

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 876**

51 Int. Cl.:
C12N 15/84 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04728491 .4**

96 Fecha de presentación: **20.04.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1745132**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.01.2007**

54 Título: **Procedimiento de transformación y regeneración altamente eficiente de células vegetales en suspensión**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.07.2012

73 Titular/es:
**TEMASEK LIFE SCIENCES LABORATORY
LIMITED
1 RESEARCH LINK THE NATIONAL UNIVERSITY
OF SINGAPORE
SINGAPORE 117604, SG**

72 Inventor/es:
**LIANGHUI, Ji y
LIN, Cai**

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 384 876 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

Procedimiento de transformación y regeneración altamente eficiente de células vegetales en suspensión

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere en general a la ingeniería genética de plantas y, más en particular, a procedimientos de transformación mediada por *Agrobacterium*.

Antecedentes de la invención

En la presente solicitud, se hace referencia a varias patentes, solicitudes de patentes publicadas y publicaciones.

Las citas bibliográficas completas de las publicaciones se pueden encontrar enumeradas en la sección Bibliografía, inmediatamente antes de las reivindicaciones.

10 El algodón es un cultivo de importancia económica. La producción anual de fibra de algodón aporta miles de millones de dólares estadounidenses a la economía agrícola del mundo. Mientras que la transformación genética del algodón ha sido posible desde 1987 (Firoozabady y col., 1987), los procedimientos utilizados en la actualidad siguen siendo muy ineficientes y costosos debido a las tasas inusualmente bajas de regeneración de las plantas a partir de las células transformadas y a la baja fertilidad de la flor. El proceso de regeneración prolongado añade una
15 resistencia adicional a la eficiencia.

Varios procedimientos han estado disponibles para la transformación mediada por *Agrobacterium* de una variedad de explantes de algodón, tales como los cotiledones (Firoozabady y col, 1987), los hipocótilos (Umbeck y col, 1987; patente de EE.UU. Nº 5.004.863 y 5.159.135; publicación de patente europea "EP" 0 270 355), el pecíolo (publicación PCT WO 00/77230 A1) y la raíz (Pub. PCT. WO 00/53783). Se han informado mejores procedimientos para la regeneración y la transformación de plantas de algodón mediante el uso de zonas de transición del hipocótilo (documento WO 98/15622), los ápices de brotes (documento WO 89/12102 y patente de EE.UU. Nº 5.164.310) y los tejidos meristemáticos apicales o nodales (documento WO 97/43430). Como alternativa, los explantes de algodón pueden ser transformados por medio de bombardeo de microproyectiles, por ejemplo, ejes embrionarios (documentos WO 92/15675 y EP 0 506 531; McCabe and Martinell, 1993) y cultivos embriogénicos en suspensión (Finer and Mc Mullen, 1990).
20
25

La mayoría de los procedimientos citados anteriormente emplean una vía de regeneración de la embriogénesis somática, que requiere un largo proceso de iniciación, maduración y germinación. La transformación de tejidos somáticos de callos embriogénicos o cultivos embriogénicos en suspensión, ya sea a través de la transformación mediada por *Agrobacterium* (patente de EE.UU. Nº 6.483.013; patente de EE.UU. Nº 5.583.036) o el bombardeo de partículas (Finer and Mc Mullen, 1990), ha acortado sustancialmente el proceso de regeneración. Sin embargo, la transformación sigue estando seriamente dificultada por la inusualmente baja tasa de conversión de embriones somáticos en plántulas enraizadas normales.
30

Aparte de la regeneración, se han buscado procedimientos más eficientes para la administración de ADN-T en el genoma del huésped en conexión con la transformación de plantas tales como el algodón. Se han llevado a cabo extensas investigaciones para comprender la virulencia de *Agrobacterium* y la conjugación del ADN-T. Hoy en día, es bien sabido que antes de que el ADN-T pueda ser administrado en las células vegetales, las células de *Agrobacterium* deben reconocer y unirse a las células huésped a través de complejos mecanismos de señalización mediados por factores químicos secretados por el huésped, cuya producción se induce a través de heridas mecánicas. Estos factores químicos consisten en una variedad de compuestos fenólicos tales como acetosiringona, ácido sinapínico (ácido 3,5 dimetoxi-4-hidroxicinámico), ácido siringico (ácido 4-hidroxi-3,5 dimetoxibenzoico), ácido ferúlico (ácido 4-hidroxi-3-metoxicinámico), catecol (1,2-dihidroxibenzeno), ácido p-hidroxibenzoico (ácido 4-hidroxibenzoico), ácido β-resorcílico (ácido 2,4 dihidroxibenzoico), ácido protocatéquico (ácido 3,4-dihidroxibenzoico), ácido pirrogálico (ácido 2,3,4-trihidroxibenzoico), ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico) y vainillina (3-metoxi-4-hidroxibenzaldehído) (patente de EE.UU. Nº 6.483.013). Se ha encontrado que una proteína virG mutante (virGN54D) expresada constitutivamente mejora la virulencia de *Agrobacterium* y la eficiencia de la transformación. (Hansen y col., 1994). De manera similar, compuestos químicos, tales como acetosiringona o nopalina, que estimulan la virulencia de *Agrobacterium*, aumentaron notablemente la eficiencia de la transformación de ápices de algodón (Veluthambi y col., 1989) y callos somáticos embriogénicos que se propagaron en medios sólidos (patente de EE.UU. Nº 6.483.013). Un ejemplo es la transformación con éxito de un gran número de hongos, que son incapaces de secretar compuestos inductores de virulencia de *Agrobacterium*, lo que hace indispensable a la acetosiringona para la conjugación del ADN-T (Bundock y col., 1995; de Groot y col., 1998).
35
40
45
50

A pesar de los muchos esfuerzos pasados y los intentos de mejorar los procedimientos de transformación, las técnicas utilizadas hasta la fecha siguen siendo improductivas, demandan gran cantidad de tiempo y son costosas. Por consiguiente, algunas plantas, como el algodón, quedan muy rezagadas por detrás de otros cultivos importantes en la comprensión de los mecanismos moleculares del desarrollo de la planta y la diferenciación de los tejidos. Es evidente que las técnicas de transformación actuales son incompatibles con la importancia económica del algodón en particular, y hace mucho tiempo que se necesita un gran avance.
55

En la mayoría de las plantas, incluido el algodón, los procedimientos de transformación explotan principalmente el *Agrobacterium* para administrar ADN-T en las células huésped que se limitan a una pequeña superficie, es decir, la superficie de corte de los explantes o el callo (patente de EE.UU. N° 6.483.013). Esto limita en gran medida la incidencia de la transformación genética ya que la mayoría de las células huésped no están en contacto directo con el donador de ADN-T. Como resultado, aproximadamente sólo del 20 al 30% de los explantes se transforman (Firoozabady y col., 1987; Cousins y col., 1991). Anteriormente, los cultivos celulares en suspensión se transformaron con éxito usando un régimen de co-cultivo que se basaba en un medio líquido en un tubo "T" o en un matraz (patente de EE.UU. N° 5.583.036). Si bien no se muestra ningún tipo de detalle sobre la transformación, encontramos que el procedimiento tiene una eficacia de transformación similarmente baja (Fig. 14). Un problema importante en el procedimiento podría ser la baja eficiencia de conjugación del ADN-T cuando se realizó el co-cultivo en medio líquido rico en el que las células de *Agrobacterium* pueden tener dificultades para expresar los genes de virulencia y para unirse a las células vegetales mantenidas bajo agitación constante.

A diferencia de los explantes que se han utilizado principalmente para la transformación de plantas, las células en cultivos en suspensión están presentes como una sola célula o como un pequeño grupo de células. En la actualidad, no hay una técnica eficaz para manipular y transformar estos materiales. Estudios recientes han sugerido que las células de hongos cultivadas en medio líquido se pueden transformar cuando el co-cultivo se realiza en las membranas porosas colocadas sobre un medio semisólido que ha sido optimizado para la virulencia de *Agrobacterium* (Pub. PCT. WO 02/00896, Bundock y col., 1995; Piers y col., 1996; de Groot y col., 1998). El uso de membranas o filtros tiene una doble ventaja. Filtra eficazmente el exceso de líquido que se hace hecho pasar, recogiendo el receptor de ADN-T y las células del donador al tiempo que permite la difusión eficiente de los nutrientes, minerales y compuestos de señalización entre el co-cultivo y el medio.

Finer (1988; patente europea 0317512 B1) inició la embriogénesis en medio líquido con bajo contenido de auxina (sales MS, vitaminas B5, 2,4-D 0,1 mg/l o picloram 0,5 mg/l, sacarosa al 2%) utilizando callos indiferenciados derivados de cotiledones o explantes de hipocótilo. Los tejidos embriogénicos a continuación se hicieron proliferar o se mantuvieron en un medio líquido similar con un mayor contenido de auxina (2,4-D 5 mg/l). Los tejidos de la suspensión así preparados pueden convertirse en embriones maduros en medio líquido si hay glutamina presente.

Rangan y col. (patentes de EE.UU. N° 5.583.036 y 5.244.802) iniciaron la formación de embriones somáticos en medio sólido con alto contenido de auxina (1-10 mg/l) y mantuvieron el callo embriogénico en medio líquido con alto contenido de auxina (1-10 mg/l) utilizando callos diferenciados derivados del cotiledón, explantes de hipocótilo o embriones cigóticos producidos en medio sólido. El cultivo contenía una mezcla de agregados de células embriogénicas de diferentes tamaños y necesitaba ser filtrado con regularidad para eliminar los agregados más grandes.

Trolinder and Goodin (1987) iniciaron la embriogénesis en medio líquido sin hormonas y mantuvieron los cultivos en suspensión en el mismo medio. Las células en este tipo de cultivo en suspensión tienen etapas heterólogas de desarrollo y están presentes como grandes agregados que secretan compuestos que producen oscurecimiento e inhiben el crecimiento.

Levee, y col., (1999) y las Publicaciones de Solicitud de patente de EE.UU. N° US2002/0100083 A1, US2002/0083495 A1 y US2002/0092037 A1 se refieren al uso de membranas en el co-cultivo de células de pino.

Sigue habiendo una necesidad en la técnica de procedimientos mejorados y más eficientes de transformación mediada por *Agrobacterium* y regeneración de plantas, tales como el algodón, el maíz, la soja, el trigo, el arroz y la cebada.

Resumen de la invención

Para superar los problemas asociados con los procedimientos previamente informados de transformación de plantas (en especial, el algodón), la presente invención proporciona procedimientos para la transformación de alta eficiencia de plantas a través de conjugación de ADN-T mediada por *Agrobacterium* a callos o células cultivadas en suspensión. Los procedimientos descritos en el presente documento utilizan membranas o filtros como soporte sólido para el co-cultivo del donador de ADN-T y el receptor. En particular, la presente invención proporciona un procedimiento para producir una planta transgénica de algodón, que comprende proporcionar una célula proembriogénica de algodón y cultivar la célula en un medio líquido para producir un cultivo de células en suspensión. El cultivo en suspensión se co-cultiva, sobre un soporte sólido poroso y bajo una luz continua, con un cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* que alberga un vector que comprende un gen exógeno y un marcador seleccionable, siendo el *Agrobacterium* capaz de efectuar la transferencia estable del gen exógeno y el marcador seleccionable al genoma de la célula. De este modo se genera una población de células, y las que expresan el gen exógeno se seleccionan y se regeneran en plantas transgénicas.

En un aspecto, utilizando proteína fluorescente verde (GFP) como marcador visual, se descubrió que los cultivos de células de algodón podrían ser transformados con una eficacia sorprendentemente alta (hasta 200 unidades formadoras de callos resistentes a la kanamicina por 200 mg de masa celular) y podrían ser regenerados en plantas fértiles con una eficiencia mucho más alta que la publicada.

En otro aspecto de la invención, tejidos previamente no explorados, tales como la raíz o ápices de brotes de algodón disecados a partir de semillas maduras, se utilizaron para la iniciación y el mantenimiento de las células cultivadas en suspensión que mantienen competencia embriogénica.

5 Actualmente, dos procedimientos que se han dado a conocer referidos a la transformación de materiales somáticos embriogénicos del algodón a través de la conjugación de ADN-T mediada por *Agrobacterium* son el tema de la patente de EE.UU. N° 5.583.036 y de la patente de EE.UU. N° 6.483.013. La patente de EE.UU. N° 5.583.036 se refiere a procedimientos para la transformación de cultivos en suspensión por medio del co-cultivo en medio líquido de callos embriogénicos de algodón con *Agrobacterium tumefaciens* que alberga un plásmido Ti que contiene un gen de interés. La patente de EE.UU. N° 6.483.013 se refiere a un procedimiento para la transformación de callos embriogénicos de algodón que se habían iniciado y propagado en medios sólidos con alto contenido de auxina y en el que el co-cultivo con *Agrobacterium tumefaciens* se realizó en medios sólidos. Ambos procedimientos emplearon embriogénesis somática para regenerar plantas fértiles de algodón. En el presente documento, como se indica, la invención proporciona procedimientos para la transformación de cultivos de células en suspensión y su regeneración en plantas fértiles que representan mejoras con respecto a estos procedimientos. En particular, el uso de una técnica de co-cultivo llevado a cabo sobre un soporte poroso sólido, tal como una membrana o un filtro, mejora considerablemente la eficiencia de transformación en plantas. Otros aspectos de la presente invención incluyen el uso de diferentes composiciones de medios.

Breve descripción de las figuras

20 La **Figura 1** muestra la organización del gen de PZP111-35S:GPK. L y R representan los bordes izquierdo y derecho, respectivamente. El gen marcador de selección de plantas (*NPTII*) está bajo el control del promotor de CaMV 35S y del terminador 35S y *GFP* está bajo control del promotor 35S y del terminador Nos.

La **Figura 2** muestra la estructura de callos proembriogénicos (S4) propagados en cultivos en suspensión.

25 La **Figura 3** muestra el oscurecimiento de las soluciones y los cultivos en suspensión. (A) Representa el cultivo S16 cultivado constantemente en LM1; (B) muestra el cultivo S16 alternado en cuatro medios diferentes (LM1, LM2, LM3 y LM4).

30 La **Figura 4** muestra los efectos de las citocininas sobre el rendimiento de embriones somáticos. Se sembraron aproximadamente 0,1 mg de masa de callos en placas con medio MS (básico) o MS suplementado con NAA 0,01 mg/l (NAA), 6BA 1 mg/l (BA), 2IP 1 mg/l o ribósido de zeatina 1 mg/l (RZ). S5 y S16 son dos cultivos en suspensión. El número de embriones somáticos se obtuvo después de un mes. Los resultados mostrados representan la media de series de placas por triplicado.

35 La **Figura 5** representa el efecto del ribósido de zeatina en la producción de embriones somáticos con respecto a los cultivos en suspensión S5 después de dos subcultivos en medio R1 y un subcultivo en medio R2. Los paneles son los siguientes: (A) Sin ribósido de zeatina en todos los subcultivos, (B) ribósido de zeatina 1 mg/l añadido durante el primer subcultivo (sólo se muestran 2 sectores), (C) ribósido de zeatina 1 mg/l añadido durante el primer y el segundo subcultivo; (D) ribósido de zeatina 1 mg/l añadido durante tres subcultivos.

La **Figura 6** muestra el co-cultivo de células receptoras de ADN-T y células donadoras sobre una membrana de nylon (Hybond-N).

La **Figura 7** (A) muestra la selección en medio sólido R1 en sectores, (B) la selección en una balsa de cultivo en medio líquido, (C) representa células transformadas, GFP + 5 días después del co-cultivo.

40 La **Figura 8** representa embriones (A) y tejidos embrionarios (B) transformados, GFP +, un mes después del cultivo en el medio selectivo R1.

La **Figura 9** muestra embriones germinados (A) y tejidos embrioides (B) 4 meses después del cocultivo.

La **Figura 10** muestra las plántulas con brotes múltiples derivadas de tejidos embrioides.

La **Figura 11** muestra plántulas listas para colocar en macetas derivadas de un embrión somático germinado.

45 La **Figura 12** muestra plantas sanas en floración 7 a 8 meses después del co-cultivo.

La **Figura 13** muestra hojas GFP + de una hoja transgénica adulta (panel izquierdo) y la fluorescencia de fondo de una planta adulta no transformada.

50 La **Figura 14** muestra los sectores de callos cultivados en medio selectivo R1 durante un mes. (A) muestra los resultados del procedimiento de co-cultivo que se describe en la patente de EE.UU. N° 5.583.036. (B) muestra los resultados obtenidos de acuerdo con el procedimiento de la presente invención.

La **Figura 15** muestra: (A) pólenes frescos tomados de plantas naturales (Coker 312); (B) polen fresco de plantas transgénicas derivadas de S16, (C) una cápsula de algodón abortada (de la misma planta) con algunos óvulos

fertilizados que contienen fibras de elongación; (D) una ampliación de la cápsula de algodón 10 días después de la polinización de la misma planta con pólenes naturales.

Descripción detallada de la invención

5 La presente invención se refiere en general a procedimientos para la producción de plantas transgénicas de algodón, que expresan al menos un gen de interés mediante la integración de una copia del gen en el genoma nuclear. En particular, la invención proporciona un procedimiento para producir una planta transgénica, comprendiendo el procedimiento proporcionar una célula proembriogénica de algodón y cultivar la célula en un medio líquido para producir un cultivo de células en suspensión. En un soporte sólido poroso y bajo una luz continua, el cultivo de células en suspensión se co-cultiva con un cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* que alberga un vector que comprende un gen exógeno y un marcador seleccionable, siendo el *Agrobacterium* capaz de efectuar la transferencia estable del gen exógeno y un marcador seleccionable al genoma de la célula. El co-cultivo genera de este modo una población de células. Una célula de la población que expresa el gen exógeno se puede seleccionar y regenerar en una planta transgénica. En una forma de realización, la célula proembriogénica deriva de, se obtiene de, o es parte de un callo. El soporte sólido poroso es, de preferencia, una membrana o un filtro, y de preferencia comprende al menos uno de los siguientes materiales: nylon, nitrocelulosa, celulosa o fibras de vidrio. En una forma de realización, el soporte sólido se sumerge en un medio líquido. En una forma de realización alternativa, el soporte sólido se sitúa en un medio sólido adecuado. El vector puede ser un plásmido, tal como un plásmido Ti o Ri. Los procedimientos de la presente invención representan una mejora sobre los procedimientos conocidos de transformación mediada por *Agrobacterium*.

20 Si se desea, la planta transgénica (transformada) resultante, puede retrocruzarse con un germoplasma de interés utilizando procedimientos bien conocidos en la técnica. Las especies de algodón de preferencia incluyen *Gossypium hirsutum* y *Gossypium barbadense*. Otras plantas, incluidas otras dicotiledóneas también son adecuadas para la transformación por medio de los procedimientos de la presente invención.

25 En los presentes procedimientos, el medio líquido puede ser un medio con bajo contenido de auxina (en un intervalo, por ejemplo, NAA desde aproximadamente 0 hasta aproximadamente 0,1 mg/l). A menos que se indique lo contrario, los medios utilizados en las etapas de cultivo de los procedimientos descritos en el presente documento pueden ser cualquiera de los medios adecuados y apropiados para el cultivo. Muchos de tales medios son conocidos y están disponibles en la técnica. La selección de las células es por medios químicos o genéticos, y puede incluir el uso de una construcción informadora como un marcador seleccionable. Tales procedimientos de selección son conocidos en la técnica. En una forma de realización de preferencia, la construcción informadora expresa de manera constitutiva la proteína fluorescente verde. Una construcción informadora particularmente de preferencia es pZP111-35S:GFP.

30 En una forma de realización, la célula proembriogénica se obtiene por medio de la esterilización de una semilla de la planta, la germinación de la semilla para generar tejido de la planta, la obtención de un explante de tejido de la planta y la inducción de la formación del callo del explante. La semilla se puede esterilizar en una disolución de lejía, de preferencia una disolución que comprende aproximadamente lejía al 30%. La semilla se puede hacer germinar en medio MS, y tal germinación puede tener lugar en aproximadamente 4 a 14 días. El explante es, de preferencia, una raíz o un ápice del brote.

35 Los procedimientos de la presente invención pueden comprender además la inducción de la formación de callo y la iniciación de la embriogénesis somática en un medio sólido, que puede tener lugar durante un período de aproximadamente uno a aproximadamente tres meses. Además, los procedimientos pueden comprender además la inducción de la diferenciación del callo para generar tejido proembriogénico, y tal diferenciación puede producirse, de preferencia, en un medio sólido sin hormonas durante un período de tiempo suficiente para generar tejidos proembriogénicos, que de preferencia se suspenden, se mantienen y se propagan en un medio líquido o en una serie de medios líquidos con bajo contenido de auxina.

40 Los materiales cultivados en suspensión como los descritos anteriormente se sub-cultivan de preferencia regularmente en una serie de medios frescos con diferencias en el contenido de auxina y en las fuentes de nitrógeno, y de preferencia en un intervalo de aproximadamente 3 a aproximadamente 30 días. Los medios líquidos utilizados como anteriormente contienen de preferencia sal MS y vitaminas B5 y están suplementados con bajas concentraciones de auxina, de preferencia NAA aproximadamente 0 a 0,1 mg/l y/o picloram aproximadamente 0 a 1 mg/l. Las fuentes de nitrógeno alternativas, si están presentes, son de preferencia aminoácidos, tales como glutamina y/o asparagina, y de preferencia están presentes en concentraciones de aproximadamente 0,1 a 5 g/l. Los medios sólidos o líquidos anteriormente mencionados tienen de preferencia un valor de pH de aproximadamente 5,8 a aproximadamente 6,5, de preferencia de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 6,4. Los cultivos en suspensión se pueden mantener sobre una plataforma rotativa con una temperatura en el intervalo de aproximadamente 26° a aproximadamente 32 °C y con un ciclo de iluminación de aproximadamente 16 horas.

55 El co-cultivo que se describe en el presente documento puede comprender además el cultivo de las cepas de *Agrobacterium* de interés en un medio líquido con bajo contenido de fosfato, de preferencia un medio MinAB

5 suplementado con una concentración apropiada de agentes inductores de virulencia, a una densidad de preferencia de aproximadamente 0,1 a 0,5 unidades DO600, que proporcionan un *Agrobacterium* con una virulencia preinducida. El cultivo se puede reconstituir en un medio líquido que da lugar a un buen crecimiento de las células receptoras de ADN-T y a una expresión aumentada de virulencia de *Agrobacterium*. Como alternativa, las cepas de *Agrobacterium* pueden ser diseñadas por ingeniería genética para expresar de manera constitutiva mutantes *virA* activos mediante la inserción del gen en el genoma de *Agrobacterium* o en los vectores plasmídicos Ti o Ri dentro del *Agrobacterium*.

10 Los materiales cultivados en suspensión pueden reconstituirse en un medio líquido que sea óptimo para la expresión de genes *vir* de *Agrobacterium* y mezclarse con el cultivo de *Agrobacterium* preparado como se describe, sobre un soporte sólido poroso, tal como una membrana o un filtro. Esta mezcla se puede incubar bajo iluminación constante durante aproximadamente 1 a 5 días. En una forma de realización, las células o los callos se transfieren a un medio sin hormonas suplementado con los antibióticos apropiados para suprimir el crecimiento de las células vegetales no transformadas y las células de *Agrobacterium*. El soporte sólido poroso puede ser una membrana o un filtro, como se ha descrito, y se puede colocar sobre un medio sólido adecuado o se puede empapar en un medio líquido adecuado, de preferencia los medios contienen sal MS o sal MinAB y están suplementados con vitaminas B5 y glucosa y/o glicerol como fuente de carbono. Estos medios tienen de preferencia un valor de pH entre 15 aproximadamente 5,7 y aproximadamente 6,5, de preferencia entre aproximadamente 5,7 y aproximadamente 5,9. El co-cultivo se lleva a cabo de preferencia a aproximadamente 18-26 °C, y bajo iluminación constante o continua.

20 El cultivo de *Agrobacterium* puede ser una preparación fresca o una que se ha crioconservado, tal como, por ejemplo, en presencia de DMSO aproximadamente al 0-20%; glicerol aproximadamente al 0-90% o sorbitol aproximadamente 0-5 M o cualquier combinación de los mismos.

25 En un aspecto, la invención también proporciona procedimientos para la regeneración de plantas completas a partir de materiales proembriogénicos cultivados en suspensión. Tales procedimientos incluyen la inducción de la re-entrada en el desarrollo embriogénico y la proliferación de embriones mediante la colocación de los materiales en cultivos en suspensión, con o sin co-cultivo previo con *Agrobacterium*, en un medio sin hormonas a base de MS con KNO₃ de refuerzo, y el subcultivo regular, tal como, por ejemplo, aproximadamente cada 3 a 4 semanas, en un medio con la misma composición durante un período suficiente para producir embriones preglobulares a globulares. Se pueden llevar a cabo otros subcultivos, de nuevo, por ejemplo, aproximadamente cada 3 a 4 semanas, en un medio sólido, de preferencia a base de MS suplementado con aminoácidos, de preferencia glutamina y asparagina en una concentración de aproximadamente 0,1-5 g/l, y con KNO₃ de refuerzo durante aproximadamente 4 a 12 30 semanas. La formación de la raíz y las hojas verdaderas puede ser inducida en medios adecuados y las plántulas resultantes se pueden transferir a macetas con tierra para producir plantas con flores. Los medios incluidos en el presente documento pueden estar suplementados con los antibióticos adecuados para inhibir el crecimiento de las células no transformadas y las células de *Agrobacterium* cuando se utiliza el co-cultivo. El subcultivo se puede realizar en un medio líquido, en un medio líquido soportado en una membrana, en un medio sólido o en otro medio 35 adecuado. Estos medios tienen de preferencia un valor de pH de aproximadamente 5,7 a aproximadamente 6,5, de más de preferencia de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 6,4. El algodón u otras células vegetales, embriones somáticos y plántulas, según se hace referencia en el presente documento, se cultivan de preferencia a una temperatura de aproximadamente 25 °C a 32 °C con ciclos de iluminación de aproximadamente 16 horas. Los materiales co-cultivados se pueden seleccionar sin lavado previo.

40 La invención también proporciona un procedimiento, como una ampliación y complementación a los procedimientos ya descritos en el presente documento, para el rescate de plantas estériles y la producción acelerada de las variedades comerciales, que comprende la polinización manual de las plantas, incluyendo plantas masculinas estériles, con pólenes obtenidos de semillas cigóticas de la misma variedad o de un germoplasma de interés específico. El retrocruzamiento continuo en las siguientes generaciones se puede realizar según sea necesario o 45 deseado.

En los procedimientos de preferencia, el *Agrobacterium* comprende un gen *virA* mutante. El gen *virA* mutante se puede incorporar en el genoma del *Agrobacterium* o se puede incorporar en el vector.

50 En los procedimientos descritos, la regeneración de células en plantas puede mejorarse mediante la adición de una citocinina. Para el algodón, en particular, la citocinina de preferencia es una zeatina o un derivado de la misma. Además, en una forma de realización, la célula vegetal proembriogénica se inicia en un medio sólido que comprende una baja concentración de 2,4-D y citocinina. La célula proembriogénica también se puede propagar en un medio líquido sin hormonas y/o en un medio líquido con baja concentración de auxina.

55 Las técnicas para la introducción de genes exógenos en *Agrobacterium* para que puedan ser transferidos de forma estable a una planta o tejido vegetal expuestos al *Agrobacterium* son bien conocidas en la técnica. Resulta ventajoso usar una cepa denominada "desarmada" de *Agrobacterium* o un plásmido Ti, que es, una cepa o un plásmido en los que los genes responsables de la formación del tumor característico de la enfermedad de la agalla o tumor de cuello causado por *Agrobacterium* de tipo natural están eliminados o desactivados. En la literatura se pueden encontrar numerosos ejemplos de cepas desarmadas de *Agrobacterium* (por ejemplo, pAL4404, pEHA101 y PEH 105 (Walkerpeach and Velten, 1994)). Además, es ventajoso utilizar un así llamado sistema de vectores binario, tal como

el descrito en Schilperoort y col., 1990, 1995. Un sistema de vectores binario permite la manipulación en *E. coli* del plásmido portador del gen exógeno que se va a introducir en la planta, lo que hace que el proceso de construcción del vector se pueda llevar a cabo de una manera mucho más fácil.

5 De manera similar, la construcción del vector, incluyendo la construcción de genes quiméricos que comprenden el gen exógeno que se desea introducir en la planta, puede llevarse a cabo utilizando técnicas muy conocidas en la técnica. Los genes quiméricos deben comprender promotores que tengan actividad en el huésped en el que se desea la expresión. Por ejemplo, puede ser ventajoso contar con una serie de marcadores seleccionables para la selección de las células transformadas en las diversas etapas del proceso de transformación. Un marcador seleccionable (por ejemplo un gen que confiere resistencia a un antibiótico tal como la kanamicina, la cefotaxima o la estreptomycinina) ligado a un promotor activo en bacterias permitiría la selección de las bacterias que contienen el marcador (es decir, los transformantes). Otro marcador seleccionable ligado a un promotor activo en la planta, tal como el promotor de CaMV 35S o un promotor de ADN-T, tal como el promotor NPT II NOS, permitiría la selección de las células vegetales transformadas. El gen exógeno que se desea introducir en la célula vegetal debe comprender un promotor activo en la planta en relación funcional con la secuencia codificadora, de modo que el promotor dirija la expresión del gen en la planta transformada. Una vez más, los promotores activos en las plantas, tales como el promotor de CaMV 35S, NPT II NOS o cualquiera de una serie de promotores específicos de tejidos, son muy conocidos en la técnica, y la selección de un promotor apropiado se encuentra dentro de la experiencia ordinaria en la técnica.

20 El presente procedimiento se puede utilizar para producir plantas transgénicas que expresan cualquier número de genes exógenos, y no está limitado por la elección de uno de tales genes. La selección del gen exógeno deseado depende del objetivo del investigador, y numerosos ejemplos de genes deseables que podrían ser utilizados con la presente invención son conocidos en la técnica (por ejemplo, la familia de genes de toxinas de *Bacillus thuringiensis*, genes de resistencia a herbicidas tales como los genes de la shikimato sintasa que confieren resistencia al glifosato, patente de EE.UU. N° 5.188.642, o un gen de 2,4-D monooxigenasa que confiere resistencia al ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (Bayley y col., 1992), genes de esterilidad masculina, tales como los genes antisentido de la patente de EE.UU. N° 5.741.684 (Fabijanski, y col.), o incluso los complejos sistemas de protección de cultivos descritos en la patente de EE.UU. N° 5.723.765 (Oliver y col.)).

30 Como se evidencia en el presente documento, la presente invención proporciona, entre otras cosas, procedimientos que utilizan diferentes procedimientos de iniciación y mantenimiento en suspensión. Como ejemplo no limitante, se usaron raíces y ápices de brotes de algodón procedentes de semillas maduras como explantes para la inducción de callos en presencia de citocinina y una baja concentración de 2,4-D. Se puede poner en funcionamiento una vía de desarrollo de embriogénesis somática tras realizar la transferencia a un medio sólido sin hormonas, con alto contenido de KNO₃. El cultivo en suspensión del callo seleccionado se puede iniciar en un medio líquido con una composición similar suplementado con una baja concentración de auxina (NAA 0,01 mg/l). Tales cultivos se pueden mantener en las diversas etapas de desarrollo embriogénico temprano en función del tiempo en que se transfirió el callo al medio líquido. Los cultivos celulares producidos pueden sufrir pardeamiento con el cultivo prolongado si se utiliza el mismo medio constantemente. No obstante, una solución eficaz para este problema incluye la rotación de los cultivos entre cuatro variantes de medios. Esto permite que los cultivos experimenten un ciclo de proliferación-diferenciación celular breve gracias a la característica de optimización del desarrollo del embrión que aportan las fuentes de nitrógeno reducidas (Davidonis and Hamilton, 1983). Los cultivos en suspensión preparados de este modo tienen buena sincronía en el desarrollo y tienen un color amarillento uniforme. La competencia embriogénica varía entre las diferentes líneas celulares.

45 Además se proporciona una composición de medios para la regeneración acelerada de embriones somáticos a partir de cultivos celulares a través del tratamiento con citocininas que mejoran notablemente el desarrollo embriogénico temprano. Se ha encontrado que las citocininas desempeñan un papel importante en la embriogénesis somática (Xing y col, 1999; Sagare y col, 2000; Tokuji and Kuriyama, 2003). Su uso en la regeneración del algodón, sin embargo, nunca ha sido informado. Se descubrió que las citocininas, en particular el ribósido de zeatina, mejora significativamente la formación de embriones somáticos cuando se usa en las etapas tempranas de regeneración de la planta. El uso adecuado de la hormona da lugar a una reproducción más rápida de plántulas completas debido al aumento de la tasa de conversión a embriones en estado globular y al desarrollo acelerado de las hojas. Anteriormente, la regeneración de células en suspensión se lograba por medio del cultivo de las células en medio líquido o sembrando las células en placas de manera uniforme en medios sólidos (Finer, 1988; patente Europea 0317512B1, patente de EE.UU. 5583036). Ambos procedimientos son muy diferentes en comparación con el entorno de desarrollo natural de los embriones cigóticos. Además, como los materiales necesitan subcultivos reiterados, los callos plaqueados presentan dificultades para trabajar y los transformantes de crecimiento más lento se pueden seleccionar durante la regeneración. La presente invención simplifica por consiguiente el proceso de manipulación de células o callos cultivados en suspensión por medio de la inclusión parcial en medio sólido en sectores, que resultan más fáciles para la transferencia de material entre subcultivos, y la agrupación de células de tal manera puede evitar la deshidratación durante el cultivo en medios sólidos.

60 Se sabe que la virulencia de *Agrobacterium* está influenciada por el pH del entorno y la temperatura. La virulencia óptima se produce a un pH de aproximadamente 5,7 por debajo de 25 °C (Rogowsky, y col., 1987; Fullner and

5 Nester, 1996). Estos factores se han tenido en cuenta para desarrollar medios diferentes del que se ha utilizado para la transformación de alta eficiencia de los hongos filamentosos (Bundock y col., 1995; de Groot y col., 1998), para adaptar a un crecimiento saludable de las células vegetales, en particular el algodón. El co-cultivo se realiza a una temperatura de aproximadamente 24 °C con cultivos pre-inducidos. Como alternativa, las cepas de *Agrobacterium* pueden diseñarse mediante ingeniería genética para expresar mutantes de *virA* (McLean y col., 1994).

A la luz de la descripción anterior, un experto en la técnica puede llevar a la practicar la invención en toda su extensión. Los siguientes ejemplos, por lo tanto, son meramente ilustrativos y no deben interpretarse en modo alguno como limitantes de la invención como se establece en las reivindicaciones que se exponen a continuación.

10 Se utilizó una construcción informadora, pPZP111-35S:GFP (Xu y col., datos no publicados), que expresa de manera constitutiva la proteína fluorescente verde (GFP) (Fig. 1) para ilustrar los procesos técnicos y para supervisar la eficacia de los procedimientos. Como se ha indicado, se pueden utilizar otros marcadores adecuados.

Ejemplo 1

Generación de cultivos de células de algodón en suspensión a partir de explantes

15 Las semillas de algodón se esterilizaron por inmersión en una disolución de lejía al 30% durante 45-90 minutos. Después de aclarar en agua, las semillas se incubaron en agua a 28 °C durante 1 día y se incubaron además en un medio SGM a 28 °C con 16 horas de iluminación durante 4-14 días. Las raíces se cortaron en segmentos cortos (de 3 a 5 mm) y se dejaron desarrollar los callos en el medio SM1 durante aproximadamente un mes. Como alternativa, los ápices embriogénicos de los brotes se disecaron de las semillas y se utilizaron para la inducción del callo. Los callos se separaron de los explantes y se incubaron adicionalmente en medio SM1 durante aproximadamente un mes. Para inducir la embriogénesis somática, los callos se transfirieron al medio SM2, se subcultivaron cada 3-4 semanas en un medio fresco hasta obtener los callos de color amarillento o rojizo poco estructurados. Hasta 200 mg de los callos aislados se colocaron en 50 ml de medio LM1 en un recipiente adecuado, por ejemplo, un matraz cónico de 250 ml o un contenedor cilíndrico de cultivo de tejidos, y se incubaron a 28 °C en una plataforma de agitación (120 rpm) con ciclos de iluminación de 16 horas. Las células o los tejidos de callo se subcultivaron, típicamente cada 7-14 días mediante la transferencia de 15 ml del cultivo (aproximadamente 2 ml de la masa de células en un cultivo estabilizado) a 35 ml de medio fresco en un nuevo contenedor. Se utilizaron cuatro variantes de medios líquidos (LM1, LM2, LM3 y LM4) cíclicamente.

Ejemplo 2

Introducción de un gen de interés en las células de algodón

30 Se administró un gen de interés a las células de algodón a través de conjugación de ADN-T mediada por *Agrobacterium* por medio del co-cultivo del cultivo de algodón subcultivado en suspensión recién preparado con un cultivo de *Agrobacterium* que albergaba el gen de interés y un marcador de selección dominante en un vector del plásmido Ti o Ri apropiado. Las mezclas se transfirieron conjuntamente a una hoja de membrana porosa o papel de filtro colocado encima de una placa SIM1 o SLIM2 durante un tiempo suficiente para producir el número deseado de células de algodón transformadas. Como alternativa, se utilizaron 3-4 hojas de papel de filtro empapadas con un medio líquido en lugar del medio sólido. Para obtener los mejores resultados, se utilizó el cultivo pre-inducido de *Agrobacterium* preparado como se describe para la transformación de hongos filamentosos aunque se pueden utilizar cultivos bacterianos comunes (de Groot y col., 1998).

Ejemplo 3

40 Regeneración en plantas de algodón transgénicas a partir de células transformadas

Después del co-cultivo, las células se transfirieron al medio R1 suplementado con los antibióticos adecuados para la supresión de las células de algodón no transformados y las células de *Agrobacterium* que permanecían unidas. También puede lograrse la selección de las células vegetales transformadas mediante marcadores visuales. Las células de algodón co-cultivadas no necesitan lavado y se pueden transferir a un medio sólido selectivo como callos en sectores (normalmente 100-150 por co-cultivo). Como alternativa, cada co-cultivo se transfirió en conjunto a una balsa de cultivo en el mismo medio sin Phytigel (Fig. 7). El cultivo en medio líquido se limitó normalmente a las 3-4 semanas iniciales. Después de eso, de preferencia se transfirió al medio R1 sólido. Normalmente se requirieron unas 3-4 semanas más en medio R1 para la obtención de múltiples embriones. De no observarse los embriones indiferenciados se podía realizar un cultivo adicional en un medio R1. Posteriormente, los embriones en etapa globular o más tardía, resistentes a los antibióticos se cultivaron en un medio R2 durante 3-4 semanas y esto se repitió una vez más. Los antibióticos pueden ser omitidos del segundo cultivo en el medio R2. Los embriones completamente desarrollados (sin raíz, con los cotiledones) o los tejidos verdes embrioides sin cotiledones evidentes se transfirieron al medio R3 y las plántulas completas se transfirieron a un medio R4. En aproximadamente 3-4 semanas, las plántulas se plantaron en macetas con tierra.

Ejemplo 4

Preparación de cultivos celulares en suspensión

Las semillas de algodón (Coker 312) se esterilizaron por inmersión en disolución de lejía (Clorox) al 30% durante 45 minutos y, después de dos lavados en agua, se incubaron en agua a 28 °C durante un día. Las semillas se incubaron además en medio SGM a 28 °C con ciclos de iluminación de 16 horas durante 4 días. Se cortaron las raíces de color blanco en segmentos cortos (de 3 a 5 mm) y se dejaron desarrollar los callos en medio SM1 durante aproximadamente un mes. Los callos fueron separados de los explantes y se incubaron en el mismo medio durante aproximadamente un mes más. Se transfirieron los callos al medio SM2, se subcultivaron aproximadamente cada 3-4 semanas en medio fresco hasta obtener callos poco estructurados. Se colocaron aproximadamente 200 mg del callo aislado en 50 ml de medio LM1 en un matraz cónico de 250 ml y se incubaron a 28 °C en una plataforma de agitación (120 rpm) con ciclos de iluminación de 16 horas. Los cultivos en suspensión se subcultivaron cada 7-14 días mediante la transferencia de una alícuota de 15 ml (aproximadamente 2 ml de masa de callos/células en un cultivo estabilizado) a 35 ml de medio fresco en un nuevo contenedor. Entre los 5 callos seleccionados, tres se estabilizaron como cultivos amarillentos con crecimiento vigoroso que consistía en callos de varios tamaños, cuando el subcultivo se desarrolló de forma cíclica en cuatro medios diferentes (LM1, LM2, LM3 y LM4). Los callos mostraron estructura embriogénica limitada o nula cuando se examinaron bajo un microscopio electrónico de barrido (Fig. 2). Si se utilizaba un solo medio de manera constante podía aparecer pardeamiento u oscurecimiento grave (Fig. 3). Los cultivos S4 y S5 se desarrollaron con éxito formando embriones somáticos cuando fueron transferidos a un medio sólido R1.

Ejemplo 5

Preparación de cultivos celulares en suspensión

Las semillas de algodón se esterilizaron por inmersión en disolución de lejía (Clorox) al 30% durante 45 minutos y, después de dos lavados en agua, se incubaron en agua a 28 °C durante 24 horas. Las semillas se incubaron además en medio SGM a 28 °C con ciclos de iluminación de 16 horas durante 4 días. Las raíces de color blanco se cortaron en segmentos cortos (de 3 a 5 mm) y se dejaron desarrollar los callos en medio SM1 durante un mes. Los callos fueron separados de los explantes y se cultivaron en el mismo medio durante aproximadamente un mes más. Se transfirieron los callos al medio SM2 y se subcultivaron cada 3-4 semanas en medio fresco hasta obtener callos poco estructurados. Se colocaron aproximadamente 200 mg del callo aislado en 50 ml de medio LM1 en un matraz cónico de 250 ml y se incubaron a 28 °C en una plataforma de agitación (120 rpm) con ciclos de iluminación de 16 horas. Los cultivos en suspensión se subcultivaron cada 7 días mediante la transferencia de una alícuota de 15 ml (aproximadamente 2 ml de masa de callos/células cuando los cultivos estaban estabilizados) a 35 ml de medio fresco en un nuevo contenedor. Entre los 3 callos seleccionados, dos se estabilizaron como callos amarillentos con crecimiento vigoroso cuando el subcultivo se desarrolló de forma cíclica en cuatro medios diferentes (LM1, LM2, LM3 y LM4). Los cultivos S15 y S16 se desarrollaron con éxito formando embriones somáticos cuando fueron transferidos a un medio sólido R1.

Ejemplo 6

Preparación de cultivos celulares en suspensión

Las semillas de algodón se esterilizaron por inmersión en disolución de lejía (Clorox) al 30% durante 45 minutos y se incubaron en agua a 28 °C durante 24 horas tras realizar dos aclarados con agua. Las semillas se incubaron además en medio SGM a 28 °C con ciclos de iluminación de 16 horas durante 4 días. Las raíces de color blanco se cortaron en segmentos cortos (de 3 a 5 mm) y se dejaron desarrollar los callos en medio SM1 durante aproximadamente un mes. Además, se disecaron los ápices embriogénicos de los brotes de las semillas esterilizadas y se utilizaron para la inducción de callos como con los explantes de raíces. Un mes más tarde, se disecaron los callos amarillentos en los ápices de los dos tipos de explantes y se incubaron en el mismo medio durante un mes más. Se transfirieron los callos al medio SM2, se subcultivaron cada 3-4 semanas en medio fresco hasta obtener callos poco estructurados. Se colocaron aproximadamente 200 mg del callo aislado en 50 ml de medio LM1 en un matraz cónico de 250 ml y se incubaron a 28 °C en una plataforma de agitación (120 rpm) con ciclos de iluminación de 16 horas. Los cultivos en suspensión se subcultivaron cada 7 días mediante la transferencia de una alícuota de 15 ml (aproximadamente 2 ml de masa de callos/células cuando los cultivos estaban estabilizados) a 35 ml de medio fresco en un nuevo contenedor. Los 7 callos seleccionados se estabilizaron como callos amarillentos con crecimiento vigoroso.

Ejemplo 7

Efectos de las citocininas sobre el desarrollo embriogénico temprano

Se sembraron aproximadamente 0,1 g de la masa de callos cultivados en suspensión en medio R1 suplementado con NAA 0,01 mg/l suplementado con 6BA, 2IP o ribósido de zeatina 1 mg/l. Se anotó el número de embriones en estado globular o más tardío después de cinco semanas de incubación. En ambos cultivos probados (S5 y S16), el tratamiento con ribósido de zeatina dio lugar a un aumento significativo en el rendimiento de embriones (Fig. 4).

Ejemplo 8

Efectos de las citocininas sobre el desarrollo embriogénico temprano

5 Se colocaron callos proembriogénicos en medio R1 con o sin ribósido de zeatina 1 mg/l. Los callos se cultivaron en el medio R1 que contenía ribósido de zeatina durante 1 a 3 meses. Se observó un aumento significativo en el número y el tamaño de los embriones en las placas tratadas con ribósido de zeatina y el efecto fue más espectacular con la exposición continua al ribósido de zeatina (Fig. 5).

Ejemplo 9

Transformación del cultivo en suspensión con el cultivo inducido por *Agrobacterium*

10 Se introdujo el vector binario de ADN-T, pZP111-35S:GFP, en la cepa AGL1 de *Agrobacterium tumefaciens* por electroporación. Se tomó un cultivo de la cepa saturado y se diluyó 5 veces con medio IM y además se incubaron a 28 °C durante 6 horas hasta que alcanzó una densidad óptica de aproximadamente 0,3 unidades DO₆₀₀. Se cultivaron aproximadamente 0,5 ml de cultivos en suspensión S5 y se mezclaron S5 que se habían cultivado en cualquiera de LM1, LM2, LM3 y LM4 con 0,2 ml de cultivo de *Agrobacterium* y co-transfirieron a una membrana Hybond N (Amersham Pharmacia) que se había colocado encima del medio R1 suplementado con acetosiringona 100 µM. Después de 3 días de co-cultivo a 24 °C con iluminación constante, se aclararon los callos en las membranas de nylon con un medio de suspensión (por ejemplo, LM1 suplementado con kanamicina 100 mg/l y cefotaxima 450 mg/l). La membrana completa se transfirió a medio R1 o R2 suplementado con kanamicina 100 mg/l y cefotaxima 300 mg/l y se cultivó a 28 °C con ciclos de iluminación de 16 horas. Los callos GFP positivos se observaron después de un mes. El cultivo restante de *Agrobacterium* se distribuyó en alícuotas de 20 0,5 ml y se añadió el mismo volumen de DMSO al 14%. El stock bacteriano se almacenó congelado a -80 °C hasta su uso.

Ejemplo 10

Transformación de cultivos en suspensión

25 Justo antes de su uso, se descongeló un tubo del cultivo AGL1 congelado y se recogieron las células bacterianas por centrifugación. Los sedimentos se resuspendieron en medio C1 0,5 ml (pH 5,7) se mezclaron con 0,5 ml (aproximadamente 0,2 g de masa celular) y se co-transfirieron a una membrana Hybond-N (Amersham Pharmacia) o a un papel de filtro Whatman 4 sobre el medio CP1 (pH 5,7). Se podían realizar múltiples co-cultivos independientes (3-4) en una sola membrana (Fig. 6). Después del co-cultivo, las células o callos se transfirieron (sin lavado) al medio R1 suplementado con kanamicina 100 mg/l de y cefotaxima 200 mg/l y se cultivaron a 28 °C con ciclos de 16 horas de iluminación. Cada co-cultivo se separó en hasta 160 sectores, representando cada uno a un solo callo grande o a un pequeño grupo de microcallos (Fig. 7A). Como alternativa, el co-cultivo en conjunto se transfirió a una balsa de cultivo en LM1 suplementado con kanamicina 100 mg/l y cefotaxima 200 mg/l (Fig. 7B). A partir del día 5 podían verse distintos focos de fluorescencia verde en el medio selectivo (Fig. 7C). Después de 4 semanas en medio R1, los sectores resistentes a la kanamicina se transfirieron de manera individual al medio R1 sólido suplementado con los mismos antibióticos. Mientras tanto, los callos cultivados en medio líquido se transfirieron al medio R1 sólido selectivo. Cada sector se examinó bajo microscopio de fluorescencia para detectar la fluorescencia de color verde en varios puntos temporales después del co-cultivo. Los embriones somáticos GFP positivos comenzaron a aparecer en aproximadamente un mes (Fig. 8). A los 3 meses después del co-cultivo, se encontró que hasta 38 sectores contenían embriones positivos para la fluorescencia de color verde en un solo co-cultivo. La cantidad de sectores positivos para GFP, pero que aún no producían embriones somáticos era varias veces 40 superior. Ambos tipos de soporte de co-cultivo dieron resultados satisfactorios, que se resumen en la Tabla 1.

1. Efectos de los diferentes soportes y medios de regeneración

Fecha	Tipo de soporte	Primer medio	Sector total 28/5/03	GFP+ 28/5/03	GFP+ 24/6/03	GFP+ 30/7/03	embriones + 30/7/03	GFP+ 30/8/03	embriones + 30/8/03
S4G020503-11	HybondN	placa R1 ¹	120	2	8	14	0	11	1
S4G020503-12	HybondN	placa R1	160	32	69	61	6	52	20
S4G020503-13	Whatman 4	placa R1	180	23	63	72	13	69	38
S4G020503-14	Whatman 4	placa R1	100	7	19	28	4	18	10
S4G020503-1	HybondN	balsa R1 ²	100	6	39	41	7	36	11
S4G020503-2	HybondN	balsa R1	140	21	114	118	14	94	31
S4G020503-3	Whatman 4	balsa R1	140	9	39	40	7	33	14
S4G020503-4	Whatman 4	balsa R1	135	5	8	7	0	8	1
S5G020503-11	HybondN	placa R1	100	16	72	76	23	61	26
SSG020503-12	HybonR1N	placa R1	180	31	152	143	29	115	37
S5G020503-13	Whatman 4	placa R1	155	27	108	105	12	88	27
S5G020503-14	Whatman 4	placa R1	160	47	135	108	16	97	34
S5G020503-4	Whatman 4	balsa R1	160	60	135	102	21	90	15

Nota: 1. Medio R1 sólido con kanamicina 100 mg/l, cefotaxima 200 mg/l.

2. Medio R1 líquido con kanamicina 100 mg/l, cefotaxima 200 mg/l. Cultivados en el sistema de cultivo líquido BRL de Gibco.

Ejemplo 11

Transformación de cultivos en suspensión con una construcción pPZP111-35S:GFP.

5 Se descongeló un tubo del cultivo AGL congelado que albergaba la construcción pPZP111-35S:GFP y se recogieron las células bacterianas por centrifugación. Los sedimentos bacterianos se resuspendieron en C1 (pH 5,7). Los cultivos en suspensión (S4, S5 y S16) se lavaron en el medio C1. Aproximadamente 0,5 ml de cultivos se mezclaron con 0,4 ml de suspensión de *Agrobacterium* y se co-cultivaron en las membranas de nylon sobre el medio CP1 (pH 5,7). Después del co-cultivo, se transfirieron los callos (sin lavado) al medio R1 suplementado con kanamicina 100 mg/l y cefotaxima 200 mg/l y se incubaron a 28 °C con ciclos de iluminación de 16 horas. Cada co-cultivo se separó en hasta 160 sectores, representando cada uno a un solo callo grande o a un pequeño grupo de microcallos. Como alternativa, el co-cultivo en conjunto se transfirió a una balsa de cultivo en LM1 suplementado con kanamicina 100 mg/l y cefotaxima 200 mg/l. Después de dos meses en medio selectivo R1, se transfirieron los sectores resistentes a la kanamicina a placas de R1 recién preparado complementado con ribósido de zeatina 1 mg/l con los mismos antibióticos y se siguió el cultivo durante 4,5 semanas. Los callos resistentes a la kanamicina se transfirieron al medio R2 suplementado con kanamicina 50 mg/l y cefotaxima 200 mg/l. Esto se repitió dos veces más en un medio R2 sin antibióticos, y los embriones grandes o callos verdes de crecimiento vigoroso, que podían aparecer en el primer cultivo en R2, se seleccionaron y se transfirieron a un medio R3. Los embriones podían germinar y desarrollar las raíces y las hojas verdaderas (Fig. 9A). Curiosamente, el tratamiento con zeatina permitió que muchos embriones anormales sin cotiledones e incluso tejidos verdes, tales como los que se muestran en la Fig. 9B, se desarrollaran formando brotes. A menudo, se desarrollaron múltiples brotes (Fig. 10). Las plántulas que habían desarrollado hojas verdaderas eran abundantes en 3-4 semanas y se cultivaron en medio R4 para el desarrollo adicional de hojas y raíces (Fig. 11). Las plántulas con 6-8 hojas se colocaron en macetas con tierra y a los aproximadamente 7-8 meses después del co-cultivo, las plantas comenzaron a florecer (Fig. 12). Aproximadamente el 77% de las plantas adultas fueron positivas para la fluorescencia de GFP (Fig. 13). Se pudieron producir hasta 26 plantas sanas a partir de un solo co-cultivo. De los 18 transformantes putativos analizados por análisis de transferencia Southern, 17 fueron positivos para el transgén de GFP (95%) y 7 contenía un transgén solo (39%). Los resultados detallados de la transformación se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Resumen de la transformación llevada a cabo el 23/5/03

Fecha	26/5/03	21/6/03	24/7/03 KanR	27/8/03 KanR	Familia		% de
Medio	Sectores	Sectores	Nº	GFP+	Nº	1ª plántula sana	Plantas GFP+
S4G230503-2	R1-K100C 120	R1-K100C 120	R1-ZK50C 41	R1-K50C 12	R1-K50C 11	R4	Tierra
S4G230503-3	120	120	16	7	6		
S5G230503-2	120	120	94	23	60	13/10/03	
S5G230503-3	120	120	68	27	66	15/9/03	
S16G230503-2	120	120	88	59	72	22/9/03	26/12/03
S16G230503-3	160	160	138	87	113	22/9/03	26/12/03
S16G230503-4	160	160	132	89	117	22/9/03	02/01/04
							89%
							69%
							72%

Nota: Todas las cifras representan los números de sectores. Familia sana indica los sectores que han desarrollado al menos una planta con flor normal.

R1-K100C: medio R1 con kanamicina 100 mg/l, cefotaxima 200 mg/l

R1-K50C: medio R1 con kanamicina 50 mg/l, cefotaxima 200 mg/l

R1-ZK50C: medio R1-K50C con ribósido de zeatina 1 mg/ml

Ejemplo 12

Efectos del pH en los medios de co-cultivo

Los stocks de *Agrobacterium* congelados preparados previamente se recogieron por centrifugación y se suspendieron en C1 con el pH ajustado a 5,2, 5,7, 5,9 y 6,2. Aproximadamente 0,2 mg de suspensión de masa celular se mezclaron con 0,4 ml de suspensión de *Agrobacterium* y se co-cultivaron sobre membranas de nylon encima del medio sólido correspondiente (CP1, pH 5,2 a 6,2). Bajo cada condición se llevaron a cabo tres series de co-cultivos. Se anotó el número de sectores que mostraban fluorescencia de GFP después de un cultivo de 2 meses en el medio selectivo R1. Se obtuvieron resultados significativamente mejores con un pH del medio superior a 5,2. En promedio, 71%, 81% y 83% de los sectores de callos fueron positivos para fluorescencia de GFP en C1 a pH 5,2, C1 a pH 5,7 y C1 a pH 6,2, respectivamente.

Ejemplo 13

Comparación de los procedimientos de co-cultivo

Para determinar los factores que contribuyeron a la alta eficiencia de transformación obtenida con los presentes procedimientos, se realizó la transformación de las suspensiones celulares utilizando el procedimiento esencialmente como se ha dado a conocer anteriormente (patente de EE.UU. N° 5.583.036). La preparación del ADN-T del donador y la cepa AGL1 que alberga pPZP111-35S:GFP, se realizó en medio LB. Las células bacterianas se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en medio MS suplementado con NAA 1 mg/l hasta 0,5 unidades DO600. Se mezclaron aproximadamente 0,2 g de cultivos en suspensión (S5 y S16) con 2 ml de cultivo de *Agrobacterium* fresco en un matraz cónico que se dejó a 28 °C durante dos horas para que las células de *Agrobacterium* se unieran a las células de la suspensión. Después de retirar el medio líquido, se añadieron 10 ml de medio MS suplementado con NAA 1 mg/l al matraz. Las células se cultivaron en una plataforma de agitación (100 rpm) durante 18 horas. Las células en suspensión se lavaron a continuación (dos veces) con medio MS y se colocaron en medio selectivo R1 en sectores. En un experimento paralelo, la misma cepa de *Agrobacterium* fue preparada en el momento, sin congelación como se describe en el Ejemplo 9. Los cultivos S5 y S16 se co-cultivaron como se describe en el Ejemplo 10. Después de 30 días de cultivo en el medio selectivo R1, se anotó el número de embriones somáticos. Mientras que aproximadamente el 64% (S5) y el 83% (S16) de los sectores de callos fueron positivos para la fluorescencia de GFP cuando el co-cultivo se realizó a través de este procedimiento, las tasas cayeron a sólo el 1% (S5) y el 13% (S16), respectivamente, cuando el co-cultivo se realizó en medio líquido en un matraz cónico con agitación (Fig. 14). También resulta evidente que el sector resistente a la kanamicina había crecido hasta tamaños significativamente mayores y con más embriones desarrollados usando un procedimiento de co-cultivo según la presente invención.

Ejemplo 14

Restauración de la fertilidad de las plantas transgénicas

Se obtuvieron plantas transgénicas auto-fértiles con los procedimientos dados a conocer en el presente documento, aunque se observaron algunos defectos en el desarrollo del polen (Fig. 15). Por consiguiente, la polinización manual puede ser preferible para producir semillas. La mayoría de las plantas de S16 resultaron fértiles cuando fueron polinizadas por el polen de las plantas derivadas de semillas (Fig. 15). Esto puede representar una ventaja, ya que con frecuencia se requiere retrocruzamiento para producir una variedad comercial.

Abreviaturas y términos usados en el presente documento:

40 **Sal MS** (Murashige y Skoog, 1962):

CaCl₂ 332,02 mg/l

KH₂PO₄ 170 mg/l

KNO₃ 1900 mg/l

MgSO₄ 180,54 mg/l

45 NaH₂PO₄ 128,4 mg/l

NH₄NO₃ 1650 mg/l

CoCl₂·6H₂O 0,025 mg/l

CuSO₄·5H₂O 0,025 mg/l

FeNaEDTA 36,7 mg/l

50 H₃BO₄ 6,20 mg/l

KI 0,83 mg/l

MnSO₄·H₂O 16,9 mg/l

Na₂MoO₄·2H₂O 0,25 mg/l

ZnSO₄·7H₂O 8,60 mg/l

5 **Vitaminas B5**

Mio-inositol 100 mg/l

Ácido nicotínico 1 mg/l

Piridoxina-HCl 1 mg/l

Tiamina-HCl 10 mg/l

10 **SGM:** sal MS en concentración media y vitaminas B5 en concentración media, NAA 0,02 mg/l, MET (trizazol multi-efecto) 0,1 mg/l, glucosa 5 g/l, fitogel 2 g/l, pH 6,0

SM1: sal MS, vitaminas B5, cinetina 0,1 mg/l, 2,4-D 0,05 mg/l, glucosa 30 g/l, fitogel 2 g/l, pH 6,2

SM2: sal MS, vitaminas B5, KNO₃ 1,9 g/l, glucosa 30 g/l; fitogel 2,5 g/l, pH 6,4

LM1: sal MS, vitaminas B5, KNO₃ 1,9 g/l, NAA 0,01 mg/l, glucosa 30 g/l, pH 6,4

15 **LM2:** sal MS sin NH₄NO₃, vitaminas B5, KNO₃ 1,9 g/l, NAA 0,01 mg/l, glucosa 30 g/l, glutamina 1 g/l, asparagina 0,5 g/l, pH 6,4

LM3: MS sal, vitaminas B5, NAA 0,05 mg/l, glucosa 30 g/l, pH 6,4

LM4: MS sal, vitaminas B5, NAA 0,01 mg/l, picloram 0,5 mg/l, glucosa 30 g/l, pH 6,4

C1

20 K₂HPO₄ 2,05 g/l

KH₂PO₄ 1,45 g/l

MgSO₄·7H₂O 0,6 g/l

(NH₄)₂SO₄ 0,5 g/l

NH₄NO₃ 0,5 g/l

25 CaCl₂ 0,01 g/l

Glucosa 2 g/l

ZnSO₄·7H₂O 0,5 mg/l

CuSO₄·5H₂O 0,5 mg/l

H₃BO₃ 0,5 mg/l

30 MnSO₄·H₂O 0,5 mg/l

Na₂B₄O₇·10H₂O 0,5 mg/l

FeSO₄ 1 mg/l

Vitaminas B5

NAA 0,01 mg/l

35 Picloram 0,5 mg/l

MES 40 mM

Glicerol al 0,5%

ES 2 384 876 T3

Acetosiringona 0-100 μ M

pH 5,7-6,0

CP1: C1, además de fitogel 4 g/l.

R1: sal MS, vitaminas B5, KNO_3 1,9 g/l, glucosa 30 g/l, pH 6,4, fitogel 2,8 g/l.

5 **R2:** sal MS sin NH_4NO_3 , vitaminas B5, KNO_3 1,9 g/l, glucosa 30 g/l, glutamina 1 g/l, asparagina 0,5 g/l, pH 6,4, fitogel 2,8 g/l

R3: MS, vitaminas B5, glucosa 30 g/l, NAA 0,01 mg/l, fitogel 3 g/l, pH 6,4

R4: MS en concentración media, vitaminas B5

MinAB

10 K_2HPO_4 2,05 g/l

KH_2PO_4 1,45 g/l

$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,6 g/l

NaCl 0,3 g/l

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5 g/l

15 NH_4NO_3 0,5 g/l

CaCl_2 0,01 g/l

Glucosa 2 g/l

$\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 mg/l

$\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,5 mg/l

20 H_3BO_3 0,5 mg/l

$\text{MnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,5 mg/l

$\text{MBO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,5 mg/l

FeSO_4 1 mg/l

pH 7,0

25 **IM**

K_2HPO_4 2,05 g/l

K_2HPO_4 1,45 g/l

$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,6 g/l

NaCl 0,3 g/l

30 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5 g/l

NH_4NO_3 0,5 g/l

CaCl_2 0,01 g/l

$\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 mg/l

$\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,5 mg/l

35 H_3BO_3 0,5 mg/l

$\text{MnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,5 mg/l

$\text{NaMbO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,5 mg/l

FeSO₄ 1 mg/l

Glicerol al 0,5%

Glucosa 2 g/l

Acetosiringona 100-200 µM

5 MES 40 mM

pH 5,7

BIBLIOGRAFÍA

- Ashby y col. (1988). *J. Bacteriol.* 170: 4181-4187.
- Bayley y col. (1992). *Theoretical and Applied Genetics* 83: 645-649.
- 10 Bolten y col. (1986). *Science* 232: 983-985.
- Bundock y col. (1995). *EMBO J.* 1995, 14:3206-3214.
- Chair, H. y col. (1997). *Kasetsart J.*, vol. 33, pp 149-156.
- Chen and Winans (1991). *J. Bacteriol.* 173: 1139-1144.
- Cousins, Y. L. y col. (1991). *Aust. J. Plant Physiol.* 18: 481-494.
- 15 Davidonis, G. H. and Hamilton, RH (1983). *Plant Sci. Lett.* 32: 89-93.
- de Groot y col. (1998). *Nat. Biotechnol.* , 16:839-842.
- Finer, J. (1988). *Plant Cell Rep.* 7: 399-402.
- Finer and McMullen (1990). *Plant Cell Reports*, i :586-589.
- Firoozabady y col. (1987). *Plant Molecular Biol.* 10: 105-116.
- 20 Fullner and Nester (1996), *J. Bacteriol.* 178: 1498-504.
- Hansen y col. (1994). *Proc. Nat'l Acad. Science* 91: 7603-7607.
- Hoshino y col. (1988). *Plant Biotech.* 15 (I). 29-33.
- Leeve y col. (1999). *Molecular Breeding*, 5: 429-440.
- McCabe and Martinell (1993). *Bio / Technology* 11: 596-598.
- 25 McLean (1994). *J. Biol. Chem.* 269: 2645-2651.
- Murashige and Skoog (1962). *Physiol. Plant*, 15: 473.
- Murray y col. (1993). *Transgenic Plants*, vol. 2, pp 153-168.
- Otani y col. (1998). *Plant Biotech*, vol. 15, pp 11-16.
- Owens y col. (1988). *Plant Physiol.* vol. 88, pp 570-573.
- 30 Piers y col. (1996). *PNAS*, 93: 1613-1618.
- Rogowsky y col. (1987). *J. Bacteriol.* 169: 5101-5112.
- Sagare y col. (2000). *Plant Sci.* 160:139-147.
- Scheeren-Groot y col. (1994). *J. Bacteriol.* 176: 6418-6246.
- Sheikholeslam and Weeks (1987). *Plant Mol. Biol.*, Vol. 8, pp 291-298.
- 35 Schilperoort, R. A. y col. (1990). Process for the incorporation of foreign DNA into the genome of dicotyledonous plants. Patente de EE.UU. N° 4.940.838.

Schilperoort, R.A. y col. (1995). Process for the incorporation of foreign DNA into the genome of dicotyledonous plants. Patente de EE.UU. N° 5.464.763.

Stachel y col. (1985). *Nature*. 318: 624-629.

Still y col. (1976). *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, vol. 101, pp. 34-37.

5 Tokuji and Kuriyama (2003). *J. Plant Phvsiol*. 160: 133-141.

Trolinder, N. L. and Goodin, J. E. (1987). *Plant Cell Reports* 6: 231-234.

Umbeck y col. (1987). *Bio/Technology* 5: 263-266.

Veluthambi y col. (1989). *J. Bacteriol*. 171: 3696-3703.

Vernade y col. (1988). *J. Bacteriol* 170: 5822-5829.

10 Walkerpeach, C. R and Velten, J. (1994). *Plant Mol. Biol. Manual*, B1: 1-19.

Xing, D. y col. (1999). *Chin. J. Biotechnol*. 15: 59-64.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para producir una planta transgénica de algodón, comprendiendo dicho procedimiento:
 - (a) proporcionar una célula proembriogénica de algodón;
 - (b) cultivar la célula proembriogénica en un medio líquido para producir un cultivo de células en suspensión;
 - 5 (c) proporcionar un cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* que alberga un vector que comprende un gen exógeno y un marcador seleccionable, siendo el *Agrobacterium* capaz de efectuar la transferencia estable del gen exógeno y el marcador seleccionable al genoma de una célula vegetal, en el que el *Agrobacterium* tiene una virulencia pre-inducida;
 - (d) co-cultivar una mezcla del cultivo de la suspensión celular y el cultivo de *Agrobacterium* sobre un soporte sólido poroso bajo una luz continua, generando de este modo una población de células, algunas de las cuales han sido transformadas con el gen exógeno y el marcador seleccionable;
 - 10 (e) seleccionar las células que expresan el gen exógeno de la población de células; y
 - (f) regenerar las células seleccionadas en una planta transgénica de algodón.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la célula proembriogénica deriva de un callo.
- 15 3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho soporte sólido se selecciona del grupo que consiste en una membrana y un filtro.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el soporte sólido poroso comprende al menos uno de los siguientes: nylon, nitrocelulosa, celulosa y fibras de vidrio.
- 20 5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el algodón es un miembro seleccionado del grupo que consiste en *Gossypium hirsutum* y *Gossypium barbadense*.
6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el *Agrobacterium* es preinducido por medio del cultivo del *Agrobacterium* en presencia de un agente inductor de la virulencia.
7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el *Agrobacterium* es preinducido por medio del cultivo del *Agrobacterium* que expresa de manera constitutiva un mutante de *virA* activo.
- 25 8. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que la célula proembriogénica de algodón se obtiene al:
 - esterilizar una semilla de algodón;
 - germinar la semilla de algodón para generar el tejido de la planta;
 - obtener un explante a partir del tejido de la planta;
 - inducir la formación de callos a partir del explante; y
 - 30 generar tejido proembriogénico a partir del callo.
9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que el tejido proembriogénico se genera a partir del callo mediante la iniciación de la embriogénesis somática del callo en un medio sólido.
10. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que el tejido proembriogénico se genera a partir del callo mediante la inducción de la diferenciación del callo.
- 35 11. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que el tejido de la planta es una raíz o un ápice de un brote.
12. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el soporte sólido está en contacto con el medio de co-cultivo por el enjuague del soporte sólido en un medio líquido de co-cultivo.
13. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el soporte sólido está en contacto con el medio de co-cultivo por estar colocado encima de un medio de co-cultivo sólido.
- 40 14. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el medio de co-cultivo de la etapa (d) comprende sales MinAB, vitaminas B5, glicerol y glucosa.
15. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el medio de co-cultivo de la etapa (d) comprende sales MS, vitaminas B5, glucosa y glicerol.

16. El procedimiento de la reivindicación 14 o 15, en el que el medio de co-cultivo está suplementado además con acetosiringona 10-200 μ M.
17. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la mezcla del cultivo de la suspensión celular y el cultivo de *Agrobacterium* se mezclan juntos y a continuación se co-transfieren sobre el soporte sólido poroso.
- 5 18. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la mezcla del cultivo de la suspensión celular y el cultivo de *Agrobacterium* se co-cultivan durante 1 a 5 días bajo una luz continua.
19. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las células seleccionadas se regeneran dando una planta transgénica de algodón por embriogénesis somática.

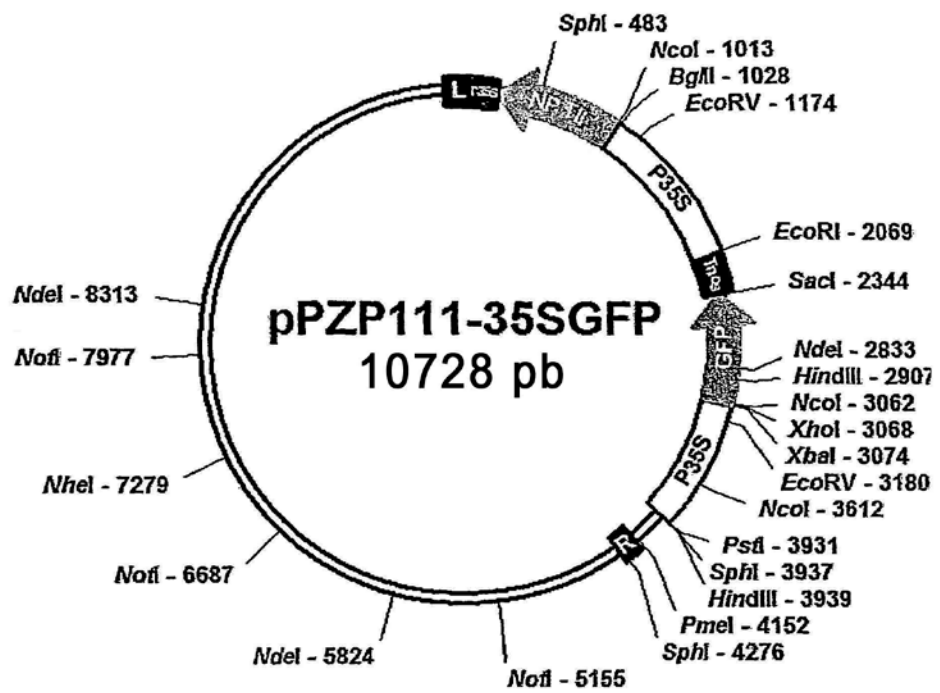


FIGURA 1

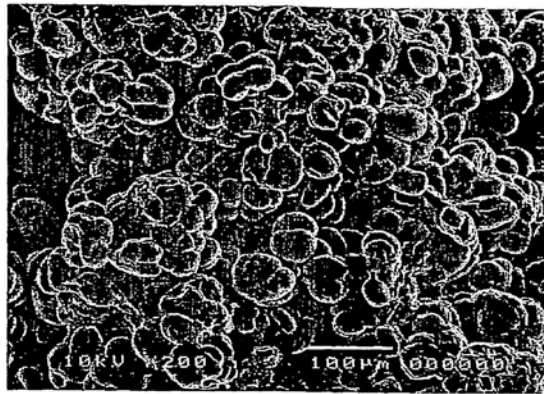


FIGURA 2

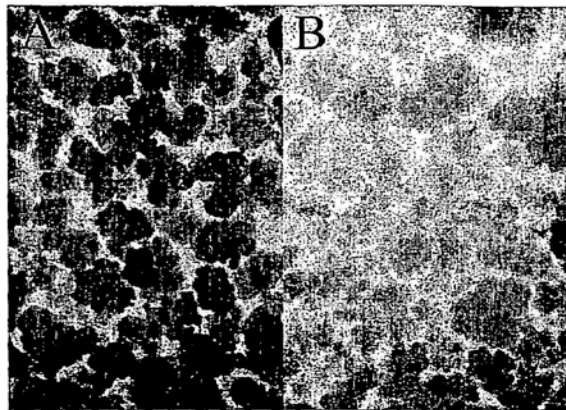


FIGURA 3

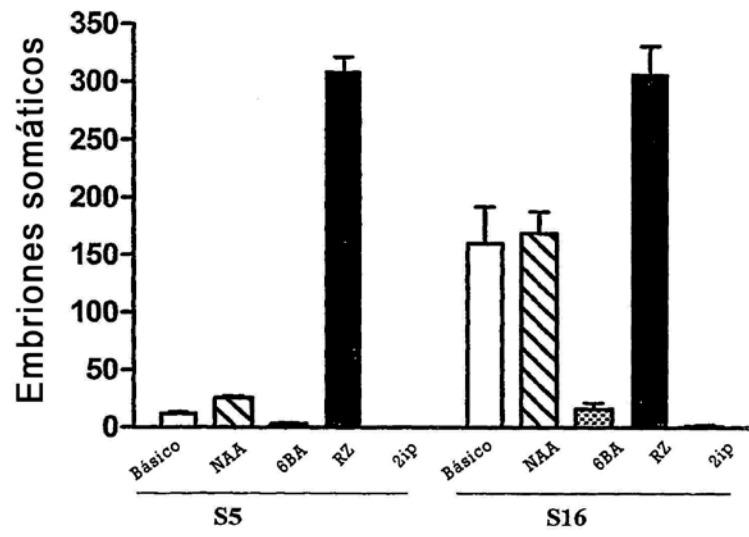


FIGURA 4

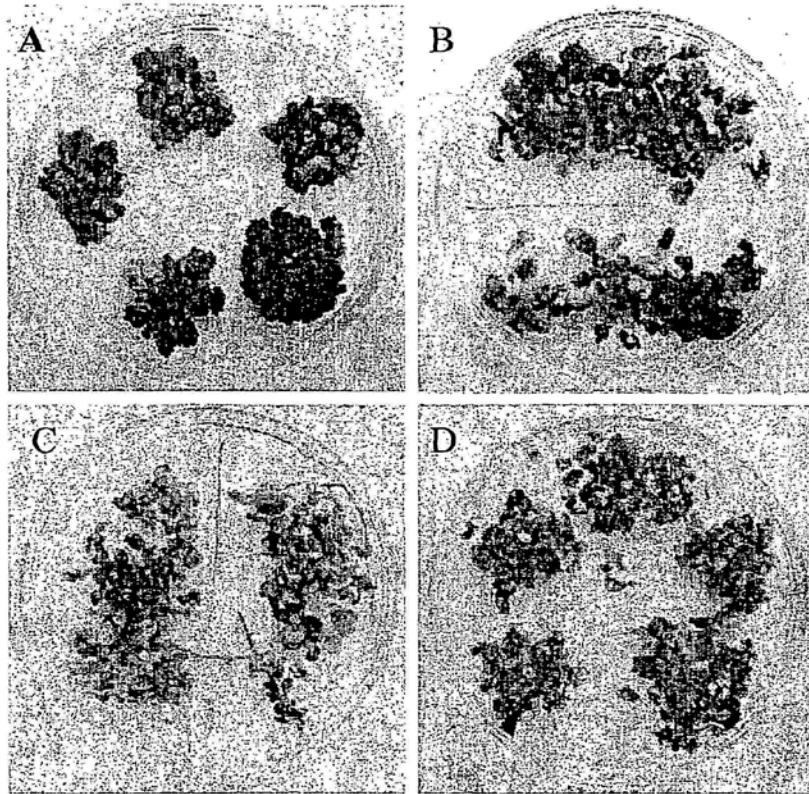


FIGURA 5

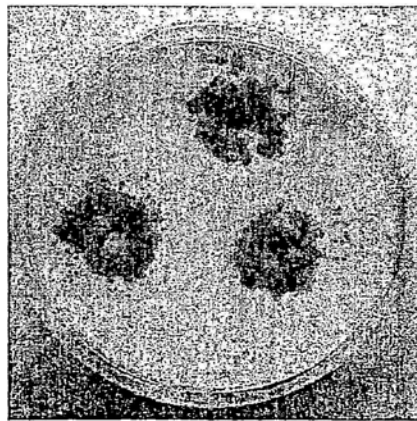


FIGURA 6

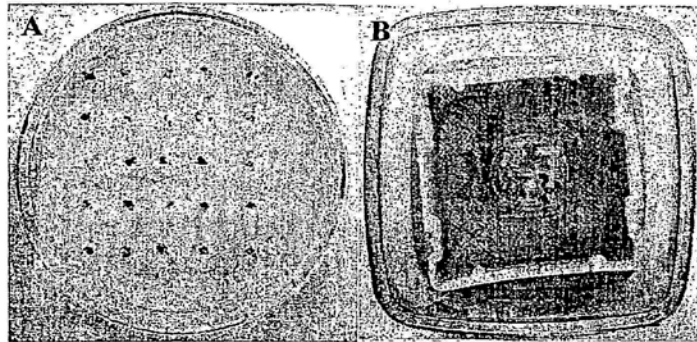


FIGURA 7

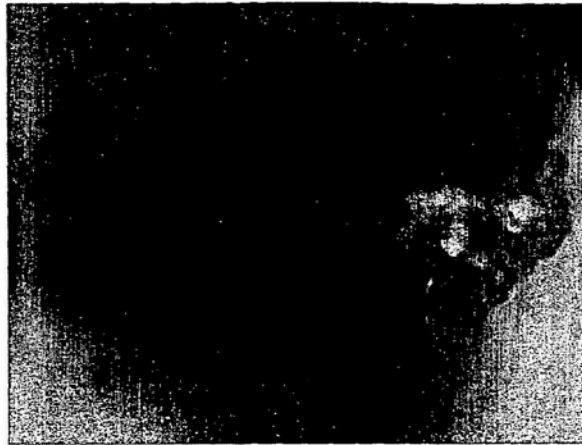


FIGURA 7C

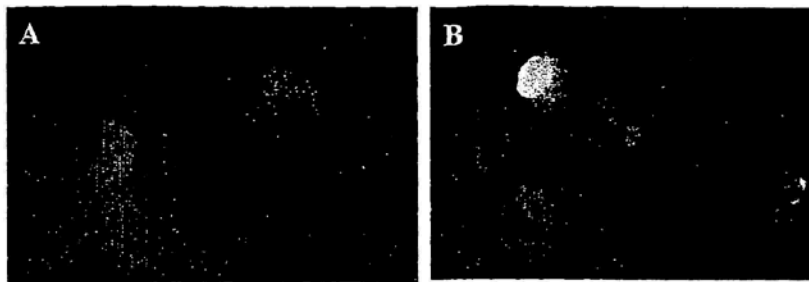


FIGURA 8

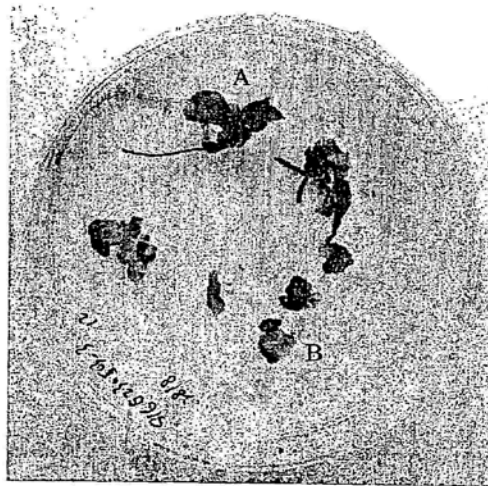


FIGURA 9



FIGURA 10



FIGURA 11



FIGURA 12



FIGURA 13

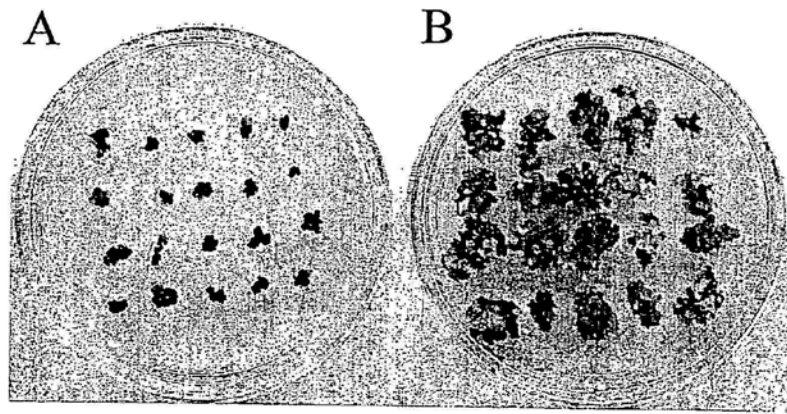


FIGURA 14

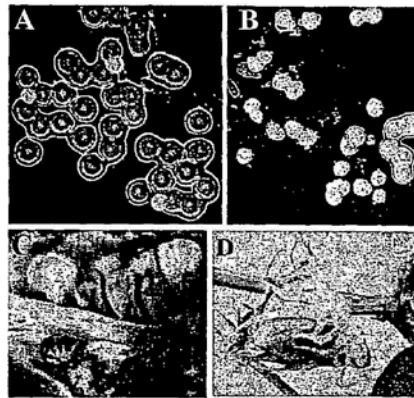


FIGURA 15