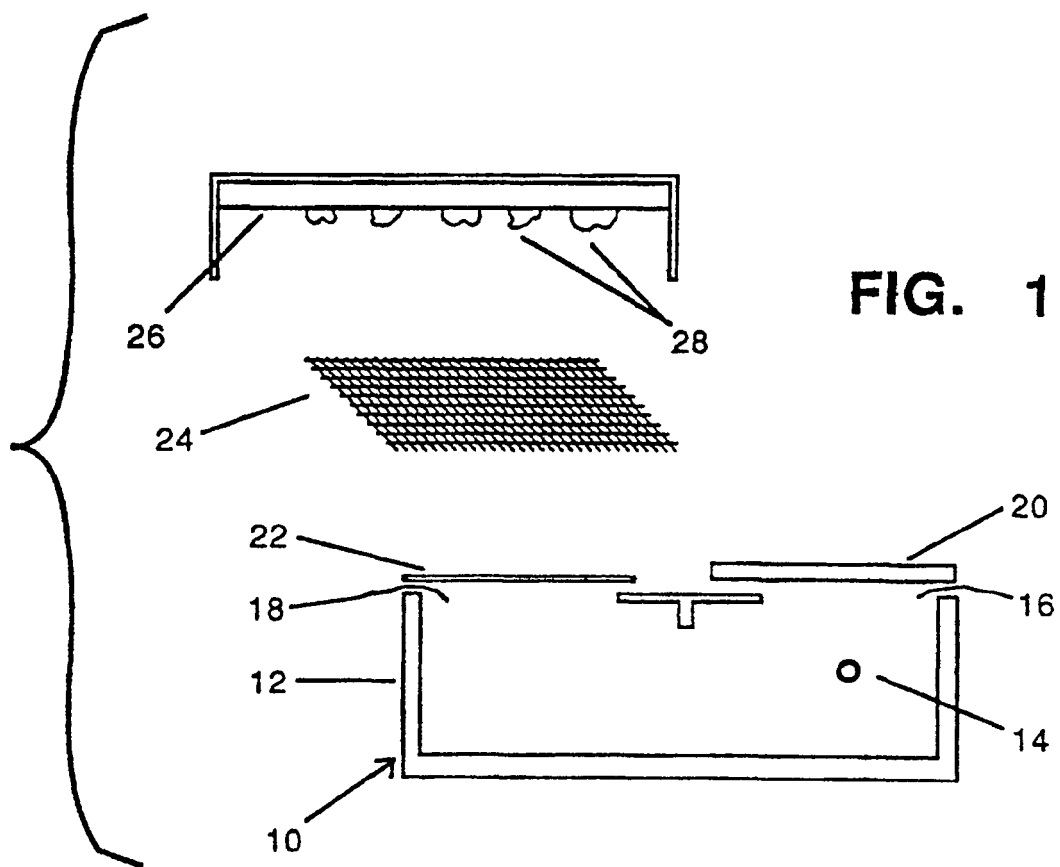
12. El método de la reivindicación 9, en el cual el grueso del disco de meristema cortado es aproximadamente de 0,5 a 1,5 mm.

13. El método de la reivindicación 9, en donde el disco de meristema cortado es de una variedad Indica.

14. El método de la reivindicación 9, en donde el disco de meristema cortado es de una variedad Japonica.

NOTA INFORMATIVA: Conforme a la reserva del art. 167.2 del Convenio de Patentes Europeas (CPE) y a la Disposición Transitoria del RD 2424/1986, de 10 de octubre, relativo a la aplicación del Convenio de Patente Europea, las patentes europeas que designen a España y solicitadas antes del 7-10-1992, no producirán ningún efecto en España en la medida en que confieran protección a productos químicos y farmacéuticos como tales.

Esta información no prejuzga que la patente esté o no incluida en la mencionada reserva.



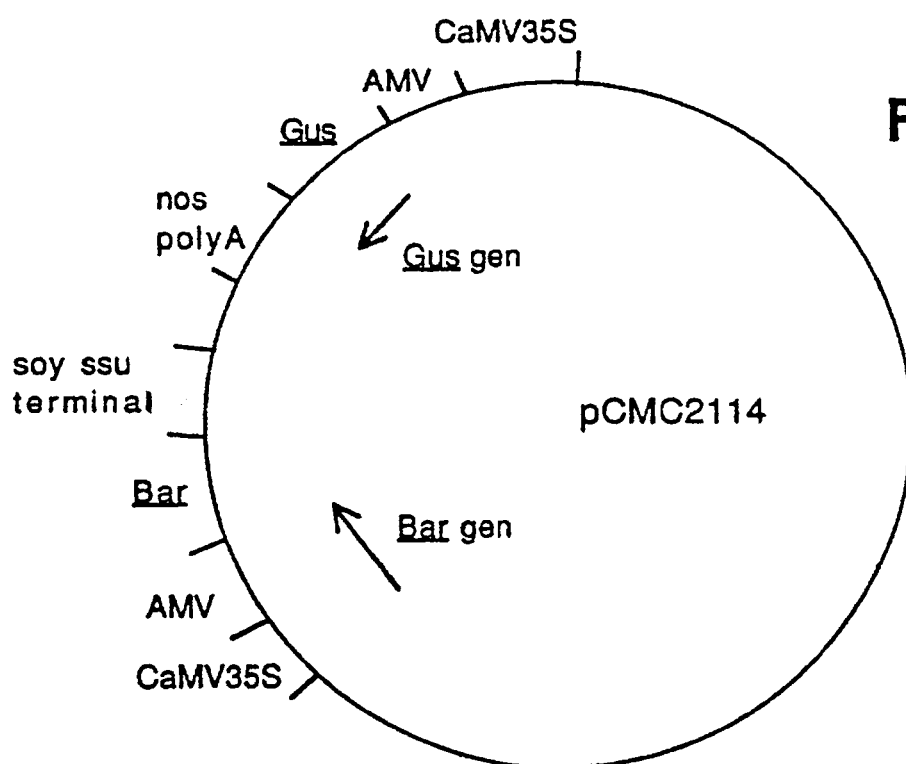


FIG. 3