

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 907**

51 Int. Cl.:

A01H 5/00 (2006.01)

A01H 1/00 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08840950 .3**

96 Fecha de presentación: **24.10.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2211604**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.08.2010**

54 Título: **Transformación y regeneración de plantas Allium**

30 Prioridad:

24.10.2007 NZ 56278107

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

14.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

14.12.2012

73 Titular/es:

**THE NEW ZEALAND INSTITUTE FOR PLANT AND
FOOD RESEARCH LIMITED (100.0%)**

MT ALBERT RESEARCH CENTRE 120 MT

ALBERT ROAD

MT ALBERT, AUCKLAND, NZ

72 Inventor/es:

EADY, COLIN CHARLES;

KENEL, FERNAND OTHMAR y

BRINCH, SHEREE ALMA

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 392 907 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

Transformación y regeneración de plantas *Allium*

Campo de la invención

La invención se refiere a un método de transformación de plantas de la familia *Allium* y a las plantas transformadas.

5 Antecedentes de la invención

Existen pocos protocolos publicados para la transformación y regeneración de especies de *Allium*. Las especies de cosecha de *Allium* son probablemente las especias vegetales más importantes económicamente para las cuales la tecnología de transformación es todavía difícil. Para otras cosechas de hortalizas importantes, se han producido sistemas de transformación eficientes.

10 Inicialmente, se creía que muchas monocotiledóneas no eran susceptibles de transformación mediada por *Agrobacterium*. El desarrollo de técnicas de transferencia directa de genes condujo pronto a que el bombardeo fuese el método preferido de transformación de monocotiledóneas. Sin embargo, la transferencia directa de genes no carece de problemas. A menudo, se han observado frecuencias de transformación bajas y una frecuencia elevada de patrones de integración anormales en plantas transgénicas. Recientemente, la transformación de monocotiledóneas mediada por *Agrobacterium* ha ganado favor y muchas especies de monocotiledóneas (con inclusión de arroz, trigo, cebada, 15 maíz y caña de azúcar) han sido transformadas ya utilizando este método. Un componente fundamental en el éxito de estos sistemas ha sido el uso de tipos de tejido predominantemente embriogénicos, y protocolos de selección precisos posteriores a la transformación.

20 Recientemente, Haseloff (1997) ha modificado el gen *gfp* para mejorar su uso como gen marcador transgénico en sistemas de plantas viables. La proteína verde fluorescente (GFP) hace posible que los investigadores sigan con precisión el destino de cualesquiera células que expresen este gen y optimicen así la supervivencia de las células posterior a la transformación. Un sistema de este tipo ha sido útil en el desarrollo del protocolo de transformación de *Allium* consignado en esta memoria.

25 Como monocotiledóneas, las especies de *Allium* estaban predisuestas a ser reacias a la transformación. Las cebollas (*Allium cepa* L) son una cosecha con exigencias ambientales diversas. Por esta razón, han sido relativamente poco estudiadas con respecto a la aplicación de biotecnología. Existe sólo un pequeño número de informes de suministro de DNA a plantas *Allium* (Klein 1987; Dommissse et al. 1990; Eady et al. 1996; Barandiaran et al. 1998). Tres investigadores utilizaron transferencia directa de genes, mientras que Dommissse et al (1990) demostraron que puede ser posible la transformación mediada por *Agrobacterium*. Algunos informes de protocolos de regeneración para 30 *Alliums* que son apropiados para estudios de transformación han sido publicados (Hong y Deberg 1995; Xue et al. 1997; Eady et al. 1998; Saker 1998). Existe sólo un informe acerca del desarrollo de agentes selectivos potenciales para el uso en transformación de *Allium* (Eady y Lister 1998a).

35 Más recientemente, US 7.112.720 describe un método de transformación de plantas de cebolla utilizando transformación mediada por *Agrobacterium* y empleando embriones inmaduros como la fuente de explante. Desde entonces, se han publicado varios informes adicionales de transformación de cebolla (Zheng et al. 2001b; Bastar et al. 2003; Aswath et al. 2006), puerro (Eady et al. 2005) y ajo (Kondo et al. 2000; Eady et al. 2005). Sin embargo, todos estos informes son ineficientes y están basados en el uso de embriones inmaduros (v.g. todas las transformaciones previas de Eady et al) o el uso de tejido floral (Bastar et al. 2003) o callo derivado de tejido radicular de plantas jóvenes (Aswath et al. 2006) o callo de embriones cigóticos maduros (Zheng et al. 2001), o callo derivado de primordios 40 de brotes meristemáticos (Kondo et al. 2000). Ninguno de los protocolos desarrollados hasta ahora ha utilizado regeneración directa de tejido de hojas inmaduras como se reseña en esta invención.

Hasta la fecha, no ha sido utilizado o considerado viable tejido de hoja como fuente viable de tejido para transformación de *Allium*. El tejido de hoja no ha sido investigado o considerado como un material de partida útil debido a dificultades en la obtención de una transformación satisfactoria del tejido de hoja. Adicionalmente, las células de las 45 hojas de monocotiledóneas son notoriamente reacias a la regeneración, al contrario que el tejido de hoja de dicotiledóneas que se regenera a menudo muy fácilmente. No existe informe alguno acerca de la regeneración eficaz directa de tejido de hoja de *Allium* aislado y sólo la regeneración con baja frecuencia de escamas gemelas, en las cuales un pequeño número de células en el lado abaxial de la hoja superior de la escama gemela se regenera (revisado por Eady 1995, actualizado en Eady y Hunger 2008). Ha aparecido recientemente un informe acerca de la regeneración 50 de hojas de ajo por embriogénesis de callo y somática (Fereol et al. 2002). La identificación en este trabajo de tipos de células de hojas inmaduras 'plásticas' procedentes de la base de la hoja de especies de *Allium* y su uso para transformación y regeneración es un descubrimiento inesperado y nuevo que puede mejorar notablemente la aplicación de biotecnología a las especies de *Allium* de cosecha.

Objeto de la invención

55 Es un objeto de la invención proporcionar un método de transformación de plantas *Allium* o proporcionar al menos al público una elección útil.

Sumario de la invención

La invención proporciona un método de transformación de plantas del género *Allium* que comprende inocular un tejido de hoja de una especie de *Allium* con una cepa de *Agrobacterium tumefaciens* que contiene un vector o plásmido adecuado y regenerar luego selectivamente las células de *Allium* que han integrado la secuencia de DNA.

5 Específicamente, la presente invención proporciona un método de transformación de células de una especie de planta *Allium* con un polinucleótido de interés que comprende los pasos de:

(i) aislar una sección de hoja de la planta *Allium* a transformar;

(ii) co-cultivar la sección de hoja con *Agrobacterium* que contiene uno o más vectores adecuados que comprenden el polinucleótido de interés durante un periodo de tiempo suficiente para conseguir la transferencia de la secuencia de polinucleótidos de interés a una o más células de las hojas de la planta; y

(iii) transferir la sección de hoja a un medio de selección que permite la selección de células de la planta *Allium* transformadas.

Las piezas de hoja se transforman preferiblemente con un vector binario. Más preferiblemente, las piezas de hoja de una especie de *Allium* se inoculan antes de su diferenciación en cultivos de tejido. Sin embargo, los trozos de hoja de una especie de *Allium* pueden inocularse inmediatamente después de su aislamiento. Preferiblemente se utilizan piezas de hojas inmaduras. Adicionalmente, el medio de selección incluye un agente para destruir selectivamente el *Agrobacterium*.

El método de acuerdo con la presente invención es adecuado para uso con cualquier planta *Allium*. Más específicamente la planta *Allium* es una cualquiera de *Allium cepa*, *Allium fistulosum* o *Allium ampeloprasum*, *Allium ascalonicum*, *Allium schoenoprasum* o *Allium sativum*.

Las células de *Allium* transformadas pueden citarse también para generar plantas enteras. Por consiguiente, el método de la presente invención puede comprender también el paso de regeneración de una planta a partir de las células transformadas.

De acuerdo con otro aspecto, la invención proporciona una planta *Allium* transformada por el método de acuerdo con el método de la presente invención. La planta *Allium* puede transformarse con un polinucleótido de interés que confiere una ventaja agronómica. Por ejemplo: resistencia a herbicidas, tales como glifosato y/o fosfotricina; resistencia a enfermedades fúngicas, tales como la pudrición blanca de *Allium*; resistencia a enfermedades víricas, tales como el Virus del Moteado Amarillo del Lirio o los virus responsables de la enfermedad del mosaico del ajo; resistencia a enfermedades bacterianas; resistencia a plagas de insectos tales como la cresa de la cebolla y/o los triptidos.

Alternativamente, la planta *Allium* puede transformarse con un polinucleótido de interés que confiere una modificación del camino del espigado y la floración. Por ejemplo, el nivel, el reconocimiento o la actividad del agente hormonal de la floración. Alternativamente, la planta *Allium* puede transformarse con un polinucleótido de interés que confiere una ventaja de rasgo de calidad. Por ejemplo, la sobreexpresión o silenciación de genes del camino de la coloración o sus reguladores. O bien, el polinucleótido de interés confiere sobreexpresión o silenciación de los genes del camino del azufre o sus reguladores, por ejemplo la silenciación del gen *lfs* por el uso de secuencias de RNAi de *lfs*; o la sobreexpresión o silenciación de genes del camino de los carbohidratos o sus reguladores, por ejemplo el gen *sst1* o secuencias de RNAi de *sst1*.

Breve descripción de los dibujos

40 La invención se describirá a continuación a modo de ejemplo únicamente y con referencia a los dibujos siguientes, en los cuales:

La Figura 1 es un análisis PCR para el gen *gfp* en ajo transgénico en el invernadero (Labbook ref. 110967). Muestras: 1(Blanco), 2-10 (0629 16 C), 11-14 (0629 21 B), 15 (0630 6 A), 16 (0631 5 G), 17 -18 (0631 8 B), 19-41 (0631 11 E), 42-43 (0631 17. F), 44-45 (0631 18 B), 46 (0631 18 Q), 47-50 (0631 19 A), 51 Ajo No Transgénico, 52 plásmido pART27H mGFP5-ER. (Los números que figuran entre paréntesis se refieren a sucesos separados transgénicos de ajo).

Condiciones de la PCR: cebadores GFPa y b 0,5 μ M, Mg^{2+} 2 mM, 40 ciclos (94°C, 1 min, 60°C, 1 min, 72°C, 1 min). Secuencias de los cebadores (GFPa: ACGTCTCGAGCTCTTAAAGCTCATCATG) (GFPb: ACGTCTCGAGGATCCAAGGAGATATAACA).

50 La Figura 2 muestra los resultados del sondeo por transferencia Southern para el gen *gfp* en plantas transgénicas de *Allium sativum* transformadas con pART27H-mgfp-ER. En la Figura 2a: pista 1: 0630 6(A); pista 2: 0631 2(C); pista 3: 0631 2(G); pista 4: 0631 5(A); pista 5: 0631 8(A); pista 6: 0631 8(B); pista 7: 0631 8(1); pista 8: 0631 8(M); pista 9: 0631 11(B); pista 10: 0631 11(E); pista 11: 0631 17(B); pista 12: 0631 17(1); pista 13: 0631 17(N); pista 14:

063118(B); pista 15: control de ajo no transgénico. En la Figura 2b, pista 1: 0631 18(F); pista 2: 0631 18(1); pista 3: 0631 18(K); pista 4: 0631 18(Q); pista 5: 0631 20(A); pista 6: 0631 20(E); pista 7: 0631 20(F); pista 8: 0631 21(B); pista 9: 0631 22(B); pista 10: 0631 23(A); pista 11: 0631 24(B); pista 12: control de ajo no transgénico.

5 La Figura 3 es una hoja inmadura interior de cebolla (*A. cepa*) una semana después del cocultivo que muestra la expresión de GFP.

La Figura 4 es una hoja inmadura externa de cebolla (*A. cepa*), 11 días después del cocultivo, mostrando la expresión de GFP multicelular.

La Figura 5 es un cultivo nodular de cebolla (*A. cepa*) 13 semanas después del cocultivo, mostrando la expresión de GFP.

10 La Figura 6 es un cultivo de regeneración de cebolla (*A. cepa*) de un tejido de hoja inmadura transformado, 4 meses después del cocultivo, mostrando la expresión de GFP.

La Figura 7 es un cultivo nodular formado a partir de hojas inmaduras de cebolla (*A. cepa*).

15 La Figura 8 muestra la regeneración de brotes de hojas inmaduras de cebolla (*A. cepa*) cultivados en un medio P5 modificado que contenía 4-FPA en medio P5 modificado que contenía 4-FPA, un mes después de la transferencia al medio de regeneración SM4.

La Figura 9 es una hoja inmadura de cebolleta (*A. fistulosum*) que exhibe la expresión de GFP 12 días después del cocultivo.

La Figura 10 es una hoja inmadura de cebolleta (*A. fistulosum*) que exhibe el tejido GFP multicelular 21 días después del cocultivo.

20 La Figura 11 es un cultivo nodular con estructuras embriogénicas que se forman a partir de hojas inmaduras de cebolleta (*A. fistulosum*) después de 12 semanas de cultivo en un medio P5 modificado que contiene 4-FPA y BA.

La Figura 12 es un brote de regeneración procedente de una hoja inmadura de cebolleta (*A. fistulosum*) cultivado en un medio P5 modificado que contiene 4-FPA, 4 días después de la transferencia a medio de regeneración SM4.

La Figura 13 es una hoja de puerro que exhibe la expresión de GFP 8 días después del cocultivo.

25 En la Figura 14, Fig. 14A muestra cultivos embriogénicos nodulares de puerro procedentes de una transformación de hojas inmaduras que muestran estructuras embrionarias inmaduras de GFP. Fig. 14B muestra cultivos de brotes de puerro que se regeneran a partir de cultivos de hojas inmaduras 1 mes después de la transferencia a medio SM4.

30 La Figura 15 es un tejido de hoja de ajo 10 días (panel superior izquierdo), 3 semanas (panel superior derecho) y 2 meses (panel inferior izquierdo) después de cocultivo con *Agrobacterium* que contiene el vector binario pArt27 m-gfp-ER.

La Figura 16 muestra la regeneración de plantas de ajo que contienen el gen informador gfp. Fotografía iluminada superior izquierda del cultivo de brotes. Fotografía superior derecha bajo excitación con luz azul muestra la fluorescencia verde. Abajo, material compuesto de planta de ajo entera bajo excitación con luz azul que muestra la fluorescencia verde indicativa de la integración y expresión del gen informador gfp.

35 La Figura 17 muestra la transformación de ajo con genes de resistencia fúngica. La Figura 17a muestra el constructo de T-DNA transformado en ajo utilizando el sistema de transformación de hojas inmaduras para conferir expresión de genes informadores, resistencia a antibióticos y actividad de oxalato-oxidasa a fin de conferir resistencia a ciertos patógenos fúngicos. La Figura 17b muestra las plantas de ajo transformadas regeneradas, que se han regenerado a partir de tejido de hoja transformado. La Figura 17c muestra la expresión de GFP en el tejido de planta regenerado.

40 La Figura 17d muestra el análisis histoquímico de la actividad de oxalato-oxidasa en ajo transgénico. La tinción negra indica actividad enzimática (tinte absorbido por el sitio de corte de la hoja; por tanto, no todo el tejido se ha teñido). La Figura 17e muestra el análisis molecular de la integración del transgén de oxalato-oxidasa en el ajo. Las pistas 1-7 de la izquierda muestran la región del transgén informador gfp amplificada en 4 líneas de ajos transgénicos. Las pistas 8-15 de la derecha muestran la región del transgén selector de higromicina amplificada en 4 pistas de ajo transgénico. Pistas 1 y 9, control de plásmido positivo. Pistas 2 y 10 DNA genómico de *Allium* (control negativo). Pistas 3-6 y 11-14, DNA de plantas transgénicas de ajo 0818 1E, 7b, 0819 5a, y 0821 6d respectivamente. Pistas 0, 7, 8, y 15 DNA marcador. Los fragmentos amplificados para el gen gfp son un fragmento de 833 pares de bases, y uno de 1100 pares de bases para el fragmento del gen de higromicina.

50 La Figura 18 muestra la transformación de ajo con genes de resistencia viral. La Figura 18a muestra el constructo de T-DNA transformado en ajo utilizando el sistema de transformación de hojas inmaduras para conferir expresión del gen informador, resistencia a antibióticos y resistencia a los potivirus OYDV y LYSV a fin de conferir tolerancia a la Enfermedad del Mosaico del Ajo. La Figura 18b muestra plantas transgénicas de ajo procedentes de transformación

de hojas inmaduras utilizando el constructo T-DNA en la Figura 18a desarrollado en un invernadero PC2 después de selección sobre el antibiótico higromicina. La Figura 18c muestra el análisis PCR de 6 líneas (0714 #2B, #2C, #2A, #3A, #10B y 0713 #21 C) regeneradas a partir de transformación de hojas inmaduras utilizando el constructo de T-DNA reseñado en la Figura 18a. El gel superior muestra los productos de amplificación para un fragmento del gen gfp de 833 pares de bases, el segundo gel muestra los productos de amplificación para un fragmento del gen de higromicina de 1100 pares de bases. El tercer gel muestra los productos de amplificación para un fragmento de sentido de 993 pares de bases del constructo de RNAi, y el cuarto gel muestra los productos de amplificación para un intrón y fragmento antisentido de 1268 pares de bases del constructo de RNAi. Se recuperaron 3 líneas 0714 #2C, #3A y #10B y se muestra que contienen todos los componentes del constructo de T-DNA.

10 Definiciones

Antes de describir las realizaciones de la invención en detalle, será útil proporcionar algunas definiciones de términos utilizados en esta memoria.

El término "expresión" incluye la producción de polinucleótidos y polipéptidos, en particular, la producción de RNA (v.g., mRNA) a partir de un gen o porción de un gen, e incluye la producción de una proteína codificada por un RNA o gen o porción de un gen así como la aparición de un material detectable asociado con la expresión. Por ejemplo, la formación de un complejo, por ejemplo, de una interacción proteína-proteína, interacción proteína-nucleótido, o análoga, se incluye dentro del alcance del término "expresión". Otro ejemplo es la fijación de un ligando fijador, tal como una sonda de hibridación o anticuerpo, a un gen u otro oligonucleótido, una proteína o un fragmento de proteína y la visualización del ligando de fijación. Así pues, la intensidad incrementada de un punto en una microrred, o una transferencia hibridación tal como una transferencia Northern, o en una inmunotransferencia tal como transferencia Western, o en una red de cuentas, o por análisis PCR, se incluye dentro del término "expresión" de la molécula biológica subyacente.

El término "aislado" hace referencia a algo que se ha separado de su ambiente natural.

El término "oligonucleótido" se refiere a un polinucleótido, típicamente una sonda o cebador que incluye, sin limitación, desoxirribonucleótidos monocatenarios, ribonucleótidos mono- o bicatenarios, híbridos RNA:DNA, y DNAs bicatenarios. Los oligonucleótidos, tales como oligonucleótidos sonda de DNA monocatenario, se sintetizan a menudo por métodos químicos, por ejemplo utilizando sintetizadores automáticos de oligonucleótidos que están disponibles comercialmente o por una diversidad de otros métodos, con inclusión de sistemas de expresión *in vitro*, técnicas recombinantes, y expresión en células y organismos.

El término "planta" hace referencia a cualquier planta entera, o cualquier parte de la misma, con inclusión de células, semillas y cualquier órgano de planta, tal como raíces, hojas, tallos y análogos, o cualquier progenie de los mismos. El mismo incluye también tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas, y en particular incluye cualquier planta del género *Allium*.

El término "polinucleótido", cuando se utiliza en singular o plural, hace referencia en general a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser RNA o DNA no modificado o RNA o DNA modificado. Esto incluye, sin limitación, DNA mono- y bicatenario, DNA con inclusión de regiones mono- y bicatenarias, RNA mono- y bicatenario, y RNA con inclusión de regiones mono- y bicatenarias, moléculas híbridas que comprenden DNA y RNA que pueden ser monocatenarias o, más típicamente, bicatenarias o incluyen regiones mono- y bicatenarias. Se incluyen también regiones tricatenarias que comprenden RNA o DNA o a la vez RNA y DNA. Se incluyen específicamente mRNAs, cDNAs, y DNAs genómicos. El término incluye DNAs y RNAs que contienen una o más bases modificadas, tal como bases tritriadas, o bases inusuales, tales como inosina. Los polinucleótidos de la invención pueden abarcar secuencias codificantes o no codificantes, o secuencias sentido o antisentido.

"Polipéptido" como se indica en esta memoria, hace referencia a un oligopéptido, péptido, o secuencia de proteína, o fragmento de la misma, y a moléculas existentes naturalmente, recombinantes, sintéticas o semisintéticas. En los casos en que se cita en esta memoria el término "polipéptido" para hacer referencia a una secuencia de aminoácidos o una molécula de proteína existente naturalmente, no debe entenderse que "polipéptido" y términos análogos limitan la secuencia de aminoácidos a la secuencia completa nativa de aminoácidos para la molécula de longitud total. Se comprenderá que cada referencia a un "polipéptido" o términos análogos en esta memoria incluirá la secuencia de longitud total, así como cualesquiera fragmentos, derivados o variantes de la misma.

El término "transformación" hace referencia a la técnica de transferir material polinucleotídico extraño a una célula. El polinucleótido se incorpora generalmente en el genoma hospedador dando como resultado herencia genética estable del polinucleótido extraño. Se hace referencia a las células u organismos que contienen el polinucleótido extraño como "transformadas" o "transgénicas" o "recombinantes".

El término "vector" hace referencia a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido, particularmente de una célula a otra. Un tipo de vector es un episoma, es decir, un ácido nucleico capaz de replicación extra-cromosómica. Otro tipo de vector es un vector integrador que está diseñado para recombinarse con el material genético de una célula hospedadora. Los vectores pueden ser a la vez de replicación

autónoma e integradores, y las propiedades de un vector pueden diferir dependiendo del contexto celular (es decir, un vector puede ser de replicación autónoma en un tipo de célula hospedadora y puramente integrador en otro tipo de célula hospedadora). Los vectores capaces de dirigir la expresión de ácido nucleico expresables a los que están unidos operativamente se designan en esta memoria como "vectores de expresión".

- 5 La práctica de la presente invención empleará, a no ser que se indique otra cosa, técnicas convencionales de biología molecular y biología vegetal (con inclusión de técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, y bioquímica, que están dentro de la experiencia en la técnica. Tales técnicas se explican detalladamente en la bibliografía, tales como Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, Sambrook et al., 1989; Oligonucleotide Synthesis, MJ Gait, ed., 1984; Animal Cell Culture, R.I. Freshney, ed., 1987; Methods in Enzymology; Academic Press; Inc.;
- 10 Handbook of Experimental Immunology, 4ª edición, D.M. Weir & C.C. Blackwell, eds., Blackwell Science Inc. 1987; Gene Transfer Vectors Mammalian Cells, J.M. Miller & M.P. Calos, eds., 1987; Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel et al., eds., 1987; y PCR: The Polymerase Chain Reaction, Mullis et al., eds., 1994; Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1982); Sambrook y Russell, Molecular Cloning: A Laboratory manual, 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York
- 15 (2001); Ausubel et al, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Nueva York (1992); Methods in Plant Molecular Biology, Maliga et al, Eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1995); Arabidopsis, Meyerowitz et al, Eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press; Nueva York (1994); Arabidopsis protocols, J. M. Martínez-Zapater y J. Salinas, Eds., Human Press, Totowa, N.J., USA (2001), y las diversas referencias citadas en dichos lugares.

20 Descripción detallada de la invención

La invención proporciona un método de transformación estable en plantas del género *Allium*. Más específicamente, la invención proporciona un método de transformación directa de material de hojas de plantas del género *Allium*. Las plantas *Allium* han sido típicamente difíciles de transformar y hasta la fecha nadie ha sido capaz de transformar directamente con éxito material de hojas de plantas *Allium*. Sorprendentemente, se ha encontrado que el tejido de

25 las plantas *Allium* puede ser transformado directamente utilizando transformación mediada por *Agrobacterium*, y las células transformadas pueden utilizarse a su vez para regenerar plantas *Allium* transformadas.

El primer paso del método de acuerdo con la presente invención consiste en preparar una sección de hoja de una parte de *Allium*. Podría utilizarse cualquier sección de material de hoja; sin embargo, preferiblemente el material de hoja se obtiene de secciones de hojas inmaduras y más preferiblemente a partir de las hojas internas más próximas a la placa basal (aproximadamente un tejido de hoja de 1,5 cm³ de la base central) de sección de hojas inmaduras

30 obtenido de una planta *Allium* preferiblemente después de la etapa dormiente del ciclo vital.

Las secciones de hoja se preparan luego para la transformación. Preferiblemente, esto implica la esterilización del tejido y el corte de la hoja en rodajas delgadas, por ejemplo de espesor menor que 2 mm, o incluso más preferiblemente menores que 1 mm de espesor. Esto puede conseguirse utilizando un escalpelo estéril o cualquier dispositivo

35 de corte apropiado.

La transferencia de una secuencia de polinucleótidos extraña al genoma de las células de hoja se realiza por transformación con *Agrobacterium*. La técnica de transformación mediada por *Agrobacterium* es una técnica bien conocida y establecida. El sistema se desarrolló a partir de la forma natural de transformación de plantas que da como resultado la enfermedad de agallas de la corona. Resumidamente, en la enfermedad de agallas de la corona, *Agrobacterium tumefaciens* utiliza un plásmido inductor de tumores (Ti) existente naturalmente para transferir una pieza de DNA replicada del plásmido denominado T-DNA. Los genes en el T-DNA existente naturalmente dan como resultado la formación de agallas en la planta en el sitio de infección. La secuencia de T-DNA codifica también típicamente proteínas que dan como resultado la producción de aminoácidos específicos que son metabolizados por el

40 *Agrobacterium*, pero no por la planta.

Este sistema ha sido utilizado para la transformación de plantas utilizando polinucleótidos de interés. Los plásmidos Ti han sido modificados específicamente por ingeniería genética para propósitos de transformación. Por ejemplo, los plásmidos Ti han sido modificados por ingeniería genética para eliminar los oncogenes de la secuencia de T-DNA que dan como resultado la formación de tumores, y éstos han sido reemplazados por casetes de clonación para la introducción del polinucleótido de interés, promotores para impulsar la expresión de polinucleótidos de interés, y también para incluir marcadores de selección. Se añaden también a menudo genes de replicación para permitir la replicación del plásmido en hospedadores distintos de *Agrobacterium*. Los genes de virulencia (*Vir*) requeridos para la habilitación de *Agrobacterium* para que sea capaz de transformar una célula de planta se han separado también sobre un plásmido separado distinto del plásmido que contiene el polinucleótido de interés, que se conoce comúnmente como un vector binario.

50

- 55 Existen muchos plásmidos Ti y vectores binarios disponibles para uso en la transformación mediada por *Agrobacterium*. Una persona experta en la técnica podría seleccionar un plásmido adecuado e insertar el polinucleótido de interés y llevar a cabo el proceso de transformación de acuerdo con metodologías muy conocidas.

El método de la presente invención es adecuado para uso en la transformación de células de plantas *Allium* con cualquier polinucleótido de interés. Por ejemplo, pero sin carácter limitante, el polinucleótido de interés podría conferir una ventaja agronómica, v.g. resistencia a herbicidas tales como glifosato y/o fosfinotricina como se ha demostrado en la cebolla previamente utilizando un sistema de transformación basado en embriones inmaduros (Eady et al 2003). La resistencia a enfermedades fúngicas tales como la pudrición blanca de *Allium*, la resistencia a enfermedades víricas tales como el Virus del Moteado Amarillo del Lirio o los virus responsables de la enfermedad del mosaico del ajo. Resistencia a enfermedades bacterianas. Resistencia a plagas de insectos, como se demuestra en la cebolla utilizando previamente callo de embriones cigóticos maduros (Zheng et al. 2004), tales como la cresa de la cebolla y/o los trípidos. La modificación del camino del espigado y la floración por el uso de secuencias de polinucleótidos que pueden afectar al nivel, el reconocimiento o la actividad del agente hormonal de la floración.

Alternativamente, un polinucleótido de interés podría conferir una ventaja de rasgos de calidad, v.g. la sobreexpresión o silenciación de genes del camino de la coloración o sus reguladores. La sobreexpresión o silenciación de los genes del camino del azufre o sus reguladores, por ejemplo la silenciación del gen lfs por el uso de la secuencia de RNAi de lfs. La sobreexpresión o silenciación de genes del camino de los carbohidratos o sus reguladores, por ejemplo, la sobreexpresión de la silenciación del gen sst1 por el uso de secuencias de RNAi de sst1.

El polinucleótido de interés se inserta en un vector adecuado y el *Agrobacterium* se prepara utilizando métodos bien conocidos en la técnica. Preferiblemente, esto incluye el uso de acetosiringona en el medio de proliferación final para mejorar la actividad del gen vir. El *Agrobacterium* se inocula luego en las piezas de hoja, lavando y resuspendiendo preferiblemente las agrobacterias en medios líquidos de plantas que no contienen antibióticos y acetosiringona (v.g. Eady et al 2000) a una densidad óptica comprendida entre 0,1 y 0,9 a 520 nm y sumergiendo luego las piezas de hoja en este líquido. Con preferencia, se mezclan aproximadamente 10 a 20 rodajas de material de hoja con ~ 1,5 ml de agrobacterias en un tubo Eppendorf. La inoculación se aumenta preferiblemente por una agitación enérgica breve del tejido y las agrobacterias seguida por infiltración a vacío durante 30 minutos. Después de este periodo de inoculación, se elimina el exceso de agrobacterias y preferiblemente se seca el tejido sobre papel de filtro hasta que se elimina todo el exceso de líquido.

Después de la inoculación, las piezas de hoja se co-cultivan utilizando métodos bien conocidos en la técnica con secciones de hoja preparadas durante un periodo de tiempo suficiente para conseguir la transferencia de la secuencia del polinucleótido de interés a una o más células de hojas de la planta. Preferiblemente, las piezas de hoja se ponen sobre medio P5 (Eady et al. 2000) y se co-cultivan durante 3 a 7 días en oscuridad a 28°C. El método de la presente invención es adecuado para uso en cualquier planta del género *Allium*. Por consiguiente, se apreciará que el T-DNA, el vector, las agrobacterias, la inoculación, el co-cultivo y las condiciones del medio requeridos para conseguir una transferencia satisfactoria pueden variar debido a factores tales como la planta específica de *Allium* utilizada, el agente seleccionable utilizado y la cepa específica de *Agrobacterium* y combinación de vectores utilizada. Por esta razón, puede requerirse alguna optimización para conseguir las condiciones óptimas, y en particular el periodo de tiempo requerido para conseguir la transferencia de la secuencia de polinucleótidos, para una transformación particular. Sin embargo, esto podría ser conseguido fácilmente por una persona experta.

Después de la incubación con el *Agrobacterium*, es necesario seleccionar luego aquellas células que se hayan transformado con éxito. Esto se realiza típicamente por inclusión de un gen marcador seleccionable que se co-transforma en la célula con el polinucleótido de interés. El gen marcador seleccionable codifica generalmente una proteína que confiere resistencia de alguna forma a la célula transformada, por ejemplo la resistencia a un antibiótico o un herbicida. Los marcadores seleccionables comunes pueden incluir, pero sin carácter limitante, antibióticos, v.g., kanamicina con resistencia codificada por el gen de resistencia nptII, para selección en medios que contienen kanamicina, o gliomicina con resistencia codificada por el gen de higromicina-fosfotransferasa, para selección en medios que contienen higromicina B; herbicidas, v.g. glifosato con resistencia codificada por, verbigracia, el gen cp4, o fosfonotricina con resistencia codificada, por ejemplo, por el gen bar. Muchos marcadores de selección se conocen en la técnica y podría utilizarse cualquier forma de un sistema de selección sin desviarse del alcance de la presente invención. Una revisión general de marcadores de selección potenciales puede encontrarse en Wilmink y Dons (1993) y más específicamente para *Alliums*, en Eady y Hunger 2008.

Las secciones de hoja se incuban luego en presencia del medio de selección particular de acuerdo con el marcador de selección utilizado. La duración total de tiempo requerida para la incubación con el medio de selección puede variar también, pero debe ser suficiente para obtener una población de células de hojas de *Allium* transformadas. El medio de selección puede incluir también un agente, por ejemplo un antibiótico tal como timentina, para destruir cualquier *Agrobacterium* remanente.

Las células de hojas de *Allium* transformadas pueden utilizarse luego para generar una planta transformada de *Allium* en caso deseado. La regeneración de plantas enteras a partir de tejido de hoja es conocida. Resumidamente, las células transformadas se cultivan en un medio de regeneración (por ejemplo Eady et al. 2000) que contiene una citoquinina, preferiblemente cinetina o 4FPA, o zeatina, o combinación de citoquinina y auxina, que estimula la regeneración de yemas de brotes múltiples. Las yemas de brotes se transfieren luego a un medio sin regulador de crecimiento (v.g. medio MS, con ½ de nivel de azúcar) o un medio con baja concentración de auxina para alargamiento ulterior del brote y la inducción y el crecimiento de raíces para obtener plántulas. Se apreciará que dependiendo de la planta *Allium* particular utilizada, se requerirá cierta optimización de citoquinina, concentraciones y tiempo neces-

rio apropiadas a fin de regenerar una planta *Allium*. Dichos procedimientos de optimización son bien conocidos y se realizan rutinariamente en cualquier experimento de transformación.

Como se muestra en los ejemplos, la transformación de cebolla, ajo, cebolleta y puerro se han conseguido con éxito utilizando el método de la presente invención. Por esta razón, el método tiene éxito en una gran diversidad de plantas *Allium*, y por consiguiente tiene aplicaciones en la transformación de cualquier planta del género *Allium*, pero en particular *Allium cepa*, *Allium fistulosum* o *Allium ampeloprasum*, *Allium ascalonicum*, *Allium schoenoprasum* y *Allium sativum*.

La presente invención proporciona también una planta *Allium* transformada de acuerdo con el método de la presente invención. En particular, el *Allium* es *Allium cepa*, *Allium fistulosum* o *Allium ampeloprasum*, *Allium ascalonicum*, *Allium schoenoprasum* y *Allium sativum*.

Se apreciará que el método puede utilizarse para producir cualquier planta transformada deseada dependiendo del polipéptido de interés particular. Por ejemplo, el polinucleótido de interés podría conferir una ventaja agronómica, v.g., resistencia a herbicidas tales como glifosato y/o fosfinitricina (Eady et al 2003). Resistencia a enfermedades fúngicas tales como la pudrición blanca de *Allium*. Resistencia a enfermedades víricas tales como el Virus del Moteado Amarillo del Lirio o los virus responsables de la enfermedad del mosaico del ajo. Resistencia a enfermedades bacterianas. Resistencia a plagas de insectos tales como la cresa de la cebolla y/o los trípodos. La modificación del camino del espigado y la floración por el uso de secuencias de polinucleótidos que pueden afectar al nivel, reconocimiento o actividad del agente hormonal de la floración.

Alternativamente, el polinucleótido de interés podría conferir una ventaja de rasgo de calidad, v.g. la sobreexpresión o silenciación de genes del camino de la coloración o sus reguladores. La sobreexpresión o silenciación de genes del camino del azufre o sus reguladores, por ejemplo la silenciación del gen *lfs* por el uso de sus secuencias de RNAi (Eady et al, 2008). La sobreexpresión o silenciación de genes del camino de los carbohidratos o sus reguladores, por ejemplo, las secuencias del gen *sst1* o RNAi de *sst1*.

Los ejemplos expuestos a continuación se dan para fines de ilustración y no deben considerarse en modo alguno como limitantes del alcance de la invención.

Ejemplo 1 - Procedimiento de transformación

- **Preparación de cultivos nocturnos de *Agrobacterium*.** Cada preparación se realizó por duplicado para asegurar un cultivo satisfactorio para cocultivo. Para cada plásmido, se obtuvieron dos lotes de 50 ml de LB y se añadieron a cada uno 500 µl de las partes alícuotas apropiadas de *Agrobacterium* (guardadas a -80°C). Se añadieron después a cada matraz los antibióticos apropiados. Para PART27H-mgfp5ER (que tiene los genes *hptII* y *myfp5-ER* en el T-DNA) se añadieron a cada matraz 50 µl de Espectinomomicina (100 mg/ml de stock) y estreptomomicina (100 mg/ml de stock). Estos matraces se pusieron luego en una máquina de sacudidas a 28°C durante una noche.
- **Esterilización de los dientes.** Se disgregaron bulbos de ajo en dientes individuales y se quitó luego la piel exterior de éstos. De cada diente, se recortó el lado inferior de la placa basal de la que emergen las raíces utilizando una cuchilla de escalpelo para limpiar el tejido. Los dientes se pusieron luego en frascos de vidrio inclinados y se lavaron brevemente en agua bidestilada. Se desechó el agua bidestilada y se cubrieron luego los dientes en etanol al 70% y se lavaron durante aproximadamente 30 segundos. Mientras los dientes se lavaban en alcohol, se preparó una solución de blanqueo al 30% (blanqueante comercial al 30% con dos gotas entre 20 por 100 ml). La solución alcohólica se desechó luego y los dientes se lavaron brevemente con algo de solución de blanqueante al 30%, la cual se desechó luego. Los dientes se sumergieron finalmente en la solución de blanqueo restante. Los frascos inclinados se pusieron luego en una máquina de sacudidas durante 30 minutos a la temperatura ambiente.
- **Preparación de *Agrobacterium*.** El *Agrobacterium* se retiró de la máquina de sacudidas a 28°C y se relleno con LB (1:1) (se añadieron 50 ml de LB al *Agrobacterium* y se agitó enérgicamente antes de añadir de nuevo 50 ml de esta solución diluida al matraz cónico vacío). Se rellenaron también los antibióticos por adición de la mitad de la parte alícuota añadida inicialmente al cultivo nocturno. Para PART27H-mgfp5ER (que tiene los genes *hptII* y *myfp5-ER* en el T-DNA) esto consistió en 25 µl de Espectinomomicina (100 mg/ml de stock) y estreptomomicina (100 mg/ml de stock). A continuación, se añadieron 10 µl de stock de acetosiringona (500 mM en DMSO) para dar una concentración final de 0,1 mM. Estos matraces se pusieron luego nuevamente en la máquina de sacudidas a 28°C durante al menos 3 horas.
- **Lavado de los dientes.** Una vez que los dientes hubieron permanecido en la solución de blanqueo en la máquina de sacudidas durante 30 minutos, se desechó esta solución y se lavaron los dientes 4 veces con agua estéril.

- 5
 - **Organización del equipo.** Se dispensaron 400 µl de medio líquido P5 en tubos Eppendorf estériles. Se pusieron en funcionamiento campanas de flujo laminar y se esterilizaron. Se obtuvieron microscopios y fuente luminosa, se esterilizaron los instrumentos y se obtuvieron también cápsulas Petri estériles. Se retiraron las placas P5 del frigorífico y se abrieron en la parte posterior de una campana de flujo laminar para secarlas.
- 10
 - **Aislamiento de secciones de hojas inmaduras.** Los dientes de ajo se cortaron horizontalmente alrededor de 1 cm por encima de la placa basal y se desechó la sección superior. La hoja de almacenamiento restante y algo de las hojas más inmaduras y más anchas exteriores se cortaron y se desecharon luego. El tejido de hoja restante se cortó horizontalmente en rodajas desde el diente para crear secciones de hojas delgadas. Se pusieron secciones de hoja de 1 a 3 dientes (dependiendo del tamaño del diente) en sendos tubos Eppendorf que contenían 400 µl de P5 líquido.
- 15
 - **Preparación de *Agrobacterium*.** Después de al menos 3 horas (una vez que se hubieron aislado todas las secciones de hojas) el *Agrobacterium* se retiró de la máquina de sacudidas a 28°C. Una parte alícuota de este *Agrobacterium* se transfirió a un tubo Falcon de 50 ml y se centrifugó a ~ 4000 rpm (3220 x g) durante 5 minutos. Se vertió luego el sobrenadante y se desechó. El pellet se resuspendió luego en P5 líquido para dar una DO comprendida entre 0,7 y 0,9 cuando se leía la absorbancia a 550 nm. Se añadió solución stock de acetosiringona (500 mM en DMSO) a esta solución stock a una tasa de 0,8 µl/ml para dar una concentración final de 0,4 mM.
- 20
 - **Infección de las secciones de hojas.** Se añadieron 400 µl de solución de *Agrobacterium* a cada tubo Eppendorf que contenía secciones de hojas. Estos tubos se sometieron luego a agitación vorticial durante 30 segundos, después de lo cual cualesquiera secciones de hojas que se hubieran pegado a las paredes de los tubos o a la tapa se desprendieron por sacudida a fin de sumergirlas en la solución. Las tapas de cada tubo Eppendorf se perforaron luego con una cuchilla de escalpelo y se pusieron en una cámara de vacío a 25 pulgadas (635 mm) de mercurio durante 30 minutos.).
- 25
 - **Extensión en placas de las secciones de hojas infectadas.** Después del tratamiento a vacío, la solución de *Agrobacterium* se extrajo por pipeteado de los tubos Eppendorf que contenían las secciones de hojas. Estas secciones de hojas se pasaron luego por raspado suave a una cápsula Petri estéril que contenía 2 piezas de papel de filtro estéril (Whatman 1, 90 mm de diámetro). Cada sección de hojas se separó luego cuidadosamente y ambos bordes cortados se secaron sobre el papel de filtro. Esto se realizó bajo el microscopio. Cuando todos los explantes se hubieron secado, se transfirieron a una cápsula Petri que contenía P5 sólido. Las placas se mantuvieron luego a la temperatura ambiente en la oscuridad en un armario en la sala de cultivo durante 5 días.
- 30
 - **Sub-irrigación.** Después que las secciones de hoja se hubieron incubado durante 6 días en medio P5 se sometieron luego a sub-irrigación en medios P5/4FPA (véase la tabla siguiente) que contenían agentes de selección. Las secciones de hojas infectadas con PART27H-mgfp5ER (que tiene los genes hptII y myfp5-ER en T-DNA) se pusieron primeramente sobre medios P5/4FA que contenían 200 mg/l de timentina y 5 mg/l de higromicina. Después de 3 semanas en este medio, las secciones de hojas se sometieron a sub-irrigación sobre medios P5 + 4FPA que contenían 200 mg/ml de timentina y 10 mg/l de higromicina. Estas secciones de hojas se sometieron luego a sub-irrigación en este medio cada 3 semanas hasta que hubieron transcurrido 12 semanas en los medios de selección. Durante este periodo, las secciones de hojas se mantuvieron en la oscuridad a la temperatura ambiente.
- 35
 - **Cribado de GFP.** Las secciones de hojas que se habían infectado con PART27H-mgfp5ER (que tiene los genes hptII y myfp5-ER en el T-DNA) se cribaron bajo un microscopio con luz azul para expresión de GFP (Figura 15) antes de someterse a sub-irrigación en medios nuevos. Cualquier material que no expresaba GFP se desechó. Algunos explantes de hojas se cortaron en secciones más pequeñas durante este periodo para permitir un contacto más completo con los medios de selección.
- 40
 - **Cribado de GFP.** Las secciones de hojas que se habían infectado con PART27H-mgfp5ER (que tiene los genes hptII y myfp5-ER en el T-DNA) se cribaron bajo un microscopio con luz azul para expresión de GFP (Figura 15) antes de someterse a sub-irrigación en medios nuevos. Cualquier material que no expresaba GFP se desechó. Algunos explantes de hojas se cortaron en secciones más pequeñas durante este periodo para permitir un contacto más completo con los medios de selección.
- 45
 - **Cribado de GFP.** Las secciones de hojas que se habían infectado con PART27H-mgfp5ER (que tiene los genes hptII y myfp5-ER en el T-DNA) se cribaron bajo un microscopio con luz azul para expresión de GFP (Figura 15) antes de someterse a sub-irrigación en medios nuevos. Cualquier material que no expresaba GFP se desechó. Algunos explantes de hojas se cortaron en secciones más pequeñas durante este periodo para permitir un contacto más completo con los medios de selección.

SOLUCIONES STOCK	CONC. DEL STOCK	Cantidad para 1 l
BDS Macro	20x	50 ml
BDS Micro	200x	5 ml
BDS (modificado) Vits	200x	5 ml
Hidrolizado enzimático de caseína	50 mg/l	50 mg
4-FPA	8,5mg/ml (5mM)	1 ml
Sacarosa (3%)	30 g/l	30 g
Volumen Final		1000 ml

pH inicial		
pH final		6
Agar: Gelrite		4 g
Envases	Frascos Duran de 1 l	
Después de tratamiento en autoclave		
Glifosato (Gly 0,05)	0,1 M	500 ul
Timentina (T200)	300 mg/ml	670 ul
Timentina (T250)	300 mg/ml	830 ul
Geneticina (G12)	50 mg/ml	240 ul
Higromicina (H5)	50mg/ml	100 ul
Higromicina (H10)	50mg/ml	200 ul

Tabla - Composición de los medios P5/4FPA con los agentes selectivos que se indican para adición después de tratamiento en autoclave dependiendo del gen marcador seleccionable utilizado.

- 5 • **Regeneración de brotes.** Una vez que los explantes de las secciones de hojas hubieron permanecido en el medio de selección durante 12 semanas, se transfirieron los mismos a medio SM4 que contenía los antibióticos apropiados. Para los explantes transformados con PART27H-mgfp5ER (que tiene los genes hptII y myfp5-ER en el T-DNA) esto era 150 mg/l de timentina y 5 mg/l de higromicina. En este punto, los brotes nodulares producidos en los explantes de hojas se desmenuzaron (Figuras 15 & 16). Cualquier tejido derivado de un solo explante se agrupó y se definió por su número de placa y una letra a fin de evitar cualquier duplicación de los sucesos de transformación.
- 10 • **Regeneración de raíces.** Se observó luego el tejido que expresaba GFP respecto a la producción de brotes. Una vez que se hubo formado un brote adecuado, se transfirió el mismo a medio ½ MS30 que contenía los antibióticos correctos para el tratamiento correspondiente a fin de inducir la formación de raíz (Figura 16).
- 15 • **Obtención de plantas a partir de los explantes.** Los cultivos de brotes enraizados se lavaron en agua para eliminar el exceso de agar y se trasplantaron luego con mezcla de cultivo en tiestos en una instalación de invernadero confinado durante la primavera.

Ejemplo 2 - Proteína Verde Fluorescente

20 Tabla 1. Resumen de líneas de ajo supuestamente transgénicas que expresaban un gen informador gfp. El gen informador gfp procedía del fragmento SpeI del vector binario pBINm-gfp5-ER (proporcionado por J. Hasseloff, Department of Plant Sciences, University of Cambridge, UK) que estaba insertado en el sitio

SpeI del vector binario pART27 (Gleave 1992).

Experimento			Planta en el Invernadero	Resultado de la PCR para GFP	Lab-bo Ref para	
No.	Línea No.	Constructo				
1	0629	10 (A)	pART27H-mGFP5-ER	√	+	11096
2	0629	14 (A)	pART27H-mGFP5-ER	√	+	11096
3	0629	16 (C)	pART27H-mGFP5-ER	√	+	11096
4	0629	21 (B)	pART27H-mGFP5-ER	√	+	11096
5	0630	6 (A)	pART27H-mGFP5-ER	Muerta	+	11096
6	0631	2 (G)	pART27H-mGFP5-ER	√	+	11096
7	0631	2 (M)	pART27H-mGFP5-ER	√	+	11096
8	0631	2 (C)	pART27H-mGFP5-ER	√	+	11096
9	0631	3 (C)	pART27H-mGFP5-ER	√	+	11096
10	0631	5 (A)	pART27H-mGFP5-ER	√	+	11096
11	0631	5 (G)	pART27H-mGFP5-ER	√	+	11096
12	0631	7 (B)	pART27H-mGFP5-ER			
13	0631	8 (A)	pART27H-mGFP5-ER	√	+	11096

14	0631	8 (B)	pART27H-mGFP5-ER	√	+	11096!
15	0631	8 (I)	pART27H-mGFP5-ER	√	+	11096!
16	0631	8 (K)	pART27H-mGFP5-ER	√	+	11096!
17	0631	8 (M)	pART27H-mGFP5-ER	√	+	11096!
18	0631	11 (A)	pART27H-mGFP5-ER	√	+	11096!
19	0631	11 (B)	pART27H-mGFP5-ER	√	+	11096!
20	0631	11 (E)	pART27H-mGFP5-ER	√	+	11096!
21	0631	11 (H)	pART27H-mGFP5-ER			
22	0631	17 (A)	pART27H-mGFP5-ER			
23	0631	17 (B)	pART27H-mGFP5-ER	√	+	11096!
24	0631	17 (F)	pART27H-mGFP5-ER	√	+	11096!
25	0631	17 (H)	pART27H-mGFP5-ER	√	+	11096!
26	0631	17 (I)	pART27H-mGFP5-ER	√	+	11096!
27	0631	17 (N)	pART27H-mGFP5-ER	√	+	11096!
28	0631	18 (A)	pART27H-mGFP5-ER	√	+	11096!
29	0631	18 (B)	pART27H-mGFP5-ER	√	+	11096!
30	0631	18 (F)	pART27H-mGFP5-ER	√	+	11096!
31	0631	18 (I)	pART27H-mGFP5-ER	√	+	11096!
32	0631	18 (K)	pART27H-mGFP5-ER	√	+	11096!
33	0631	18 (N)	pART27H-mGFP5-ER	√	+	11096!
34	0631	18 (Q)	pART27H-mGFP5-ER	√	+	11096!
35	0631	19 (A)	pART27H-mGFP5-ER	√	+	11096!
36	0631	20 (A)	pART27H-mGFP5-ER	√	+	11096!
37	0631	20 (B)	pART27H-mGFP5-ER	√	+	11096!
38	0631	20 (E)	pART27H-mGFP5-ER	√	+	11096!
39	0631	20 (F)	pART27H-mGFP5-ER	√	+	11096!
40	0631	21 (A)	pART27H-mGFP5-ER	√	+	11096!
41	0631	21 (B)	pART27H-mGFP5-ER	√	+	11096!
42	0631	21 (C)	pART27H-mGFP5-ER	√	+	11096!
43	0631	22 (B)	pART27H-mGFP5-ER	√	+	11096!
44	0631	23 (A)	pART27H-mGFP5-ER	√	+	11096!
45	0631	24 (B)	pART27H-mGFP5-ER	√	+	11096!

Análisis Southern

5 Para confirmar la naturaleza transgénica de las plantas *Allium*, se realizó un análisis Southern por sondeo del DNA genómico digerido con la sonda del gen *gfp* (Fig. 2). Dado que *HindIII* corta el T-DNA sólo una vez, fue posible exhibir el número de copias del análisis Southern. 3 de los 25 transformantes que se muestran tienen copias simples (pistas 1 & 11 2a, y 4, 2b). Los otros transformantes tienen copias múltiples.

Extensión a otras especies del género *Allium*

10 El ejemplo de transformación arriba descrito puede utilizarse con otras especies de cosechas de *Allium*, que incluyen *Allium cepa* (cebolla), *fistulosum* (cebolleta) y *ampeloprasum* (puerro). Las Figuras 3-14 siguientes muestran que el proceso de transformación descrito produce patrones de expresión de transferencia de genes iniciales idénticos GFP en el material de hojas jóvenes (inmaduras) de especies de cebolla (*Allium cepa*), cebolleta (*Allium fistulosum*) y puerro (*Allium ampeloprasum*), y que el cultivo de dicho tejido puede producir fácilmente cultivos de brotes (Fig. 8, 12, 14).

Ejemplo 3 - Resistencia fúngica

Se transforma tejido de hojas de ajo por el método que se ha descrito en el Ejemplo 1. Se utilizó una secuencia de T-DNA que contenía un gen marcador seleccionable resistente a higromicina, el gen informador *gfp* y un constructo de gen de oxalato-oxidasa (*oxoxo*) (Figura 17a).

5 Después de la transformación, la planta se regenera (Figura 17b) sobre un medio de regeneración que contiene higromicina (como se ha descrito arriba) que exhibe expresión de GFP (Figura 17c). La actividad de oxalato-oxidasa de este tejido se demuestra por tinción histoquímica (Simmons et al. 2004) (Figura 17d). El análisis PCR del DNA genómico de estas plantas demuestra la presencia del constructo génico (Figura 19e).

10 Las enzimas tales como oxalato-oxidasa u oxalato-descarboxilasa son agentes antifúngicos potentes contra hongos productores de oxalato tales como las especies de *Sclerotium* (Bidney et al (1999) (v.g. *S. cepivorum*, el agente causal de la pudrición blanca de *Allium*). La transferencia de este gen y su actividad es una demostración de la aplicabilidad del método de la presente invención para producir plantas *Allium* dotadas de resistencia fúngica.

Ejemplo 4 - Resistencia viral

15 Se transforma tejido de hojas de ajo por el método descrito en el Ejemplo 1. Se utilizaron un constructo de T-DNA que contenía un gen marcador seleccionable resistente a higromicina, un gen informador de *gfp* y una secuencia de silenciamiento de RNAi dirigida contra una parte de consenso de la secuencia de la cubierta del virus enano amarillo de la cebolla (OYDV) y el virus de las estrías amarillas del puerro (LYSV) respectivamente para conferir resistencia a la enfermedad del mosaico del ajo (Figura 18a).

20 Se generaron plantas enteras (Fig. 18b) utilizando los métodos arriba descritos y se demostró que exhibían expresión de GFP (no representado). El análisis PCR demuestra la presencia de las secuencias *hyg*, *gfp* y RNAi (Fig. 18c).

25 La invención describe un sistema de transformación repetible para *Allium*. Los transformantes primarios de regeneración parecen ser fenotípicamente normales. La expresión de GFP, como un marcador visual seleccionable, permite que se optimizaran las condiciones de selección posteriores a la transformación. Se ha demostrado que el marcador GFP es útil también en la selección de plantas transgénicas de otras especies que son difíciles de transformar (Vain et al. 1998). Se han establecido ahora las condiciones de selección, que permiten la identificación de transformantes basada exclusivamente en su capacidad para enraizamiento en medios selectivos.

30 Este método de producción de *Alliums* transgénicos es repetible y eficiente. Requiere un breve periodo de tiempo la producción de plantas transgénicas y utiliza técnicas que pueden funcionar a frecuencias elevadas (34 plantas transgénicas del tejido de 8 dientes, o lo que es igual 350% de frecuencia de transformación), comparadas con métodos previos que producían en el mejor de los casos sucesos de baja frecuencia (12 sucesos independientes de 440 embriones inmaduros, o lo que es igual 2,7%, Eady et al, 2000).

35 Debe entenderse que el alcance de la invención no está limitado a las realizaciones descritas y que por consiguiente pueden hacerse numerosas variaciones y modificaciones en estas realizaciones sin apartarse del alcance de la invención tal como se expone en esta memoria descriptiva. Esto es particularmente aplicable a modificaciones de medios y condiciones de selección que podrían ser alterados por un experto en la técnica sin apartarse del alcance de la invención. Asimismo, los tipos de genes o secuencias de DNA que pueden insertarse no están limitados a los descritos específicamente en la memoria descriptiva dado que estos podrían alterarse sin desviarse del alcance de la invención.

Aplicabilidad industrial

40 La invención proporciona un nuevo método de transformación de plantas del género *Allium* y en particular de plantas de ajo y cebolla. Se proporcionan también plantas transformadas por el método. Esto permite que especies de cosechas de *Allium* que son especies vegetales económicamente importantes sean transformadas por una diversidad de genes para mejora de las variedades de cosecha de *Allium*.

Referencias

- 45
- Aswath, C. R., Mo, S. Y., et al. (2006). "Agrobacterium and biolistic transformation of onion using non-antibiotic selection marker phosphomannose isomerase." *Plant Cell Reports* 25: 92-99.
 - Barandiaran X, Dipietro A, Martin J (1998). *Plant Cell Reports* 17, 737-741.
 - Dommissse EM, Leung DM, Shaw M L, Conner A J (1990). *Plant Science* 69, 249-257.
 - BASTAR Manja-Tina, LUTHAR Zlata, BOHANEK Borut. Use of direct somatic organogenesis for Agrobacterium-mediated transformation of onion *Acta Biologica Slovenica*, 2003, 46: 3-7
- 55

- Bidney, D. L., Chame, D. G., et al. (1999). Production of pathogen resistant plants. International, World intellectual property organization.
- 5 • Eady, C. C. (1995). "Towards the transformation of onions." *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 23: 239-250.
- Eady CC, Lister CE, Suo Y, Schaper D (1996). *Plant Cell Reports* 15, 958-962.
- Eady CC, Suo Y, Butler RC (1998). *Plant Cell Reports* 18: 111-116.
- 10 • Eady CC, Lister CE (1998a). *Plant Cell Reports* 18: 117-121.
- Ready, C. C., Weld, R. J., et al. (2000). "Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation and transgenic-plant regeneration of onion (*Allium cepa* L.)." *Plant Cell Reports* 19: 376-381.
- 15 • Eady, C. C., Davis, S., et al. (2003a) "Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation and regeneration of herbicide resistant onion (*Allium cepa*) plants." *Annals of Applied Biology* 142: 213-217.
- Eady, C., Davis, S., et al. (2005). "Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of leek (*Allium porrum*) and garlic (*Allium sativum*)." *Plant Cell Reports* 24 (4): 209-15.
- 20 • Eady Colin C., Takahiro Kamoi, Masahiro Kato, Noel G. Porter, Sheree Davis, Martin Shaw, Akiko Kamoi, and Shinsuke Imai (2008) Silencing Onion Lachrymatory Factor Synthase Causes a Significant Change in the Sulfur Secondary Metabolite Profile. *Plant Physiology*, August 2008, Vol. 147, pp. 2096-2106,
- 25 • Eady, Colin C. (Sarah A. Hunger), Alliums, in Kole, C. and Hall, T. C. (eds.), "Compendium of Transgenic Crop Plants: Transgenic Vegetable Crops", Blackwell Publishing, Oxford, UK, 2008, pp 185-204.
- Fereol L. V. Chovelon S. Causse N. Michaux-Ferriere R. Kahane (2002) Evidence of a somatic embryogenesis process for plant regeneration in garlic (*Allium sativum* L.) *Plant Cell Rep* (2002) 21:197-203
- 30 • Haseloff J, Siemering KR, Prasher DC, Hodge S (1997). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 2122-2127.
- 35 • Hong W, Debergh P (1995). *Plant Cell Tissue & Organ Culture* 43, 21-28.
- Klein TM, Wolf ED, Wu R, Sanford JC (1987). *Nature* 327, 70-73.
- Kondo, T., Hasegawa, H., et al. (2000). "Transformation and regeneration of garlic (*Allium sativum* L.) by Agrobacterium-mediated gene transfer." *Plant Cell Reports* 19: 989-993.
- 40 • Saker MM (1998). *Biologia Plantarum* 40, 499-506.
- Simmonds, J., Cass, L., et al. (2004). "Oxalate oxidase; a novel reporter gene for monocot and dicot transformations." *Molecular Breeding* 13(1): 79-91. stant to beet armyworm (*Spodoptera exigua* Hubner)." *Molecular breeding* 14:293-307.
- 45 • Vain P, Worland B, Kohli A, Snape JW, Christou P (1998). *Theoretical & Applied Genetics* 96, 164-169.
- 50 • Wilmink and Dons (1993) *Plant Mol. Biol. Repr*, 11(2): 165-185
- Xue HM, Iraki H, Kanazawa T, Harada T, Yakuwa T (1997). *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 66, 353-358.
- 55 • Zheng, S.-J., Henken, B., et al. (2001a). "Molecular characterisation of transgenic shallots (*Allium cepa* L.) by adaptor ligation PCR (AL-PCR) and sequencing of genomic DNA flanking T-DNA borders." *Transgenic Research* 10:237-245.
- Zheng, S.-J., Khurstaleva, L., et al. (2001b). "Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of *Allium cepa* L.: the production of transgenic onions and shallots." *Molecular breeding* 7: 101-115.
- 60 •Zheng, S. -J., Henken, B., et al. (2004). "The development of a reproducible Agrobacterium tumefaciens transformation system for garlic (*Allium Sativum* L.) and the production of transgenic garlic resistant to beet armyworm (*Spodoptera exigua* Hubner)." *Molecular breeding* 14: 293-307.

REIVINDICACIONES

1. Un método de transformación de células de una especie de planta *Allium* con un polinucleótido de interés, que comprende los pasos de:
- 5 (i) aislar una sección de hoja inmadura de la planta *Allium* a transformar;
- (ii) co-cultivar la sección de hoja con *Agrobacterium* que contiene uno o más vectores adecuados que comprenden el polinucleótido de interés durante un periodo de tiempo suficiente para conseguir la transferencia de la secuencia de polinucleótidos de interés a una o más células de hoja de la planta; y
- 10 (iii) transferir la sección de hoja a un medio de selección que permite la selección de las células de la planta *Allium* transformada.
2. El método de la reivindicación 1, en donde el uno o más vectores es un vector binario.
3. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el cual el medio de selección incluye un agente para destruir selectivamente el *Agrobacterium*.
- 15 4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el cual la planta *Allium* es una cualquiera de *Allium cepa*, *Allium fistulosum* o *Allium ampeloprasum*, *Allium ascalonicum*, *Allium schoenoprasum* o *Allium sativum*.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el cual el polinucleótido de interés confiere una ventaja agronómica.
- 20 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el cual el polinucleótido de interés confiere resistencia a:
- (a) herbicidas que incluyen, pero sin carácter limitante, glifosato y fosfinotricina;
- (b) enfermedad fúngica con inclusión, pero sin carácter limitante, de la pudrición blanca de *Allium*;
- (c) virus con inclusión, pero sin carácter limitante, del Virus del Moteado Amarillo del Lirio y los virus responsables de la enfermedad del mosaico del ajo;
- 25 (d) enfermedades bacterianas; o
- (e) plagas de insectos que incluyen, pero sin carácter limitante, la cresa de la cebolla y los trípodos.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el cual el polinucleótido de interés confiere una modificación del camino del espigado y la floración.
- 30 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el cual el polinucleótido de interés afecta al nivel, reconocimiento o actividad del agente hormonal de la floración.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el cual el polinucleótido de interés confiere una ventaja de rasgo de calidad.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y 9, en el cual el polinucleótido de interés confiere sobreexpresión o silenciamiento de los genes del camino de la coloración o sus reguladores.
- 35 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y 9, en el cual el polinucleótido de interés confiere:
- (a) sobreexpresión o silenciamiento de los genes del camino del azufre o sus reguladores;
- (b) la silenciamiento del gen *lfs* por el uso de sus secuencias de RNAi de LFS; o
- (c) la sobreexpresión o silenciamiento de los genes del camino de los carbohidratos, o sus reguladores, con inclusión, pero sin carácter limitante, de *sst1* o *sst2*.
- 40 12. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende adicionalmente el paso de regenerar una planta a partir de las células transformadas.

FIGURA 1

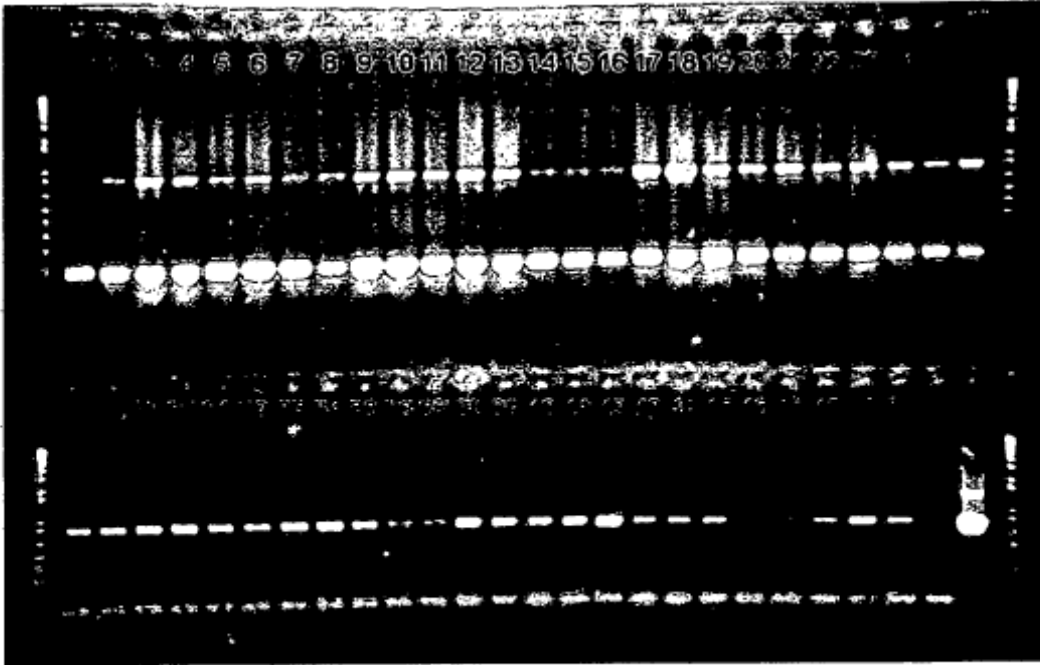


FIGURA 2

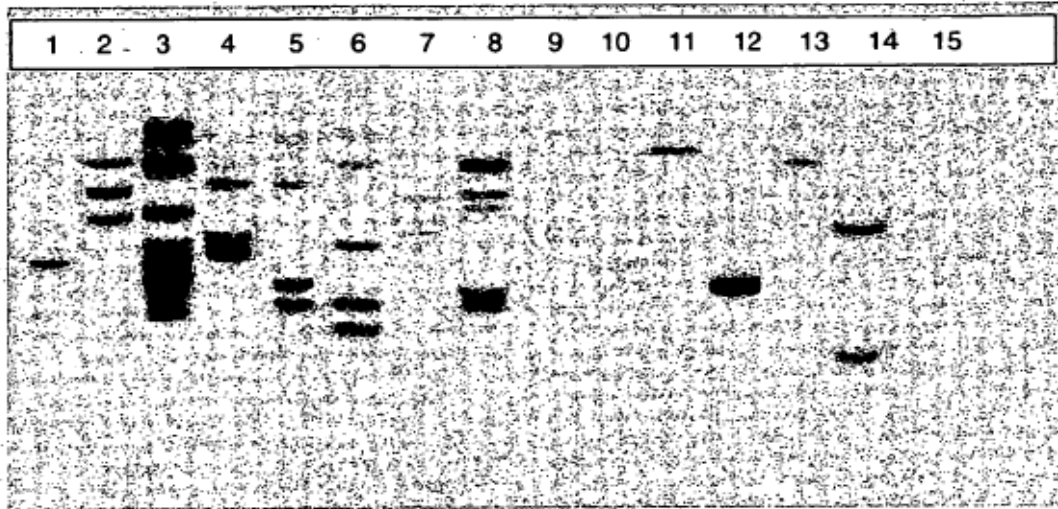


Fig 2a

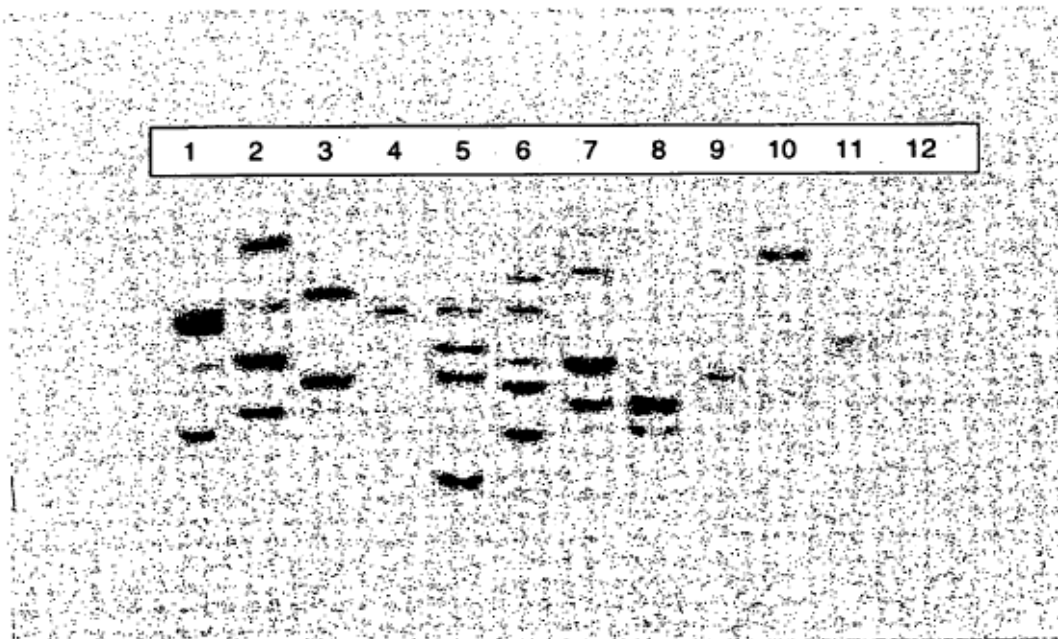


Fig 2b

FIGURA 3



FIGURA 4



FIGURA 5

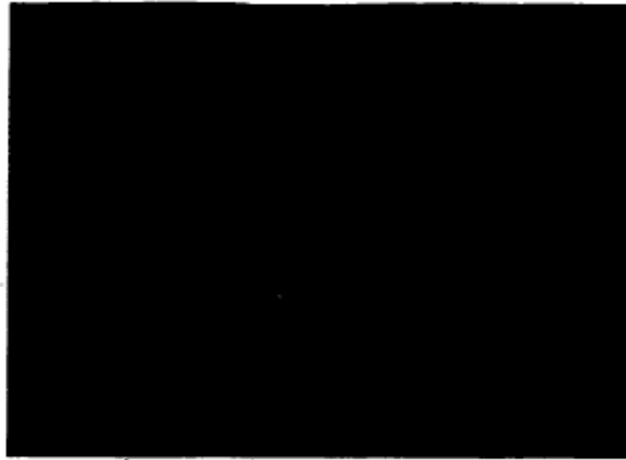


FIGURA 6



FIGURA 7

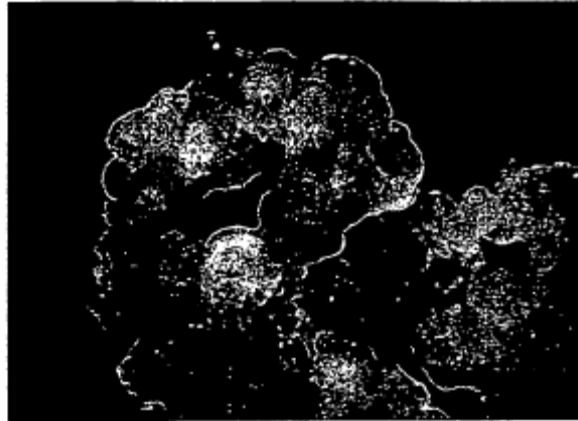


FIGURA 8



FIGURA 9

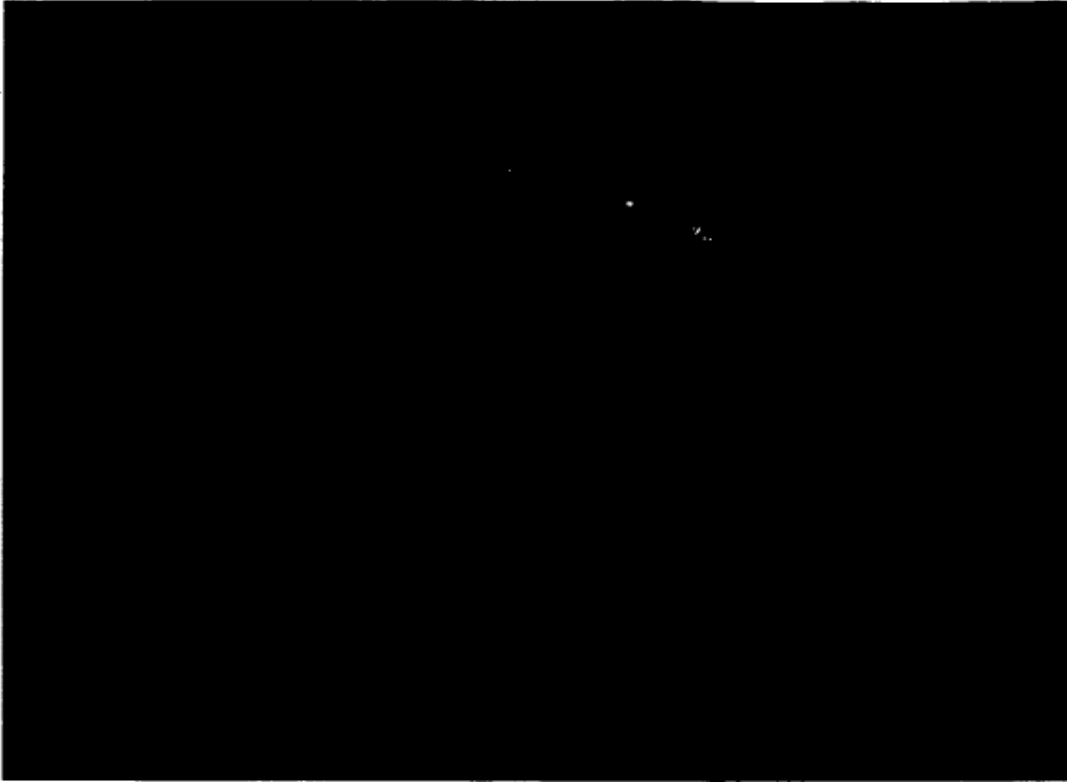


FIGURA 10

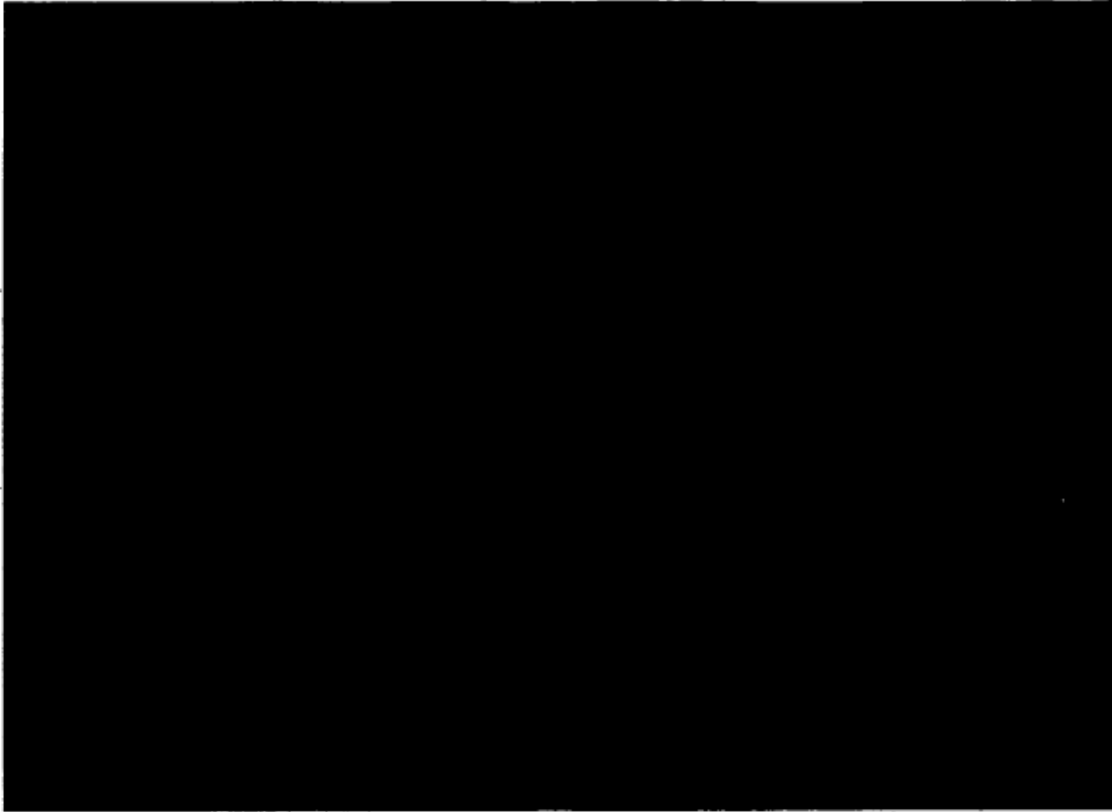


FIGURA 11

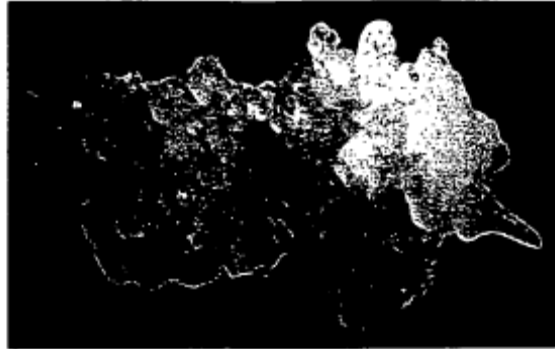


FIGURA 12

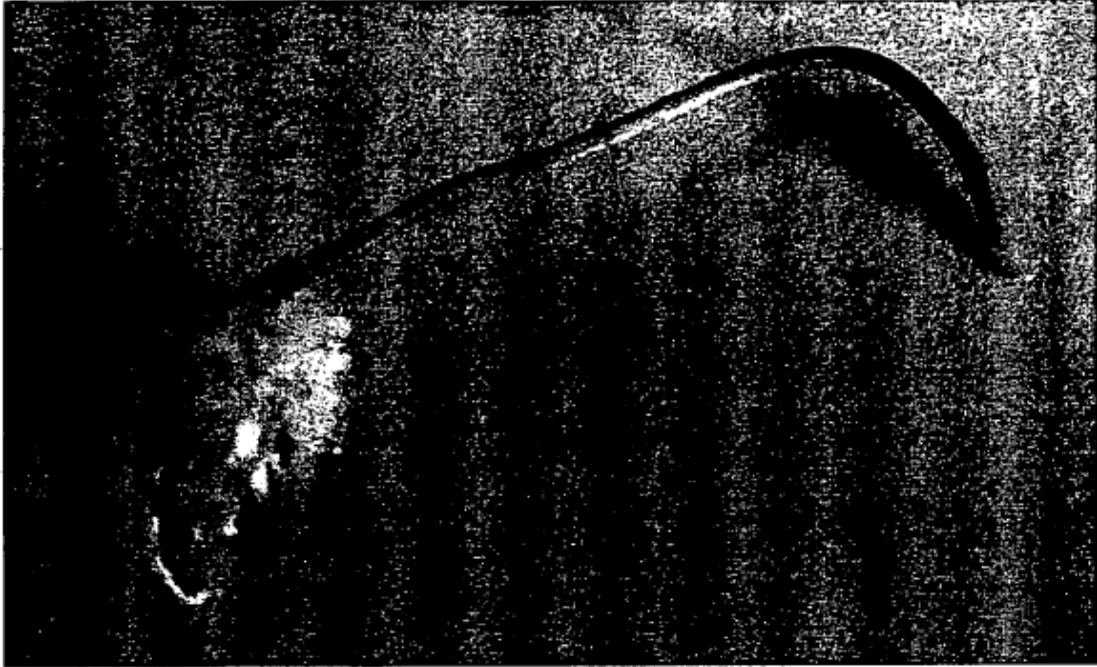


FIGURA 13



Figura 14

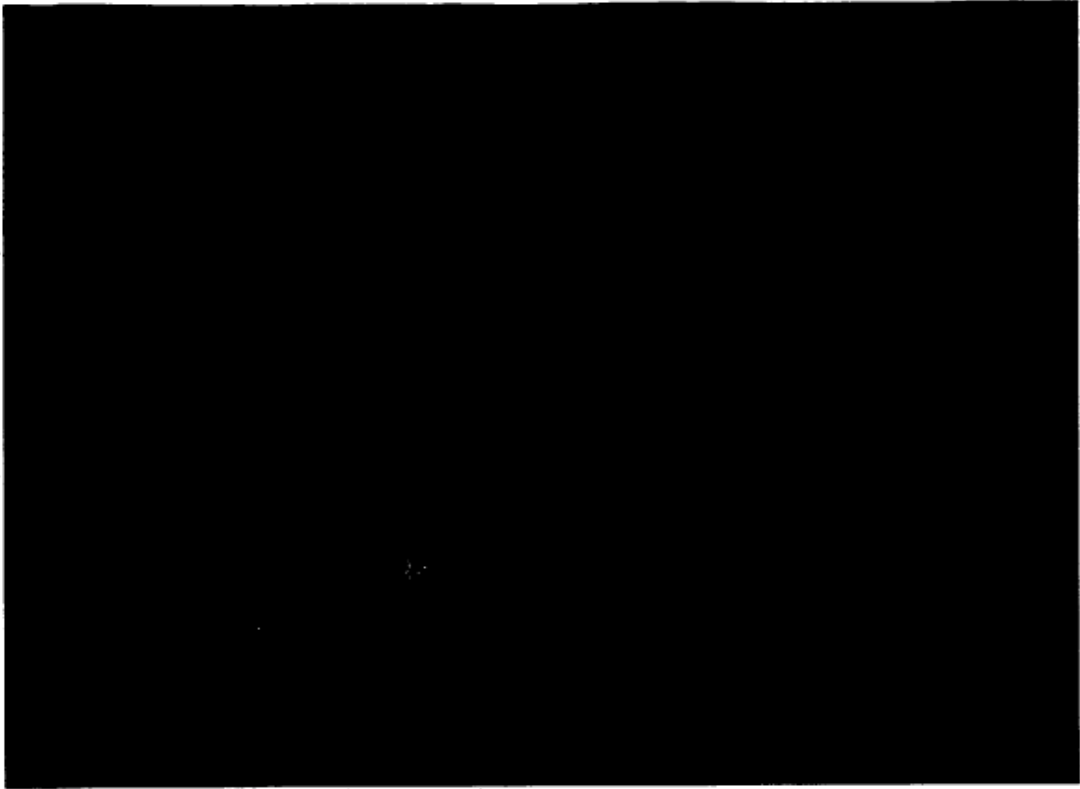


Fig 14a

Figura 14 cont.



Fig 14b

FIGURA 15

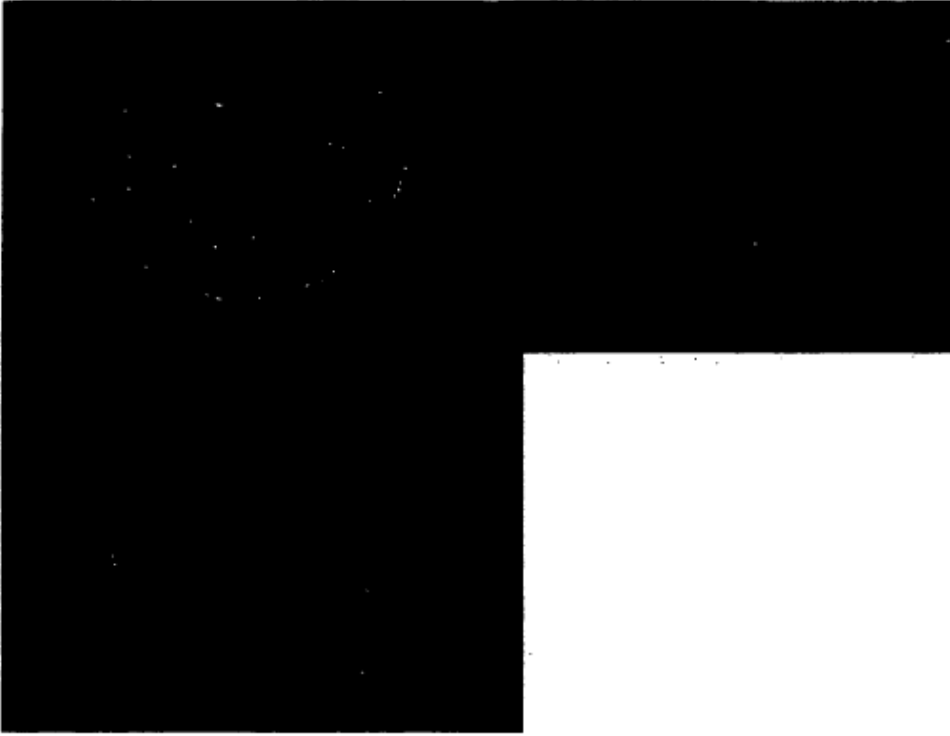


FIGURA 16



FIGURA 17

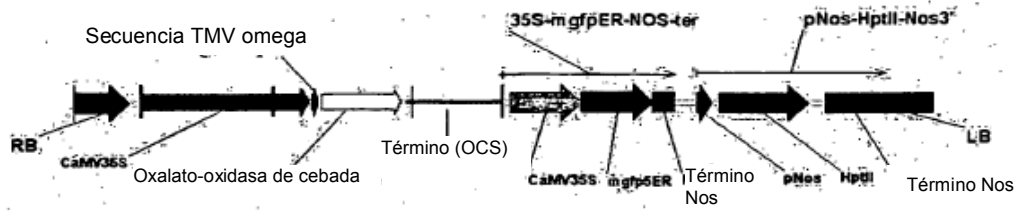


Fig 17a



Fig17b



Fig 17c

FIGURA 17 cont.



Fig 17d

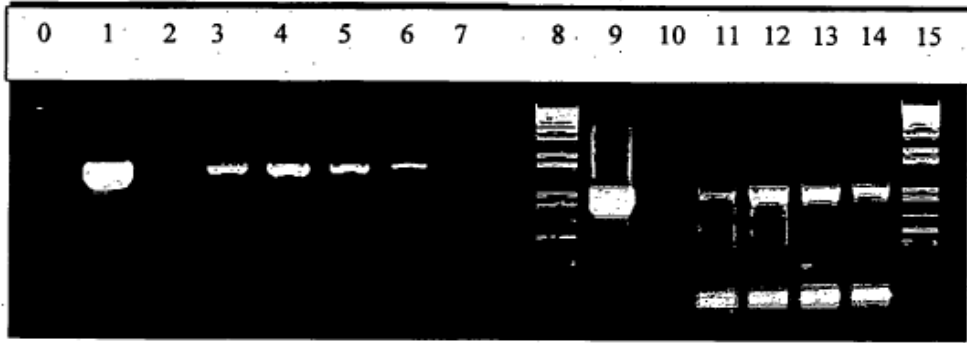


Fig 17e

Figura 18

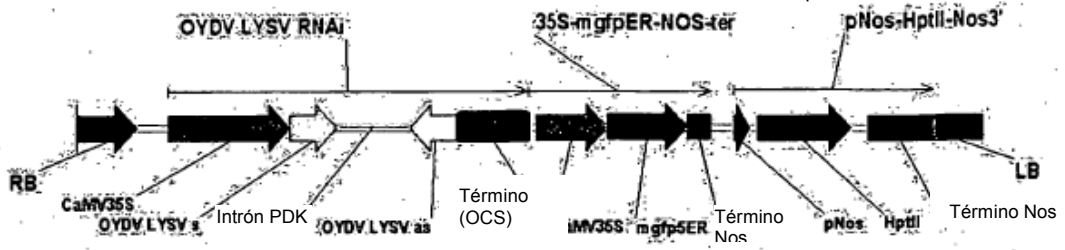


Fig 18a



Fig 18b

FIGURA 18 (cont.)

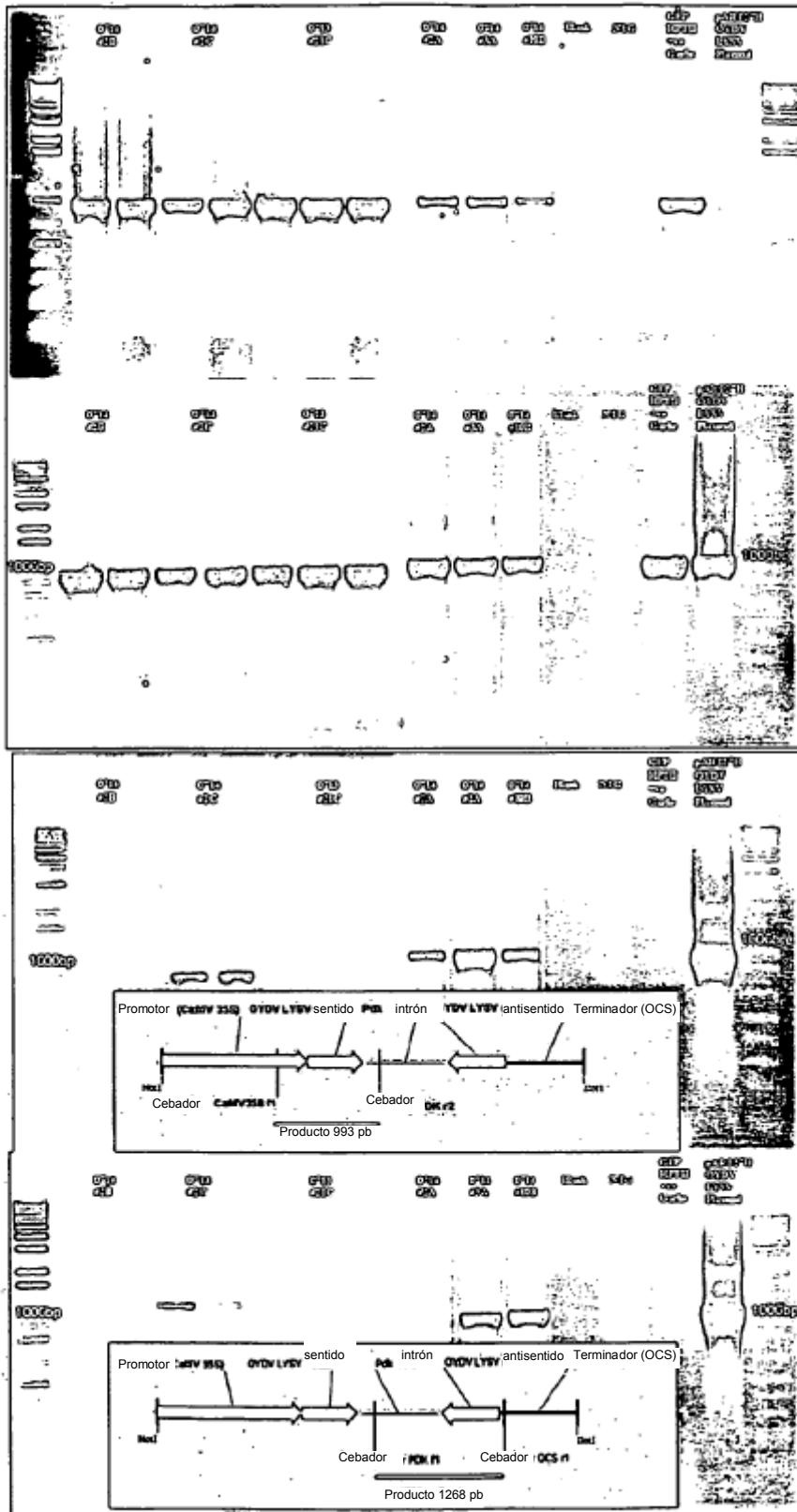


Fig 18c.