



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 253 237**

⑤① Int. Cl.⁷: **C12N 1/04**, C12N 5/10
C12N 15/00, C12N 15/09
C12N 15/63, C12N 15/82
A01H 1/00, A01H 5/00

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧⑥ Número de solicitud europea: **00947546 .8**

⑧⑥ Fecha de presentación : **18.07.2000**

⑧⑦ Número de publicación de la solicitud: **1407000**

⑧⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **14.04.2004**

⑤④ Título: **Método de transformación y plantas transgénicas así producidas.**

③⑩ Prioridad: **19.07.1999 US 144513 P**
07.07.2000 US 611736

④⑤ Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.06.2006

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.06.2006

⑦③ Titular/es: **Plant Bioscience Limited**
Norwich Research Park, Colney Lane
Norwich, Norfolk NR4 7UH, GB

⑦② Inventor/es: **Christou, Paul y**
Kohli, Ajay

⑦④ Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 253 237 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método de transformación y plantas transgénicas así producidas.

5 Esta solicitud reivindica su prioridad a partir de la patente estadounidense con nº de serie 60/144,513, incorporada en ésta por referencia en su totalidad.

Campo de la invención

10 Esta invención se refiere a procedimientos para producir plantas transgénicas con una elevada eficiencia, en donde las plantas transgénicas contienen pocas, si alguna, secuencias del vector, presentan patrones de integración del transgén sencillos, tienen el transgén integrada en sólo uno o unos pocos sitios de integración, contiene pocas copias del transgén en cada sitio de integración, y expresa de forma estable el transgén en todas las etapas de su desarrollo. Pocas, si alguna, de las plantas transgénicas producidas mediante este procedimiento presentan silenciamiento del transgén. El procedimiento comprende introducir "casetes mínimos de expresión del transgén", los cuales son casetes de expresión que sustancialmente carecen de secuencias del vector, mediante técnicas de transferencia de ADN, en particular, el bombardeo de células vegetales intactas con partículas.

Antecedentes de la invención

20 Generar plantas transgénicas es actualmente un procedimiento rutinario, bien a través de la transformación mediada por *Agrobacterium* o mediante procedimientos de transferencia directa del ADN (Gelvin, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 9:227-232 (1998); Komari *et al.*, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 1:161-165 (1998); Tyagi *et al.*, *Crit. Rev. Biotechnol.*, 19:41-79 (1999)). Se han transformado muchas especies mono y dicotiledóneas comercialmente importantes. Sin embargo, aunque el procedimiento de transformación en sí mismo ya no es considerado un paso limitante, la recuperación de líneas transgénicas útiles está dificultada por los niveles de expresión variables y el silenciamiento de los transgenes (Flavell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:3490-3496 (1994); Finnegan, *Ann. Rev. Plant Physiology*, 49:223-247 (1998)). El silenciamiento completo o parcial del transgén se ha atribuido a un cierto número de factores, incluyendo el número de copias de los genes integrados (Matzke y Matzke, *Plant Physiol.*, 107:679-685 (1995) y Matzke *et al.*, *Mol. Gen. Genet.*, 244:219-229 (1994)), la posición de integración del transgén, (Hobbs *et al.*, *Plant Mol. Biol.*, 15:851-864 (1990); Peach y Velten, *Plant Mol. Biol.*, 17:49-60 (1991); Matzke y Matzke, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 1:142-148 (1998)), la configuración y la estructura del locus transgénico (Stam *et al.*, *Plant J.*, 12:63-82 (1997)), la integridad estructural de los transgenes individuales (Kohli *et al.*, 1998) y las propiedades genéticas de la planta huésped (por ejemplo, los antecedentes genéticos, la ploidía, y la cigosidad) (Beaujean *et al.*, *Mol. Gen. Genet.*, 260:362-371 (1998)).

La transformación mediante plásmido completo es aún prácticamente universal en los sistemas vegetales. Esto podría deberse a la necesidad de secuencias del vector *Agrobacterium* en la transformación mediada por *Agrobacterium*. El vector *Agrobacterium* esencialmente es portador de los genes *vir* requeridos para la escisión, transferencia e integración del ADN-T. En los procedimientos de transformación previamente descritos, el casete del transgén que codifica un producto deseado se clona dentro de un vector, por ejemplo, un plásmido, un virus o un plásmido Ti de *Agrobacterium*, y la totalidad del vector que contiene el casete del transgén se introduce en la célula vegetal. Sin embargo, las secuencias del vector no sirven para el propósito requerido de la transferencia e integración del ADN en los procedimientos de transferencia directa del ADN tales como, por ejemplo, el bombardeo con partículas. Los procedimientos de la invención generan plantas transgénicas que muestran la expresión estable del transgén con una frecuencia mayor a la producida por los procedimientos descritos previamente. En las realizaciones en la que se introducen dos o más transgenes simultáneamente en las plantas, la frecuencia de coexpresión del transgén es superior a la frecuencia de coexpresión producida por los procedimientos descritos previamente. Las plantas transgénicas producidas por los procedimientos descritos en ésta presentan patrones de integración sencillos, un número bajo de copias del transgén, y en general no presentan silenciamiento del transgén.

Breve descripción de las figuras

55 La Figura 1 ilustra una transferencia Southern de ADN genómico procedente de plantas de arroz transgénicas para *bar*, digeridas con *SfiI* (S) o con *HindIII* (H) "no cortadoras", las cuales cortan una vez dentro del casete del transgén y se hibridan con una sonda para *bar*.

60 La Figura 2 ilustra una transferencia Southern de ADN genómico procedente de plantas de arroz transgénicas para *hpt*, digeridas con *SalI*, que corta en el extremo 3' del casete del transgén, e hibridadas con una sonda *hpt*. M=marcadores.

La Figura 3 ilustra una transferencia Southern de ADN genómico procedente de 18 plantas de arroz transgénicas para *hpt-gusA*, digeridas con *NcoI*, que corta en el extremo 5' del casete del transgén, y sondeadas con una sonda *gusA*. M=marcadores.

Descripción detallada de la invención

Una propiedad no deseada de las secuencias estructurales del vector es su tendencia a promover los reordenamientos del transgén. La implicación de la estructura del vector en los sucesos de recombinación vector-vector ha sido mencionada por varios grupos, y se han identificado un cierto número de puntos calientes de recombinación que estimulan la recombinación ilegítima a través de la formación de estructuras secundarias estables. Un punto caliente concreto es el origen de replicación del vector, el cual podría representar una diana para las nucleasas y topoisomerasas implicadas en los sucesos de recombinación ilegítimos. Además, los sitios consenso para topoisomerasas se hallan a menudo cerca de uniones de recombinación vector-vector y vector-genómica en plantas y animales. Otra desventaja de transformar las plantas con moléculas de ácido nucleico que comprenden secuencias del vector, es la preocupación de que replicones nuevos, que comprenden los orígenes de replicación del vector y el ADN genómico de la planta, pudieran escaparse al medio ambiente. Más aún, los elementos recombinogénicos en el esqueleto del vector podrían ser responsables de sucesos de multimerización compleja del vector que también implicaran segmentos del ADN genómico, resultando en la integración de grandes complejos del transgén. Las copias múltiples del transgén no son deseables, puesto que se cree que un número de copias elevado inhibe la expresión del transgén y contribuye a silenciar el transgén. Además, los loci transgénicos grandes pueden ser meióticamente inestables, conduciendo a la escisión del locus y a la pérdida de la expresión del transgén en generaciones subsiguientes. Por tanto, las secuencias estructurales del vector no son deseables, así como superfluas, en los procedimientos de transferencia directa del ADN.

Por tanto, es deseable generar plantas transgénicas con números bajos de copia del transgén, loci transgénicos pequeños, poca o ninguna silenciación del transgén, y expresión estable del transgén. Los procedimientos descritos en ésta consiguen estos resultados transformando células vegetales con casetes mínimos de expresión del transgén, los cuales son casetes de expresión de ADN que carecen sustancialmente de secuencias del vector, y con técnicas de transferencia directa del ADN. Este es el primer informe de plantas transgénicas estables que contienen un casete de expresión que carece de secuencias procedentes del vector en el cual se clonó originalmente.

La frecuencia de líneas de plantas transgénicas con sucesos de integración sencillos, con pocas copias, es mucho mayor para las plantas generadas mediante los procedimientos de esta invención, a saber, las plantas regeneradas a partir de células que se transformaron con casetes mínimos de expresión del transgén y técnicas de transferencia directa del ADN, en comparación con las células vegetales que se transformaron con vectores superenrollados o linearizados, por ejemplo, con plásmidos. Esto es cierto tanto para transgenes seleccionados como para los no seleccionados. Mientras que la eficiencia de la cotransformación es esencialmente la misma entre los casetes mínimos de expresión del transgén y las construcciones con plásmidos, la incidencia de la silenciación del transgén es mucho menor, y la frecuencia de coexpresión para transgenes múltiples es significativamente superior para aquellas plantas producidas mediante los procedimientos de esta invención, en comparación con los procedimientos previamente descritos. Estos resultados los discutimos más abajo en relación con los experimentos de cotransformación con casetes mínimos de expresión del transgén, que incluyen genes marcadores seleccionables, y casetes que codifican productos con interés agronómico.

Una realización de esta invención es una población heterogénea de plantas transgénicas, en donde al menos el 70% de las plantas transgénicas tienen un patrón sencillo de integración del transgén y una baja frecuencia de silenciación del transgén. Preferiblemente, la frecuencia de silenciación del transgén es inferior al 20% de las plantas transgénicas que tienen un patrón de integración sencillo, más preferiblemente menos del 5% experimentan la silenciación del transgén, y lo más preferiblemente, ninguna de las plantas de la población de plantas transgénicas que tienen patrones de integración sencillos, experimenta la silenciación del transgén.

Es también una realización de la invención un procedimiento para transformar células vegetales mediante la transferencia directa del ADN, particularmente el bombardeo con partículas, con uno o más casetes mínimos de expresión del transgén. Los casetes mínimos de expresión son casetes de expresión que consisten esencialmente en un transgén, el cual comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un producto deseado, tal como, por ejemplo, un enzima, una proteína de mamífero o ave, por ejemplo, un anticuerpo o un factor del crecimiento, o un factor para la resistencia contra un antibiótico o herbicida, o un ARN antisentido, en unión operativa con secuencias que regulan la expresión de la secuencia de ácido nucleico. El casete mínimo de expresión del transgén comprende al menos un transgén, el cual comprende al menos un promotor en unión operativa con una molécula de ácido nucleico, la cual tiene la secuencia que codifica un producto deseado y podría comprender también un operador, un potenciador, un terminador, o una señal de poliadenilación, etc., que regula la expresión del(de los) transgén(es). El casete mínimo de expresión del transgén carece sustancialmente de secuencias que no codifican o regulan la expresión del producto deseado. Por ejemplo, menos de aproximadamente el 10-15% del casete mínimo de expresión del transgén son secuencias del vector, es decir, secuencias de nucleótidos que no codifican un producto deseado o que regulan la expresión de ese producto. Preferiblemente, menos de aproximadamente 50 pares de bases del casete mínimo de expresión del transgén son secuencias del vector. Más preferiblemente, el casete mínimo de expresión del transgén comprende menos de aproximadamente 20 pares de bases que son secuencias del vector. Los más preferiblemente, el casete mínimo de expresión del transgén carece completamente de secuencias nucleotídicas que no son parte de un elemento que codifica el(los) producto(s) del(los) transgén(es), o regula la expresión del(os) producto(s) del(os) transgén(es) de interés.

Los procedimientos de esta invención producen eficientemente plantas transgénicas que contienen pocas, si alguna, secuencias del vector, presentan patrones de integración simples, tienen el transgén integrado en sólo uno o unos pocos

sitios de integración, contienen pocas copias del transgén en cada sitio de integración, y expresan el transgén de forma estable en todas las etapas del desarrollo.

Un patrón de integración simple refleja al menos uno, y no más de aproximadamente cinco sitios de integración dentro del genoma de la planta transgénica, en donde cada sitio de integración tiene al menos una, y no más de aproximadamente cinco, copias del transgén insertado en cada sitio. Preferiblemente, no hay más de tres sitios de integración en el genoma de la planta. Más preferiblemente, no hay más de un sitio de integración en el genoma de la planta. Preferiblemente, hay al menos una y no más de tres copias de cada transgén en cada sitio de integración. Más preferiblemente, hay una copia de cada uno de los transgenes que están presentes en un sitio de integración.

El patrón de integración del transgén sencillo podría detectarse en una transferencia Southern. Por ejemplo, una transferencia Southern preparada a partir de muestras de ADN genómico de la planta transgénica, digerido con (1) un enzima de restricción que no tiene un sitio de reconocimiento dentro del casete del transgén, antes de su integración dentro del ADN de la planta, y que sólo de forma infrecuente corta el ADN genómico de la planta, y (2) un enzima de restricción que tiene un único sitio de restricción dentro del casete del transgén. Un enzima que sólo de forma infrecuente corta el ADN genómico produce fragmentos de ADN genómico de al menos aproximadamente 64 kb. Un ejemplo de tal "cortador infrecuente" es un enzima de restricción que reconoce una secuencia de ocho pares de bases. La transferencia Southern del ADN digerido, e hibridado con una sonda específica para el transgén, en condiciones rigurosas (por ejemplo, $2\times$ SSC, 0,5% SDS a 65°C durante 20 minutos y $0,2\times$ SSC, 0,5% SDS a 65°C durante 20 minutos, o condiciones de rigurosidad equivalentes) exhibe un patrón de integración sencillo. El patrón de integración sencillo se manifiesta como solamente de una a tres bandas de ADN que se hibrida en el caso del ADN genómico digerido con el enzima que no tiene un sitio de reconocimiento en el transgén, y estas bandas se resuelven solamente en de una a tres bandas en el caso del ADN genómico digerido con el enzima que tiene un único sitio de reconocimiento dentro del casete del transgén.

Los procedimientos de esta invención producen eficientemente plantas transgénicas, en las que el transgén se expresa de forma estable en el tejido de la planta. Preferiblemente, al menos el 70% de las plantas transgénicas generadas a partir de las células vegetales transformadas expresan establemente el transgén, y esta expresión estable es heredada por la progenie de las plantas transgénicas. También se contemplan, dentro del ámbito de esta invención, las plantas de progenie que poseen la expresión estable de los transgenes, y su producción mediante el entrecruzamiento clásico de dos plantas transgénicas producidas mediante los procedimientos de esta invención.

También se proporcionan plantas, las cuales incluyen una célula vegetal acorde con la invención, junto con cualquier parte o propágulo de las mismas, semilla, progenie endogámica o híbrida, y descendientes. Una planta acorde con la presente invención podría ser una que no se ajusta a la variedad en una o más propiedades. Las variedades de la planta podrían excluirse, particularmente las variedades de planta registrables de acuerdo con los Derechos de los Obtentores. Se destaca que una planta no tiene porque considerarse "variedad de planta" simplemente porque contenga de forma estable un transgén en su genoma, introducido dentro de una célula de la planta o de un ancestro de la misma.

Las células vegetales podrían transformarse con el casete de expresión del transgén mínimo usando cualquier tecnología de transferencia de ADN apropiada, tal como, por ejemplo, el bombardeo con partículas o microproyectiles (patente estadounidense n° 5,100,792, EP-A-444882, EP-A-434616, incorporadas en ésta por referencia), la microinyección (WO 92/09696, WO 94/00583, EP 331083, EP 175966, Green *et al.*, *Plant Tissue and Cell Culture*, Academic Press (1987), incorporadas todas en ésta por referencia), la electroporación (EP 290395, WO 87/06614 incorporadas en ésta por referencia), la captación de ADN mediada por liposomas (por ejemplo, Freeman *et al.*, *Plant Cell Physiol.*, 29:1353 (1984) incorporada en ésta por referencia), el procedimiento de agitación por vórtice (Kindle, *PNAS USA*, 87:1228 (1990), incorporada en ésta por referencia), las fibras de carburo silíceo (patente estadounidense n° 5,302,523 incorporada en ésta por referencia) y otras formas de captación directa del ADN (patentes DE 4005152, WO 9012096, estadounidense n° 4,684,611, incorporadas todas ellas en ésta por referencia). Para una revisión de los procedimientos físicos para la transformación de células vegetales consultar, por ejemplo, Oard, *Biotech. Adv.*, 9:1-1 (1991). Preferiblemente, las células vegetales se transforman mediante bombardeo con partículas o microproyectiles.

Los especialistas en la técnica apreciarán que podrían usarse diferentes procedimientos para la regeneración de plantas transgénicas a partir de cultivos de células transformadas. Una planta podría regenerarse, por ejemplo, a partir de células aisladas, tejido de callo (del Tipo I ó Tipo II), discos de hojas, y embriones inmaduros o maduros, hipocótilos y cotiledones, tal como es estándar en la técnica. Prácticamente cualquier planta, por ejemplo, el arroz, trigo, maíz, avena, cebada, sorgo, legumbres, y especies madereras, puede regenerarse completamente a partir de células, tejidos y órganos de la planta. La generación de plantas transgénicas fértiles se ha conseguido con los cereales, por ejemplo, el arroz, maíz, trigo, avena y cebada (revisada en Shimamoto, K., *Current Opinion in Biotechnology*, 5:158-162 (1994); Vasil *et al.*, *Bio/Technology*, 10:667-674, (1992); Vain *et al.*, *Biotechnology Advances*, 13:4:653-671, (1995); Vasil, *Nature Biotechnology*, 14:702 (1996)). Las técnicas disponibles se revisan también en Vasil *et al.*, "Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants", volúmenes I, II, y III, *Laboratory Procedures and Their Applications*, Academic Press, (1984), Weissbach y Weissbach, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, (1989), y también en Christou, *Plant Mol. Biol.*, 163:39-44 (1997); Cao *et al.*, *Plant Gene Transfer*, "UCLA Symposium Molecular and Cellular Biology," 129:21-33 (1990), D'Halluin *et al.*, *Plant Cell*, 4:1495-1505(1992), y Lowe *et al.*, *Bio/Technology*, 13:677-682 (1995) (todas ellas incorporadas en ésta por referencia).

El casete de expresión del transgén mínimo podría contener uno o más genes marcadores genéticos, "marcadores

genéticos". Los especialistas en la técnica apreciarán que hay muchos tipos diferentes de marcadores genéticos que podrían incorporarse en el casete de expresión del transgén mínimo, y que la utilidad de un marcador genético depende del sistema huésped en donde va a expresarse el marcador. Los marcadores genéticos seleccionables útiles en esta invención incluyen cualquier gen que codifica un producto que proporciona una cierta ventaja de crecimiento a las células vegetales transformadas, o una ventaja de crecimiento a las plantas transgénicas que se regeneran a partir de esas células. Por ejemplo, el producto podría conferir resistencia contra un antibiótico, un herbicida, o un inhibidor metabólico. Los marcadores genéticos seleccionables podrían ser genes quiméricos que confieren fenotipos seleccionables, tales como, por ejemplo, la resistencia a antibióticos tales como la kanamicina, higromicina, fosfotricina, clorosulfurona, metotrexato, gentamicina, espectinomicina, estreptomycin, metotrexato, imidazolinonas, y glifosato. El marcador seleccionable podría codificar, por ejemplo, la acetiltransferasa de fosfotricina (*pat*) (De Block *et al.*, *EMBO J.*, 6:2513-2518 (1987)), la fosfotransferasa de higromicina (*hpt*) (Datta *et al.*, *Bio/Technology*, 8:736-740 (1990)) y otros enzimas tales como, por ejemplo, la fosfotransferasa de neomicina, la fosfotransferasa de kanamicina, la sintasa de epsp, la sintasa de acetolactato, y la isomerasa de manosa. Preferiblemente, el marcador genético seleccionable es el gen *bar* or *hpt*. El marcador genético podría ser también una molécula de ácido nucleico que codifica un producto que no confiere una ventaja de crecimiento en condiciones particulares, pero que permite que se identifiquen, que se "busquen", plantas que han incorporado el marcador genético, por ejemplo, no proporciona resistencia contra un compuesto citotóxico o citostático, pero codifica un producto "identificable", tal como, por ejemplo, una luciferasa (*luc*), proteína fluorescente verde (*Gfp*) o beta-glucuronidasa (*gusA*).

El casete de expresión del transgén mínimo podría comprender una o más secuencias de ácido nucleico, la cual codifica el producto de interés, por ejemplo, un polipéptido sintético prediseñado (consultar, por ejemplo, la patente estadounidense n° 5,811,654), un enzima, un factor del crecimiento, una molécula de receptor de superficie celular, una proteína de almacenamiento de semillas, un fungicida, o fragmentos del mismo, un anticuerpo o fragmento del mismo, por ejemplo, Fab', F(ab')₂, fragmentos Fv de cadena sencilla, fragmentos Fv de cadena sencilla biespecíficos, y diacuerpos, en unión operativa con un promotor, y que además podrían comprender un operador, un potenciador, una secuencia de terminación, una secuencia de poliadenilación, u otras secuencias flanqueadoras que regulan la expresión de ese producto dentro de las plantas. El transgén podría comprender cualquier promotor apropiado para su expresión en células vegetales, y podrían tener orígenes vegetales o no vegetales, por ejemplo, promotores de mamífero, bacterianos o virales. Los promotores apropiados incluyen, por ejemplo, un promotor específico de semilla, un promotor específico de cloroplasto, un promotor específico del citosol, un promotor específico de hoja, tallo o raíz, un promotor del gen de la lectina, un gen de la sintasa de opina, un promotor para el caulimovirus del rayado clorótico del cacahuete (PCISV), un promotor específico del endospermo, un promotor de la liasa de isocitrato, el promotor de la nodulina ENOD12 del guisante, un promotor de la nodulina, y un promotor de la alfa-amilasa de cebada. El promotor podría ser un promotor constitutivo, de tal forma que la expresión ocurra a lo largo de los tejidos de la planta o a lo largo del desarrollo, o ambos, o un promotor inducible o específico de tejido, el cual se expresa de forma diferente en los tejidos de la planta, bien espacial o temporalmente durante el desarrollo. Preferiblemente, el promotor es un promotor 35s de CaMV (Gardner *et al.*, *NAR*, 9:2871-2888 (1981)), un promotor de la ubiquitina, el promotor de la glutenina de bajo peso molecular (Colot *et al.*, *EMBO J.*, 6:3559-3564 (1987)) o un promotor de la glutelina-1. (Consultar, por ejemplo, las patentes estadounidenses n° 5,352,605; n° 5,359,142; n° 5,424,200; n° 5,510,474; n° 5,614,399; EP 342 926 B1; n° 6,020,190; WO 98/10062; n° 5,689,040; n° 5,693,506; n° 5,391,725; n° 5,646,333; n° 5,034,322; n° 5,850,018; n° 5,837,849; n° 5,874,626; n° 5,850,019; n° 5,866,763; n° 5,866,792; n° 5,589,325; n° 5,589,331; n° 5,859,336; y; n° 5,830,724, todas las cuales descubren promotores que funcionan en plantas).

El transgén podría comprender también cualquier terminador o señal de poliadenilación que sea apropiada para células vegetales. Preferiblemente, el terminador es un terminador de la sintasa de Nopalina (nos), una subunidad pequeña del terminador de la RuBisCO (ssu), y un terminador CaMV.

El casete de expresión del transgén mínimo podría codificar un producto quimérico que comprendiera, por ejemplo, un péptido líder o una señal de retención, o ambos. Los péptidos líderes apropiados incluyen, por ejemplo, los péptidos líderes procariontes o eucariontes tales como, por ejemplo, un líder de amilasa o un péptido líder de anticuerpo de mamífero. Las señales de retención apropiadas incluyen, por ejemplo, una señal de retención en el retículo endoplásmico (ER) tal como, por ejemplo, un péptido con la secuencia de aminoácidos Lys Asp Glu Leu (KDEL) (SEC. N° ID.: 1) ó His Asp Glu Leu (HDEL) (SEC. N° ID.: 2). KDEL podría estar codificada por la secuencia de nucleótidos 5'-AAA GAT GAG CTC-3' (SEC. N° ID.: 3) y HDEL podría estar codificada por 5' CAT GAT GAG CTC 3' (SEC. N° ID.: 4). Podrían emplearse otras secuencias que codifican el KDEL o HDEL pero que difieren de estas secuencias de nucleótidos en virtud de la degeneración del código genético. La secuencia codificante de KDEL o HDEL podría estar operativamente unida a una secuencia codificante de un polipéptido para proporcionar una fusión del polipéptido y de la señal de retención en el ER. Generalmente, la señal de retención se coloca en el extremo C-terminal del polipéptido, aunque podría colocarse en otras posiciones de la secuencia polipeptídica. La señal de retención en el ER podría estar precedida por una secuencia eslabón, tal como, por ejemplo, la (Gly)₄Ser (SEC. N° ID.: 5) y/o Arg Gly Ser Glu (RGSE) (SEC. N° ID.: 6) (Wandelt *et al.*, *Plant J.*, 2(2): 181-192 (1992)).

Podría usarse un péptido líder para dirigir el producto hacia un determinado compartimiento celular. El péptido líder podría tener un origen en mamífero, y podría ser de ratón, tal como un péptido líder de una cadena ligera o pesada de inmunoglobulina. La secuencia de nucleótidos usada en la construcción para codificar el péptido líder podría tener los codones optimizados para su expresión en la planta de interés, preferiblemente monocotiledónea, por ejemplo, el arroz, trigo, maíz o cebada. Una secuencia de péptido líder útil de acuerdo con este aspecto de la presente invención es la del mAb24 específico para el virión TMV (Voss *et al.*, *Mol Breed*, 1:39-50 (1995)). También podría

emplearse formas modificadas. Al igual que con los otros elementos a usarse en los casetes de expresión de acuerdo con varios aspectos de la presente invención, los codones de la secuencia codificante podrían optimizarse para su uso en monocotiledóneas de acuerdo con Angenon *et al.* (*FEBS*, 271:144-146 (1990)). El péptido líder podría ser una señal que apuntara hacia las vacuolas, tal como el péptido líder del gen de la sintasa de estrictosidina, por ejemplo, el de la sintasa de estrictosidina de *Catharanthus roseus* (McKnight *et al.* (1990) o de la sintasa de estrictosidina de *Rauwolfia serpentina* (Kutchan *et al.*, *FEBS Lett*, 237 40-44 (1988)). Para una revisión de la secuencias que apuntan a vacuolas consultar Neuhaus, *Plant Physiol. Biochem.*, 34(2):217-221 (1996). El péptido líder podría ser la señal que apunta hacia el cloroplasto, tal como la secuencia del péptido líder de la RuBisCO del guisante (Guerineau *et al.* *NAR*, 16:11:380 (1988)). Para una revisión de péptidos que apuntan a cloroplastos, consultar van Heijne *et al.* (*Eur. J. Biochem.* 180:535-545 (1989)) o Kavanagh *et al.* (*MGG*, 215:38-45 (1988)) o Karlin-Neumann *et al.* (*EMBO J.*, 5:9-13 (1986)). El péptido líder podría ser una secuencia 5' de una proteína de almacenamiento en semillas, dicotiledóneas o monocotiledóneas, que causa el transporte al interior de los cuerpos proteicos, tales como el líder de B4 de la leguminosa *Vicia fabia* (Baeumlein *et al.*, *Mol. Gen. Genet.*, 225:121-128 (1991)).

En una realización de la invención, el casete de expresión del transgén mínimo comprenden más de un transgén que codifica un producto deseado. Los especialistas en la técnica apreciarán que, a medida que incrementa el tamaño del casete de expresión del transgén mínimo, es probable que también incremente el tamaño del loci transgénico. No obstante, no hay evidencia que relacione el fenómeno de la silenciación del gen con el tamaño del ADN transformador inicial.

El casete de expresión del transgén mínimo podría aislarse a partir de cualquier vector apropiado, por ejemplo, un plásmido, fagémido, o un vector viral, que es conocido en la técnica. Los especialistas en la técnica están familiarizados con varios protocolos para el aislamiento y purificación de moléculas de ácido nucleico (Consultar, por ejemplo, Rogers y Bendich, en *Plant Molecular Biology Manual*, 2ª edición, 1:1-8 (1994), incorporada en ésta en su totalidad por referencia. Por ejemplo, podría digerirse un vector con uno o más enzimas de restricción, y el ADN digerido podría electroforarse a través de un gel de SDS-poliacrilamida o un gen de agarosa, y el fragmento de ADN apropiado podría aislarse del gel usando el equipo de extracción del gel Quiaquick™ (Quiagen Ltd., Boundary Court, Gatwick Road Crawley, West Sussex RH10 2AX (R.U.)) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, o purificarse mediante otros procedimientos tales como la cromatografía líquida (LC) o la cromatografía líquida de alta presión (HPLC), etc.

Otros aspecto de esta invención es una población de células vegetales transformadas producidas mediante los procedimientos de esta invención, y la población de plantas transgénicas regeneradas a partir de esa población de células transformadas. Los especialistas en la técnica apreciarán que la población de plantas transgénicas regeneradas a partir de la población de células vegetales transformadas estará formada por plantas no idénticas debido a que el transgén no se integra necesariamente en el mismo sitio en cada célula vegetal durante la transformación. Por tanto, otro aspecto de esta invención es una población de plantas transgénicas no idénticas producidas mediante los procedimientos de esta invención, en donde al menos aproximadamente el 60% de la población de plantas transgénicas tiene patrones de integración sencillos del casete de transgén integrado y expresan de forma estable el transgén. Preferiblemente, al menos aproximadamente el 70% de la población de plantas transgénicas tiene un patrón de integración sencillo del casete del transgén y expresa de forma estable el transgén. Al menos aproximadamente el 40% de las plantas transgénicas tiene el casete del transgén integrado en al menos tres sitios de integración.

Las líneas de plantas transgénicas obtenidas a partir de células vegetales transformadas producida mediante bombardeo con casetes de transgén mínimo presentan una frecuencia reducida de sucesos de reordenamiento (ver, por ejemplo, las Figuras 1, 2, y 3). En la mayoría de las plantas, las bandas 1-3, detectadas en transferencias Southern de ADN genómico digerido con enzimas de restricción que tiene un sitio de reconocimiento de seis bases (cortadores de 6 bases) indican la presencia de la aproximadamente 5 copias de transgén. Son raras las líneas con más copias. Aunque no queremos estar limitados por la teoría, la integración de múltiples copias de los casetes de expresión del transgén mínimo, que no contienen regiones extensas de secuencias del vector, podría ocurrir de varias formas. En primer lugar, diferentes casetes podrían integrarse simultáneamente en una región cromosómica dañada que haya atraído varios complejos de reparación del ADN. En un caso tal, los casetes podrían estar intercalados con ADN genómico. En segundo lugar, los casetes podrían experimentar una unión de extremos ilegítima antes de la integración, e integrarse como una unidad, en tal caso los casetes serían contiguos. Finalmente, tal como han discutido recientemente Kohli *et al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:7203-7208 (1998)), un transgén integrado solo podría experimentar recombinación con ADN exógeno, bien porque el ADN exógeno es atraído hacia los complejos de reparación que se forman en el sitio de integración, o porque ocurre la recombinación entre secuencias homólogas en el transgén integrado y en el ADN exógeno. En los procedimientos que usan moléculas de ácido nucleico con secuencias extensas del vector, tales secuencias homólogas son usualmente secuencias del esqueleto del vector, pero en este caso, la responsable debe ser una secuencia dentro del casete del transgén. Kohli *et al.* (*Plant J.*, 17:591-601 (1999)) demostraron que una estructura potencialmente cruciforme, que rodea la caja-TATA del promotor 35S del CaMV (el cual se usa en algunas de las construcciones de los Ejemplos) generaba un punto caliente de recombinación que está implicado en más del 40% de las uniones de recombinación caracterizadas.

SfiI reconoce las secuencias de 8 p.b. 5'-GGCCNNNNNCCGG-3' (SEC. N° ID.: 7), y corta los casetes de expresión del transgén del Ejemplo 1 antes de su integración en el genoma de la planta. Las transferencias Southern de ADN genómico aislado de plantas transformadas con cualquiera de los casetes transgénicos descubiertos en el Ejemplo 1, y digeridos con la *SfiI* que no corta, típicamente mostraron una única banda, sugiriendo que el sitio de integración, la región del genoma de la planta en donde se integraron las copias del transgén, era en promedio inferior a 65 kpb (Figura

1). Sin embargo, la presencia de múltiples bandas después de la digestión del ADN genómico con otros enzimas de restricción no cortadores (endonucleasas de restricción que no tienen sitios de reconocimiento dentro del transgén antes de su integración en el genoma de la planta) sugiere una o dos posibilidades: a) la creación *de novo* de sitios de reconocimiento del enzima de restricción a resultas del reordenamiento, o b) la captura de ADN genómico entre las secuencias transgénicas antes o durante la integración (ver, por ejemplo, Salomon and Puchta, "Capture of genomic and T-ADN sequences during double-strand break repair in somatic plant cells", *EMBO*, 17(20):6086-6095 (1998)). El entremezclado de ADN genómico entre secuencias del transgén fue descrito anteriormente por Kohli *et al.* (1998; supra) y Pawlowski y Somers, "Transgenic ADN integrated into the oat genome is frequently interspersed by host ADN", *PNAS*, 95(21):12106-12110 (1998).

Además, las transferencias Southern demostraron que aproximadamente el 80% de las líneas de plantas transgénicas del Ejemplo 1, generadas a partir de células bombardeadas con un único casete transgénico, por ejemplo, el casete *hpt*, mostraban patrones de integración muy simples (sólo una o dos bandas en transferencias Southern de ADN genómico digerido con un cortador infrecuente). Las transferencias Southern, hibridadas con una sonda específica para *gusA*, de ADN genómico procedente de plantas transgénicas, las cuales se generaron a partir de células co-bombardeadas con los casetes *gusA* y *hpt*, y seleccionadas mediante resistencia a la higromicina, también presentaban patrones de integración simples. Esto demuestra que la recuperación de una proporción elevada de plantas con patrones de integración simples no era debida a la presión de selección, puesto que no había selección para el *gusA*. Por contra, las transferencias Southern de ADN genómico procedente de líneas de plantas generadas mediante el bombardeo con partículas con plásmidos superenrollados demostró que sólo del 20% al 30% de las líneas de plantas tenían patrones de integración simples. Los resultados presentados en ésta demuestran que el uso de casetes de expresión de transgén mínimos, lineales, en vez de plásmidos superenrollados o relajados, conduce a la generación de plantas transgénicas con patrones de integración simples, números de copia de transgén bajos, y pocos casos de reordenamiento del transgén.

Los procedimientos descritos en ésta para el suministro e integración de casetes de expresión de transgén mínimos también garantizar niveles de expresión elevados y la reducción del fenómeno de la silenciación. El análisis de la expresión de las plantas transgénicas de esta invención en diferentes etapas del crecimiento no consiguió detectar la silenciación del transgén, que es un fenómeno común para transgenes con número de copia elevado.

La expresión del transgén en esencialmente todas las plantas transgénicas generadas por el proceso de esta invención que es estable y heredable. Esto contrasta con los informes previos que descubren que típicamente, aproximadamente el 20-30% de las plantas transgénicas producidas mediante el bombardeo con partículas con ADN de plásmidos completos tienen bajos niveles de expresión del transgén o una silenciación completa del transgén, incluso aunque algunas de estas plantas tengan patrones de integración simples (Elmayan T. y Vaucheret H., "Expression of single copies of a strongly expressed 35S transgene can be silenced post-transcriptionally, *Plant Journal*, 9(6): 787-797 (1996)).

Aunque hay una frecuencia reducida de patrones de reordenamiento complejos de los transgenes en las plantas transgénicas de esta invención (Figura 1), el casete del transgén podría, por sí mismo, experimentar todavía recombinación y reordenamiento. Algunas de las líneas de plantas transformadas generadas por el procedimiento de esta invención contienen múltiples copias del casete del transgén en un único locus. Sin embargo, en la mayoría de las plantas transgénicas producidas por este procedimiento, el número de copias del transgén no excede tres en total por genoma. Las líneas de plantas transgénicas con un número de copias de más de tres son muy pocas.

El Ejemplo 1 muestra los resultados de transformar células vegetales con un casete de expresión de transgén mínimo del gen *bar*. Se regeneraron veintiséis plantas transgénicas a partir de células transformadas con *bar*, y sólo tres de las veintiséis presentaron patrones de integración complejos del gen *bar*. Todas las copia del gen *bar* se localizaron en un único locus en estas tres líneas, y también se detectaron niveles elevados de expresión de la acetiltransferasa de fosfinotricina (PAT) en estas tres líneas.

La expresión de la PAT se analizó en la totalidad de las 26 líneas en diferentes etapas de su desarrollo (plántones, vegetativa y reproducción) de las plantas T₀ para ver si ocurría la silenciación del transgén en alguna etapa. No se detectó la silenciación del transgén en las líneas con número de copias bajo o en las líneas con número de copias elevado. Estos resultados prueban de forma concluyente las ventajas de generar plantas transgénicas usando las secuencias mínimas requeridas para la expresión del transgén.

Algunas de las líneas de plantas transgénicas, no importa que se hayan transformado con un casete de transgén mínimo del *hpt* o un casete de transgén mínimo del *bar*, tienen un patrón de integración complejo y, en algunos casos, las líneas de plantas tienen múltiples copias del casete de expresión del transgén mínimo integradas en el mismo locus. Estos resultados sugieren que los mecanismos implicados en la integración de los casetes del transgén mínimos y los vectores linearizados o superenrollados podrían ser similares, al menos en algunos casos.

Las técnicas de transferencia directa del ADN, particularmente el bombardeo con partículas, proporcionan el suministro simultáneo de múltiples moléculas de ácido nucleico que codifican productos diferentes, por ejemplo, productos de importancia agronómica, a plantas de cultivos económicamente importantes. Cuando se usó en el procedimiento de esta invención, el suministro simultáneo de dos casetes de transgén mínimos, a saber, los casetes de expresión de transgén mínimos de *hpt* y *gusA*, mediante el bombardeo con partículas, resultó en un 100% de cotransformación.

En el Ejemplo 1, la transformación mediada por el bombardeo con partículas se usó para suministrar casetes de expresión de transgén mínimos que comprendían un transgén, bien *bar* o *hpt*, a embriones de arroz. A continuación se regeneraron plantas transgénicas a partir de los embriones de arroz transformados con *bar* y *hpt*. Prácticamente el 100% de las plantas transgénicas producidas mediante este procedimiento expresaron los transgenes en todas las etapas de su desarrollo. Ninguna de las plantas transgénicas producidas mediante el procedimiento de esta invención

mostró el fenómeno de silenciación del transgén.

Nuestros sorprendentes resultados demuestran claramente que el uso de casetes de expresión de transgén mínimos, en combinación con las técnicas de transferencia directa del ADN, particularmente el bombardeo con partículas, mejora la frecuencia de generación de plantas transformadas que tienen un número bajo de copias, un patrón de integración simple con no más de unos pocos sitios de integración, una incidencia reducida de la silenciación del transgén, y la expresión estable del transgén en plantas a lo largo de todo su desarrollo. Hasta la fecha no hemos detectado la silenciación del transgén en ninguna de las plantas transgénicas, o en ninguna de su progenie, que se ha analizado.

El procedimiento descubierto en ésta podría aplicarse a cualquier célula de tejido vegetal que pueda ser transformada mediante técnicas de transferencia directa del ADN, particularmente mediante el bombardeo con partículas. Tales células de tejidos vegetales incluyen, por ejemplo, las células simples, el tejido de callos (Tipo I y Tipo II), los discos de hojas, los embriones inmaduros o maduros, las células meristemáticas, las células de la raíz, las células del hipocótilo, y las células del cotiledón, los protoplastos o las suspensiones de células. Preferiblemente, los protocolos transforman tejidos de plantas intactos, por ejemplo, células vegetales de embriones inmaduros o maduros, células de callos (Tipo I y Tipo II), células meristemáticas, células de hojas, células de la raíz, células del hipocótilo, células del cotiledón, y células de brotes.

También se contemplan, dentro del ámbito de esta invención, los alimentos y los productos para alimentación de animales que comprenden las plantas y su progenie, y partes de plantas de las mismas. Además, también se contemplan plantas con características agronómicas, industriales, de valor añadido, o características de uso alternativo.

Otros aspectos de la invención serán evidentes para el especialista capacitado, y no es necesario detallarlos aquí. Los términos y expresiones que se han empleado se usan como términos descriptivos y no limitantes, y cualquiera con formación en la técnica reconocerá que son posibles varias modificaciones dentro del ámbito de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

Construcciones del gen

Los casetes de expresión mínimos se aislaron después de la digestión del pWRG 2426 (Cooley *et al.* (1995)) con varias combinaciones de los enzimas de restricción *XhoI* y *XbaI* (*bar*), *Sall* y *KpnI* (*hpt*) y *NotI* (*gusA*) en las condiciones recomendadas por el suministrador. Las digestiones de restricción para cada uno de los tres genes quiméricos se realizaron independientemente. La digestión del plásmido pWRG 2426 (9260 p.b.) con *XhoI* y *XbaI* rinde tres fragmentos: un fragmento de 1896 p.b. que contiene el gen *bar* quimérico, un fragmento de 6950 p.b. que contiene el *hpt*, el *gusA* y las secuencias del vector y una secuencia de 414 p.b. que mayoritariamente contiene el promotor CaMV35S, el cual estaba dirigiendo el gen *hpt*. La digestión del pWRG 2426 con *Sall* y *KpnI* rinde tres fragmentos: un fragmento de 2032 p.b. que contiene el gen *hpt* quimérico, un fragmento de 5787 p.b. que contiene el gen *gusA*, el vector y la secuencia CaMV35S dirigiendo el gen *bar*, y tres fragmentos pequeños de 253 p.b., 313 p.b. y 875 p.b. Estos tres fragmentos contienen partes del gen *bar* quimérico. La digestión del pWRG 2426 con *NotI* proporciona dos fragmentos: un fragmento de 2628 p.b. que contiene el gen *gusA* quimérico, y el resto del plásmido en un fragmento de 6632 p.b. A cada lado del casete del gen hay presentes unos pocos p.b. de secuencias del vector. El casete del gen *bar* contiene 32 p.b. antes del inicio del promotor y 3 p.b. después del final del terminador. El casete del *hpt* contiene 24 p.b. antes del inicio del promotor y 13 p.b. después del final del terminador. El casete del *gusA* contiene 19 p.b. antes del inicio del promotor y 16 p.b. después del final del terminador.

Material de plantas y transformación

Los procedimientos para preparar embriones de arroz inmaduros (*Oryza Sativa L.*), los casetes de expresión del transgén mínimos que contienen las secuencias del *bar*, *hpt* o *gusA* para el bombardeo, y la transformación subsiguiente y regeneración de las plantas transformadas se describen en otros sitios (Christou *et al.*, *Bio/Technology*, 2, 9:957-962 (1991)) incorporada en su totalidad en ésta por referencia).

De forma resumida, se recolectaron embriones de arroz inmaduros de 12-15 días de edad a partir de panículos, y se esterilizaron con hipoclorito sódico al 2% durante 5 minutos. De forma subsiguiente, se lavaron repetidamente con agua destilada estéril, y se retiraron las glumas en condiciones asépticas bajo un microscopio de disección, y se colocaron en medio MS (Murashige *et al.*, *Plant Physiol.*, 15:473-497 (1962)) o CC (Potrykus *et al.*, *Theor. Appl. Genet.*, 54:209-214 (1979)) suplementado con 2,4-D a 0,5 ó 2,0 mg/l con el lado adaxial en contacto con el medio (Datta *et al.*, *Bio/Technology*, 8:736-740 (1990) ver más arriba; Hartke *et al.*, *J. Genet. Breed.*, 43:205-214 (1989)).

Los callos maduros derivados de semillas se prepararon como describieron Sudhakar *et al.* *Transgenic Res.*, 7:289-294 (1998) (incorporada en ésta en su totalidad por referencia). Se desenvainaron semillas de arroz (*Oryza sativa* .ssp. *indica*) de origen diverso, CR-5272, M 7, ITA 212, IR 64, KDML 105, Basmati 370, M202, Jodon, Drew, Bengal, Cypress, Gulfmont, y se esterilizó su superficie en etanol al 70% durante 3 minutos, a continuación en una solución de hipoclorito sódico al 50% durante 30 minutos, y se aclararon con agua destilada estéril. Las semillas se colocaron en una placa de petri que contenía 40 ml de medio de cultivo para la inducción de callos: medio basal MS suplementado con 2,5 mg/l de 2,4-D, 3% (p/v) de sacarosa. El pH se ajustó a 5,8 antes de autoclararlo a 120°C durante 20 minutos. Las semillas se incubaron en la oscuridad a 27°C. Los embriones maduros en expansión de separaron del endospermo 5-7 días después de la incubación. Los explantes se sometieron a un tratamiento osmótico (manitol 0,4 M) durante 4 horas y 16 horas después del bombardeo. Inmediatamente antes del bombardeo, se fijó el tejido sobre un soporte sólido preparado.

Las partículas de oro se recubrieron con casetes de expresión del transgén mínimos tal como se había descrito para los plásmidos superenrollados, de acuerdo con el procedimiento de Christou *et al.* (1991) ver más arriba. Para los experimentos de cotransformación, usamos una proporción molar 1:3 de casetes de *hpt* (seleccionables) respecto *gusA* (no seleccionables). El bombardeo con partículas y la recuperación de las plantas transgénicas sobre medio selectivo suplementado con fosfinotricina (PPT) o higromicina (hyg), se llevó a cabo tal como se había descrito previamente (Klein *et al.*, 1987; Sudhakar *et al.*, 1998; Vain *et al.*, 1998 incorporadas en su totalidad en ésta por referencia). Después del bombardeo, los explantes se sembraron sobre medio fresco (suplementado con 50 mg/l de higromicina). Se obtuvieron plántulas de callos embriogénicos cada 15 días a partir del subcultivo de callos resistentes a 50 mg/l de higromicina. La presión de selección se mantuvo a lo largo de las fases de proliferación y regeneración del cultivo *in vitro*.

Aislamiento del ADN

El ADN de hoja se aisló usando el procedimiento de extracción de ADN con bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) (Rogers *et al.*, *Plant Molecular Biology Manual*, 2ª edición, 1:1-8 (1994), incorporada en ésta por referencia). De forma resumida, se congeló el material de hoja en nitrógeno líquido y a continuación se molió en presencia de arena de playa y 10 ml de tampón CTAB (2% CTAB, 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0, 0,02M Na₂-EDTA, 1,4 M NaCl, 1% PVP) caliente (60°C). La papilla se incubó a 60°C durante una hora. A continuación se añadió una mezcla (10 ml) de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1). Después de agitarla a conciencia, se centrifugó la papilla de 3000 r.p.m. durante 10 minutos para apelar el material sólido. Se recogió el sobrenadante, y se añadió un volumen de isopropanol. Transcurrida una hora a 4°C se centrifugó la mezcla a 3000 r.p.m. durante 10 minutos para apelar los sólidos. El precipitado se lavó en etanol al 70%, y después de secarlo, se disolvió en 1 ml de TE (Tris-Cl 10 mM:EDTA 1 mM).

Hibridación de la transferencia Southern

Se digirieron alícuotas de ADN genómico (5 mg) durante la noche con los enzimas de restricción apropiados (a saber, *Hind*III, *Eco*R1, *Nhe*I, *Cla*I, *Sfi*I, *Bsf*XI, *Sal*I o *Nco*I), el ADN digerido se fraccionó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8% y se transfirieron en condiciones alcalinas sobre membranas Hybond N⁺ (Amersham) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los casetes de transgén lineales que contenían sólo las regiones codificantes de los genes *bar*, *hpt* o *gusA* aislados a partir del pWRG 2426 se usaron como sondas. De forma resumida, el ADN sonda de *bar* o *hpt* (25 µg) se marcó radiactivamente con dCTP marcado con α-³²P (3000 Ci/mmol) mediante el procedimiento del cebador aleatorio (Feinburg & Igelstein, *Anal. Bioc.*, 137:266-267 (1994)). Se realizó la transferencia Southern tal como se ha descrito previamente (Kohli *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:7203-7208, (1998)). Los filtros se pre-hibridaron e hibridaron a 65°C. en presencia de tampón elevado en sal, pH 6,8 (NaCl 3 M/Pipes 0,1 M/Na₂ EDTA 0,02 M), solución de Denhardtts y ADN de esperma de salmón (100 mg/ml de mezcla de hibridación). Los filtros se lavaron subsiguientemente dos veces en 2x SSC, 0,5% de SDS, y una vez en 0,2x SSC y 0,5% de SDS, a 65°C durante 20 minutos, y se expusieron a película para rayos X. La autorradiografía se realizó en un casete fosforimager durante dos días con película para rayos X Xomat de Kodak. Los resultados se ilustran en las Figuras 1-3.

Aislamiento del ADN en pequeña escala para PCR

Se aisló el ADN a partir de hojuelas, de aproximadamente 2 cm de longitud, de acuerdo con el procedimiento de Edwards *et al.* "A simple and rapid method for the preparation of the plant genomic ADN for PCR analysis", *Nucleic Acids Research*, 19(6):1349 (1991).

De forma resumida, una hojuela sola, de aproximadamente 2 cm de longitud, se congeló en nitrógeno líquido y se molió en presencia de arena marina y 200 µl de tampón de extracción (NaCl 500 mM, Tris-Cl 100 mM (pH 8), y Na₂EDTA 50 mM (pH 8)) en un tubo de microfuga de 1,5 ml para obtener un homogenado. A continuación se añadieron veinte microlitros de SDS al 20% al homogenado y se mezclaron a conciencia. Se añadieron otros 200 µl de tampón de extracción al homogenado.

A continuación se añadió una mezcla (400 µl) de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) al homogenado y se mezcló completamente de nuevo. A continuación se centrifugó el homogenado en una microfuga a 13000 r.p.m. durante 5 minutos. Se recogió el sobrenadante y se colocó en un tubo nuevo. Se determinó el volumen de sobrenadante y se añadió un volumen igual de isopropanol al sobrenadante, seguido por un 1/10 del volumen de acetato sódico (pH

4,8). El ADN se precipitó mediante centrifugación a 13000 r.p.m. y se secó. El precipitado seco se disolvió en 50 ml de TE (Tris-Cl 10 mM:EDTA 1 mM) y se estimó la concentración de ADN corriendo las muestras en un gel de agarosa al 0,8%. Aproximadamente de 50 a 70 μ g de ADN se usaron para la PCR.

5 Puesto que la totalidad de los tres casetes de transgén (*gusA*, *hpt* y *bar*) estaban dirigidos por el promotor CaMV35S, cada secuencia de ADN se amplificó usando el mismo cebador hacia adelante, CaM F1: 5'-TAC AGT CTC AGA AGA CCA AA-3' (SEC. N° ID.: 8), que se hibrida con el promotor del CaMV. Los casetes de *bar* y *hpt* contenían el terminador *nos*, por tanto, estos genes se amplificaron con el cebador inverso Nos R1: 5'-AAT CAT CGC AAG ACC GGC AA-3' (SEC. N° ID.: 9), el cual se hibrida con el terminador *nos*. El casete de *gusA* se amplificó usando un cebador
10 Gus R1: 5'-GGG AGG CTA CAG ATG CTT TGC-3' (SEC. N° ID.: 10), el cual se hibrida con el extremo 3' de la secuencia codificante del *gusA*. Usamos un volumen de reacción total de 25 μ l que comprendía KCl 50 mM, Tris-Cl 10 mM (pH 8,2), MgCl₂ 1 mM, 0,1 mM de cada uno de los cuatro dNTP, 100 nM de cada cebador, 50-70 ng de ADN genómico, y 1 unidad de la polimerasa Taq de ADN. Las secuencias se amplificaron en las siguientes condiciones de reacción: desnaturalización a 95°C durante 5 min, a continuación 30 ciclos (94°C, 1 min; 60°C, 1 min; 72°C, 2 min)
15 seguidos por una extensión final de 7 min a 72°C.

Los productos de la PCR amplificados se separaron en un gel de agarosa al 0,8% que contenían EtBr. Los productos de la PCR separados se visualizaron bajo luz UV y se fotografiaron. El ADN marcador de peso molecular usado era la escalera de 1 kb de Pharmacia.

20 Ensayos enzimáticos

Los ensayos GUS histoquímicos se llevaron a cabo tal como describieron Jefferson *et al.*, *EMBO J.*, 6:3901-3907 (1987) incorporada en ésta por referencia. Los ensayos con la fosfotransferasa de higromicina (HPT) se llevaron a
25 cabo mediante cromatografía en capa fina (TLC) de acuerdo con el procedimiento de Datta *et al.*, *Bio/technology*, 8:736-740 (1992), incorporada en ésta por referencia.

Se congelaron hojas (100-150 mg) en nitrógeno líquido y se molieron usando un mortero y una mano de mortero. Se añadió tampón de extracción (Tris-Cl 0,5M, pH 7,5, 10% de glicerol, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 0,1 M) (100
30 ml/100-150 mg de tejido) al material molido. A continuación se centrifugaron las muestras a 13000 r.p.m. durante 5 minutos a 4°C para precipitar los sólidos. Se recogió el sobrenadante (extracto crudo) y se almacenó a -20°C. Para ensayar la actividad de la fosfotransferasa de higromicina, se incubaron 10 ml de mezcla de reacción de Tris-maleato 50 mM pH 7,0, CaCl₂ 50 mM, ATP 0,05 mM, 0,4 ml (g-32P) ATP (10 mCi/ml; 3000 Ci/mmol), 62 mg de higromicina-B y 5,6 ml de extracto crudo, durante 30 minutos a 37°C. A continuación se aplicó un ml de la reacción sobre una placa
35 de cromatografía en capa fina (TLC) de PEI-celulosa (Whatman). La TLC se realizó en formato sódico 50 mM/ácido fórmico pH 5,4 como fase líquida. Las placas se dejaron secar y se sometieron a radiografía.

Los ensayos de TLC de la acetiltransferasa de fosfinotricina (PAT) se realizaron tal como describieron De Block *et al.*, *EMBO J.*, 6:2513-2518 (1987), incorporada en ésta por referencia. Se mezclaron cien mg de tejido de hoja, 50-
40 100 ml de tampón de extracción (Tris-Cl 50 mM, pH 7,5, Na₂EDTA 2 mM, 0,15 mg/ml de leupeptina, 0,15 mg/ml de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), 0,3 mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA), 0,3 mg/ml de DTT) y 5 mg de arena de playa, y se molieron en un tubo Eppendorf para formar un homogenado. El homogenado se centrifugó a 13000 r.p.m. durante 2 minutos. El sobrenadante se recogió y centrifugó de nuevo a 13000 r.p.m. durante 5 minutos para eliminar cualquier materia sólida y formar un extracto clarificado. Se mezclaron 12,5 μ l de extracto clarificado
45 con PPT (0,75 ml de una solución de reserva 1 mM en Tris-Cl 50 mM pH 7,5, Na₂EDTA 2 mM) y AcCoA (1,25 μ l, 14°C) (58,1 mCi/mmol). La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 30 minutos. A continuación, se depositó una alícuota de seis μ l de la mezcla de reacción sobre una placa de TLC de gel de sílice. La cromatografía ascendente se llevó a cabo en una mezcla 3:2 de 1-propanol e hidróxido amónico (25% de amoníaco) a 14°C y se visualizó mediante autorradiografía (película XAR-5-Kodak durante una noche).

50 Recuperación de las plantas transgénicas

Se obtuvieron un total de 108 líneas de plantas del arroz transgénicas independientes transformadas con el casete *bar*, 42 líneas transformadas con el casete *hpt*, y 28 líneas cotransformadas con los casetes *hpt* y *gusA*. Se realizó el análisis mediante la PCR de todas las plantas transgénicas para confirmar la presencia de los casetes *bar*
55 o *hpt* según fuera apropiado. La presencia del casetes *gusA* se verificó mediante la PCR y ensayo histoquímico GUS.

Análisis molecular de los patrones de integración del casete *bar*

60 Se analizó en detalle una muestra representativa de 26 plantas transgénicas portadoras del casete *bar*. El ADN genómico procedente de cada línea transgénica se digirió con *HindIII*, la cual corta una vez en el extremo 5' del casete *bar*. También se usaron cinco enzimas que no tienen sitios de reconocimiento (no cortadores) dentro del casete (*BstXI*, *ClaI*, *EcoRI*, *NheI* y *SfiI*). Estos experimentos permitieron la determinación del número de loci transgénicos en cada
65 líneas, proporcionando una estimación del número de copias del transgén, y revelaron los patrones de integración específicos para cada transformador primario. Los resultados se resumen en la Tabla 1.

El análisis de las transferencias Southern hibridadas con la sonda de *bar* reveló una única banda en aproximada-

mente el 40% (9 de 26) de las líneas de plantas transformadas cuando se digerían con *HindIII*, y aproximadamente el 73% de las muestras digeridas con *HindIII* mostraban patrones de hibridación muy simples (entre una y tres bandas). Sólo hubo tres líneas de plantas que generaron más de cinco bandas con hibridación (A5-14, A5-15 y A13-2) cuando se digirieron con *HindIII* (Tabla 1).

En tres de las líneas de plantas (A19-12, A19-14 y A19-17) la banda única, observada cuando el ADN genómico se digería con *HindIII*, se resolvía en dos banda cuando el ADN se digería con *NheI*, un enzima que no tiene un sitio de reconocimiento dentro del casete (Tabla 1). Esto indica que la banda única con *HindIII* no representa necesariamente una única copia del transgén. Tal como se muestra en la Tabla 1, obtuvimos una única banda de hibridación con al menos uno de los cinco enzimas no cortadores usados, excepto en las líneas A13-2 y A19-7. Esto indica que en los casos con sucesos de integración de múltiples copias, todas las copias integradas residían en un único locus transgénico.

La Figura 1 muestra una transferencia Southern de ADN genómico procedente de ocho líneas representativas digeridas con *SfiI* o *HindIII*, y con la secuencia codificante de *bar* sondeada. El número de bandas obtenidos después de la digestión con *HindIII* osciló entre 1-7, pero, en todos los casos, la digestión con *SfiI* (que no corta dentro del casete) produjo una única banda, demostrando la integración del casete en un único sitio.

Análisis molecular de los patrones de integración del casete hpt

El análisis de las plantas transgénicas portadores del casete *hpt* reveló patrones de integración aún más simples. La Figura 2 muestra una transferencia Southern de ADN genómico procedente de 15 líneas representativas de las 42 generadas. El ADN se digirió con *SalI*, que tiene un único sitio en el extremo 3' del casete próximo al extremo 3' del terminador *nos*. Ocho líneas mostraron una única banda, cuatro mostraron dos bandas, y dos líneas mostraron múltiples (más de cinco) bandas. Las seis líneas portadoras del casete *hpt* se analizaron con más detalle usando los *BstXI*, *ClaI*, *EcoRI*, *NheI*, y *SfiI* no cortadores. Obtuvimos una banda única en cada una de las seis líneas con al menos uno de los no cortadores.

Análisis molecular de los patrones de integración del casete gusA

Finalmente, analizamos los patrones de integración del casete de *gusA* que resultaban de la cotransformación con casetes lineales mínimos de *hpt* y *gusA*. La Figura 3 muestra una transferencia Southern de ADN genómico procedente de 18 líneas representativas digerido con *NcoI*, el cual corta en un único sitio cerca del extremo 5' de la región codificante de *gusA*, y se hibridaron con una sonda para *gusA*. Hallamos que aproximadamente el 50% de las líneas mostraban patrones de integración simples, y ninguna de las líneas produjo más de cuatro bandas. Trece de las dieciocho líneas mostraban patrones de integración simples. La observación de tales patrones de integración sencillos para ambos, los casetes del transgén seleccionados y no seleccionados, indica que los patrones son consecuencia de la naturaleza del ADN exógeno y no de la presión de selección que surgía durante la regeneración de la planta, la cual podría favorecer los que se expresan con frecuencia elevada con estructuras de transgén sencillas.

Análisis de la expresión del transgén

Se realizaron ensayos de cromatografía en capa fina con PAT y HPT para verificar la expresión de los genes *bar* y *hpt* en diferentes etapas del desarrollo. Se recolectaron muestras de hojas en tres etapas del desarrollo: a) cuando se transfirió la planta del medio de enraizamiento al suelo; b) 40-45 días después de la transferencia al suelo (antes de la floración) y c) 70-90 días después de la transferencia al suelo (después de la floración). Detectamos actividades de PAT y HPT en las tres etapas. Usamos el ensayo GUS histoquímico (Jefferson *et al.*, 1987, ver más arriba, incorporada en ésta por referencia) para detectar actividad GUS en líneas de callo, y observamos actividad GUS en todas excepto dos líneas (Nip-1 y Nip-14) transformadas con el casete del gen *gusA*. La expresión se monitorizó completamente hasta la regeneración de las plantas transgénicas y la expresión del transgén permaneció estable en todas las líneas.

ES 2 253 237 T3

TABLA 1

Resumen de los resultados de las transferencias Southern para las líneas transgénicas que contienen el casete de expresión <i>bar</i> .						
Nº de la línea	Nº de bandas Southern después de cortar con el enzima de restricción					
	<i>Hind</i> III	<i>Eco</i> RI	<i>Nhe</i> I	<i>Cla</i> I	<i>Sfi</i> I	<i>Bst</i> XI
A5-6	3	2	3	1	nd	nd
A5-10	5	8	2	6	nd	1
A5-11	5	7	1	4	nd	nd
A5-14	9	7	2	3	1	5
A5-15	7	4	3	nd	1	4
A5-16	1	1	1	1	1	1
A5-17	1	1	1	1	1	1
A5-19	3	3	3	2	1	nd
A5-22	3	7	2	2	nd	1
A5-23	5	2	2	2	1	2
A13-2	8	6	1	1	1	1
A13-5	3	2	3	7	nd	2
A13-7	2	2	2	2	1	1
A19-5	1	1	1	1	1	1
A19-7	4	11	2	3	nd	--
A19-8	2	2	2	2	1	1
A19-12	1	1	2	1	1	1
A19-13	3	2	1	1	nd	nd
A19-14	1	1	2	1	1	1
A19-16	2	2	1	2	1	1
A19-17	1	1	2	1	1	1
A19-19	1	2	5	1	1	1
A19-20	1	1	1	1	1	1
A19-21	2	1	1	1	1	1
A19-23	1	1	1	1	1	1
A21-4	2	2	2	1	1	1

n.d., no se determinó.

Ejemplo 2

Cointegración y coexpresión de transgenes múltiples

Integración del transgén

Se cotransformaron cinco transgenes diferentes, en forma de casetes de transgén mínimos, en tejido de arroz a través del bombardeo con partículas, tal como se describió más arriba. Los casetes de transgén comprendían un marcador genético, a saber, el de la acetiltransferasa de fosfinotricina (*bar*), el gen de la β -glucuronidasa (*gusA*), de la fosfotransferasa de higromicina (*hpt*), de la luciferasa de luciérnaga (*luc*), o de la sintasa de antranilato (*as*), un promotor y un terminador. Los componentes particulares de los diversos casetes de transgén mínimos usados en estos experimentos se muestran en la Tabla 2.

Se seleccionaron plantas transgénicas según su resistencia a la higromicina, y se analizaron usando la PCR y transferencias Southern para determinar el número de sucesos de transformación independientes, la frecuencia de cointegración de 2 o más de los cinco transgenes, y la frecuencia de integración de cada uno de los transgenes. También se ensayó la expresión de los diversos transgenes.

Las Tablas 3a, 3b y 3c resumen las frecuencias de integración y cointegración de los diversos transgenes. Se usaron análisis mediante la PCR y la transferencia Southern para analizar la integración de los transgenes en el genoma de la planta.

ES 2 253 237 T3

TABLA 2

Casetes de transgén mínimos usados para la transformación		
Gen	Promotor	Terminador
<i>bar</i>	intrón 35s-Adh1 del CaMV	sintasa de nopalina (nos)
<i>gusA</i>	35s del CaMV	subunidad pequeña de la RuBisCO (ssu)
<i>hpt</i>	35s del CaMV	nos
<i>luc</i>	intrón 1-ubi 1 de Ubi	nos
<i>as</i>	35s de CaMV doble	CaMV

Se recuperaron treinta y ocho plantas transgénicas independientes, las cuales integraban dos o más tipos diferentes de casetes de transgén, a continuación de la cotransformación con los cinco casetes de transgén mínimos mediante bombardeo con partículas y selección por su resistencia a la higromicina.

La Tabla 3a muestra el número total y el porcentaje de plantas transgénicas que contenían 2, 3, 4 ó 5 transgenes integrados en su genoma.

La Tabla 3b muestra la frecuencia de integración de cada transgén.

La Tabla 3c muestra las diversas combinaciones de transgenes integrados y la frecuencia con que se halló cada combinación en las treinta y ocho plantas. Se detectaron una variedad de diferentes combinaciones de transgén.

TABLA 3a

Frecuencia de cotransformación de 2 o más transgenes		
Nº de genes integrados	Nº de plantas de entre las 38 líneas independientes	Frecuencia de cotransformación %
2	6	16%
3	15	39%
4	11	29%
5	6	16%

TABLA 3b

Frecuencia de integración para cada transgén		
Transgén integrado	Nº de plantas de entre las 38 líneas independientes	Frecuencia de integración %
<i>bar</i>	34	90%
<i>gusA</i>	20	53%
<i>hpt</i>	38	100%
<i>luc</i>	15	40%
<i>as</i>	24	63%

ES 2 253 237 T3

TABLA 3c

Frecuencia de integración de las diferentes combinaciones de transgenes		
Combinación de genes	Nº de plantas de entre las 38 líneas independientes	Frecuencia %
<i>hpt-bar</i>	3	8%
<i>hpt-luc</i>	1	3%
<i>hpt-as</i>	2	5%
<i>hpt-bar-gus</i>	4	10%
<i>hpt-bar-luc</i>	3	8%
<i>hpt-bar-as</i>	7	18%
<i>hpt-luc-as</i>	1	3%
<i>hpt-bar-gus-luc</i>	4	10%
<i>hpt-bar-gus-as</i>	6	16%
<i>hpt-bar-luc-as</i>	1	3%
<i>hpt-bar-gus-luc-as</i>	6	16%

25 *Expresión del transgén*

La expresión de la totalidad de los cinco transgenes se determinó a nivel de ARNm usando la RT-PCR o transferencias Northern. Todos los productos de los transgenes, excepto para la sintasa de antranilato, se ensayaron a nivel de proteína ensayando la actividad enzimática usando técnicas estándares. Una vez se determinó la expresión de cada uno de los transgenes en las diversas plantas, se tabularon los resultados para determinar la frecuencia de coexpresión de los transgenes en cada planta. Veinticuatro de las treinta y ocho plantas transgénicas (63%) coexpresaban al menos dos transgenes integrados.

La Tabla 4a muestra la frecuencia de plantas transgénicas que coexpresan dos o más transgenes integrados, sin importar la identidad del transgén.

La Tabla 4b muestra la frecuencia de expresión para cada uno de los transgenes integrados.

La Tabla 4c ilustra el número de plantas de las treinta y ocho líneas de plantas independientes que expresan varias combinaciones de los cinco transgenes.

TABLA 4a

Coexpresión de múltiples transgenes		
Número de genes que se coexpresan	Nº de plantas de entre las 38 líneas independientes	Frecuencia de coexpresión %
2	9	24%
3	10	26%
4	4	11%
5	1	3%

ES 2 253 237 T3

TABLA 4b

Frecuencia de líneas independientes que expresan transgenes específicos		
Gen expresado	Nº de líneas independientes que expresan el gen/Nº de líneas independientes con el gen integrado	Frecuencia de expresión %
<i>bar</i>	24/34	71
<i>Gus A</i>	10/20	50
<i>hpt</i>	38/38	100
<i>luc</i>	10/15	67
<i>as</i>	14/24	58

TABLA 4c

Frecuencia de coexpresión de diferentes combinaciones de transgenes	
Combinaciones de genes	Nº de plantas de entre las 38 líneas independientes (Frecuencia de coexpresión %)
<i>hpt-bar</i>	8 (21%)
<i>hpt-luc</i>	2 (5%)
<i>hpt-as</i>	3 (8%)
<i>hpt-bar-gus</i>	2 (5%)
<i>hpt-bar-luc</i>	2 (5%)
<i>hpt-bar-as</i>	6 (16%)
<i>hpt-gus-luc</i>	1 (3%)
<i>hpt-bar-gus-luc</i>	2 (5%)
<i>hpt-bar-gusA-as</i>	2 (5%)
<i>hpt-bar-gusA-luc-as</i>	1 (5%)
<i>hpt-gus-luc-as</i>	2 (5%)
<i>hpt</i>	7 (19%)

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para producir una población de plantas transgénicas que tienen casete de expresión de transgén mínimo integrado en el genoma de las plantas; en donde
5 el casete de expresión de transgén mínimo es un casete de expresión que comprende un promotor unido operativamente a una secuencia de ácido nucleico que codifica un producto deseado, y en donde el casete de expresión del transgén mínimo comprende no más de aproximadamente 50 pares de nucleótidos que no codifican o regulan la expresión del producto deseado; y en donde
10 al menos aproximadamente el 70% de dicha población de plantas transgénicas tiene un casete de expresión de transgén mínimo integrado en el genoma de las plantas, y al menos uno y no más de cinco sitios de integración; y en donde al menos uno y no más de cinco copias del transgén se insertan en cada sitio de integración;
15 comprendiendo dicho procedimiento la transformación de células vegetales intactas con uno, o más, casetes de expresión de transgén mínimos, mediante técnicas de transferencia de ADN, y la regeneración de una población de plantas transgénicas a partir de dichas células vegetales transformadas.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en donde la técnica de transferencia directa de ADN se selecciona de entre el grupo consistente en: bombardeo con partículas, microinyección, transformación con fibra de carburo silícico, el procedimiento de agitación mediante vórtice, y la captación del ADN mediada por liposomas.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en donde la técnica de transferencia directa de ADN es el bombardeo con partículas.
4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde al menos aproximadamente el 70% de la población tiene el casete de expresión de transgén mínimo integrado en los genomas de las plantas en no más de tres sitios de integración.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, en donde al menos aproximadamente el 70% de la población tiene el casete de expresión de transgén mínimo integrado en los genomas de las plantas en no más de un sitio de integración.
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde al menos una, y no más de tres copias del transgén se insertan en cada sitio de integración.
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el casete de expresión del transgén mínimo comprende no más de aproximadamente 20 pares de nucleótidos que no codifican o regula la expresión del producto deseado.
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el casete de expresión del transgén mínimo no comprende secuencias que no son parte de un elemento que codifica o regula la expresión el producto deseado.
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el casete de expresión del transgén mínimo comprende un marcador genético.
10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la célula vegetal se cotransforma con un primer casete de expresión de transgén mínimo que comprende un marcador genético, y un segundo casete de expresión de transgén mínimo que comprende un transgén que no es el marcador genético en el primer casete de expresión de transgén.
11. El procedimiento de la reivindicación 9 o reivindicación 10, en donde el marcador genético codifica un producto que confiere resistencia contra un antibiótico, un herbicida, el metotrexato, el glifosato, o un inhibidor metabólico.
12. El procedimiento de la reivindicación 9 o reivindicación 10, en donde el marcador genético codifica un enzima seleccionado de entre el grupo consistente en la fosfotransferasa de higromicina, la acetiltransferasa de fosfinotricina, la fosfotransferasa de neomicina, la fosfotransferasa de kanamicina, la sintasa de epsp, la sintasa de acetolactato, y la isomerasa de manosa.
13. El procedimiento de la reivindicación 10, en donde el transgén del casete de expresión de transgén mínimo es un marcador genético seleccionado de entre el grupo consistente en *hpt*, *bar*, *neo*, *luc*, *gus* y *Gfp*.
14. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el transgén del casete de expresión de transgén mínimo codifica una proteína de almacenamiento de semilla.
15. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde el transgén del casete de expresión de transgén mínimo codifica un anticuerpo.

ES 2 253 237 T3

16. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde el transgén del casete de expresión de transgén mínimo codifica un fragmento de anticuerpo.

17. El procedimiento de la reivindicación 16, en donde el fragmento de anticuerpo se selecciona de entre el grupo consistente en Fab', F(ab')₂, fragmentos Fv de cadena sencilla, fragmentos Fv de cadena sencilla biespecíficos, y diacuerpos.

18. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde el casete de expresión de transgén codifica un ARN antisentido.

19. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde las células vegetales proceden de plantas monocotiledóneas o dicotiledóneas.

20. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde las células vegetales son tejido que puede regenerarse.

21. El procedimiento de la reivindicación 20, en donde las células vegetales se seleccionan de entre el grupo consistente en células de plantas embrionarias, células de callos, células de meristemos, células de hojas, células de hipocótilos, células de cotiledones, y células de brotes.

22. El procedimiento de la reivindicación 21, en donde las células de plantas embrionarias son células de semillas de embriones maduros o células de embriones inmaduros.

23. El procedimiento de la reivindicación 21, en donde las células de callos son células de callos del Tipo I o Tipo II.

24. El procedimiento de la reivindicación 19, en donde la planta monocotiledónea se selecciona de entre el grupo consistente en cebada, maíz, mijo, arroz, sorgo, avena y trigo.

25. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde menos de aproximadamente el 25% de dicha población de plantas transgénicas experimenta la silenciación del transgén.

26. El procedimiento de la reivindicación 25, en donde menos de aproximadamente el 25% de dicha población de plantas transgénicas experimenta la silenciación del transgén.

27. El procedimiento de la reivindicación 26, en donde ninguna de la población de plantas transgénicas experimenta la silenciación del transgén.

28. Población de plantas transgénicas producida mediante el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27.

29. La población de plantas transgénicas de la reivindicación 28, en donde al menos aproximadamente el 80% de dicha población de plantas transgénicas tiene un casete de expresión de transgén mínimo integrado en los genomas de dichas plantas transgénicas, en al menos uno y no más de cinco sitios de integración, y en donde al menos una y no más de cinco copias del transgén se insertan en cada sitio de integración.

30. La población de la reivindicación 29, en donde al menos aproximadamente el 80% de la población tiene el casete de expresión del transgén mínimo integrado en los genomas de las plantas en no más de tres sitios de integración.

31. La población de la reivindicación 30, en donde al menos aproximadamente el 80% de la población tiene el casete de expresión del transgén mínimo integrado en los genomas de las plantas en no más de un sitio de integración.

32. La población de cualquiera de las reivindicaciones 29 a 31, en donde al menos una y no más de tres copias del transgén se insertan en cada sitio de integración.

33. Población de plantas transgénicas, en donde menos de aproximadamente el 20% de dicha población de plantas transgénicas experimenta la silenciación del transgén.

34. La población de plantas transgénicas de la reivindicación 33, en donde menos de aproximadamente el 5% de dicha población de plantas transgénicas experimenta la silenciación del transgén.

35. La población de plantas transgénicas de la reivindicación 34, en donde ninguna de la población de plantas transgénicas experimenta la silenciación del transgén.

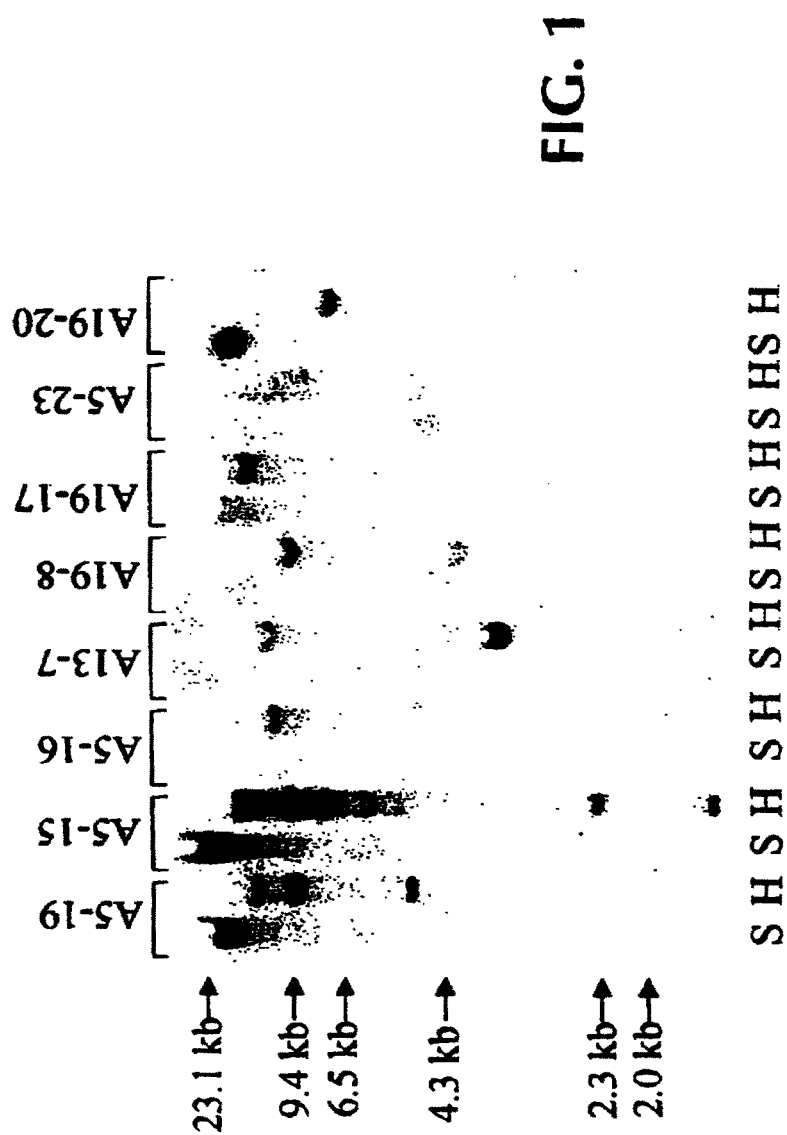


FIG. 2

