

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 438**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.08.1998 E 05011140 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2012 EP 1571220**

54 Título: **Vectores universales de integración y de expresión de cloroplastos, plantas transformadas y sus productos**

30 Prioridad:

07.08.1997 US 55314 P

23.03.1998 US 79042 P

15.05.1998 US 79640

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

19.04.2013

73 Titular/es:

AUBURN UNIVERSITY (100.0%)

309 SAMFORD HALL

AUBURN, AL 36849-5176, US

72 Inventor/es:

DANIELL, HENRY

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 401 438 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

Vectores universales de integración y de expresión de cloroplastos, plantas transformadas y sus productos.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 Esta solicitud se refiere al campo de la ingeniería genética de genomas de plantas, particularmente la ingeniería genética del genoma de plastidios de plantas, tales como cloroplastos, y a la transformación estable del genoma de cloroplastos de cualquier especie vegetal.

CASOS RELACIONADOS

10 Esta solicitud se refiere en particular a un vector universal de expresión e integración de cloroplastos que es competente para transformar cualquier planta con uno o más genes de interés. La solicitud de patente previa, Serie nº 08/591.407, muestra células vegetales transformadas mediante un casete de expresión que comprende una secuencia de ADN exógena que se integra establemente (se enlaza covalentemente) en el genoma del cloroplasto de la célula de una planta diana. Las secuencias de ADN "establemente" integradas son aquellas que se heredan a través de la replicación del genoma por células u organismos descendientes. Esta estabilidad se muestra mediante la capacidad para establecer estirpes celulares permanentes, clones, o plantas transgénicas que comprenden una población que contiene el ADN exógeno.

15 Igualmente, la patente U.S. 5.693.507 (1997), de Daniell y McFadden, describe tal integración estable por medio de un casete de expresión que comprende una secuencia de ADN exógeno que codifica un rasgo deseado, y las plantas transformadas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

20 Ventajas de la Transformación de Cloroplastos Sobre la Transformación Nuclear.

El carácter atractivo de la transformación del genoma de cloroplastos sobre la transformación del genoma nuclear es atribuible a los serios riesgos que resultan de ésta última. Una preocupación habitual es el escape de genes extraños a través de la dispersión del polen desde las plantas transgénicas del cultivo hasta sus parientes herbáceos. Se ha demostrado que el polen transgénico repartirá genes extraños (transgénicos) a otras plantas sexualmente compatibles (detectado mediante el predominio del gen marcador en la prole cosechada a partir de plantas no transgénicas que se hicieron crecer en el área circundante). Por ejemplo, se ha observado a distancias variables, en diferentes direcciones, la dispersión de polen desde una parcela de ensayo central, que contiene plantas de algodón transgénicas, hasta plantas no transgénicas circundantes (Lewellyn y Fitt, 1996); (Umbeck, P.F. et al., 1991). Además, las frecuencias de genes marcadores en girasoles salvajes fue, por término medio, alrededor de 28 a 38%; en fresas salvajes, que crecen a 50 metros de un campo de fresas, más del 50% de las plantas salvajes contenían genes marcadores procedentes de fresas cultivadas (King, J., 1996).

El escape de genes extraños a través del polen es especialmente una preocupación medioambiental seria, en el caso de genes con resistencia a herbicidas, debido a las tasas elevadas de flujo de genes desde los cultivos hasta sus parientes salvajes. La preocupación es que el escape de genes desde los cultivos transgénicos hasta sus parientes herbáceos creará malas hierbas poderosas. En el arroz (*Oryza sativa*), se ha observado el flujo de genes desde variedades cultivadas hacia los parientes salvajes, en *O. perrennis* (Barrett, 1983) y en el arroz rojo (*O. sativa*; Langevin et al., 1990). En el sur de los Estados Unidos de América, el arroz rojo se ha convertido en una mala hierba importante debido a que los herbicidas que lo exterminan también exterminan al arroz cultivado. Se pagan menores precios por el arroz cultivado contaminado con arroz rojo. Algunos investigadores han introducido el gen *bar* que confiere resistencia a glufosinato (Liberty), en el arroz cultivado, para combatir esta mala hierba (Oard et al., 1996; Sankula et al., 1996). Sin embargo, debido a la compatibilidad sexual, la introducción de un gen expresado en el núcleo permitirá la transmisión de ese rasgo de resistencia al arroz rojo, vía el polen.

De forma similar, se cruzó colza transgénica, genéticamente manipulada por ingeniería para la resistencia a herbicidas, con un pariente herbáceo, *Brassica campestris* (mostaza salvaje), y confirió resistencia a herbicidas incluso en la primera generación del retrocruzamiento en las condiciones de campo (Mikkelson, T. R., et al., 1996).

La herencia materna de los genes introducidos evita el escape de genes a través del polen. Una solución a este problema son los genes extraños manipulados por ingeniería genética a través de genomas de cloroplastos (que se heredan de forma materna para la mayoría de los cultivos). También, las enzimas o proteínas diana para la mayoría de los herbicidas (por ejemplo, fotosíntesis o rutas biosintéticas de aminoácidos/ácidos grasos) se encuentran en compartimientos dentro del cloroplasto. Otra ventaja importante de la transformación de cloroplastos es el mayor nivel de expresión de genes extraños debido a un número de copias muy elevado (5000-10.000) de genomas de cloroplastos en las células vegetales. Debido a que la maquinaria transcripcional y de traducción del cloroplasto es de naturaleza procariota, los genes de origen bacteriano resistentes a herbicidas se pueden expresar a niveles extraordinariamente elevados en cloroplastos.

55 Transformación del Genoma de Cloroplastos.

Las investigaciones tempranas sobre la transformación de cloroplastos se centraron en el desarrollo de sistemas de orgánulos usando cloroplastos intactos capaces de una transcripción y una traducción eficaces y prolongadas (Daniell y Rebeiz, 1982; Daniell et al., 1983) y de la expresión de genes extraños en cloroplastos aislados (Daniell y McFadden, 1987). Estos experimentos se realizaron con la premisa de que fue posible introducir cloroplastos intactos aislados en protoplastos, y regenerar plantas transgénicas (Carlson, 1973). El descubrimiento del arma génica como dispositivo de transformación abrió la posibilidad de la transformación directa de plastidios en plantas (Daniell, 1993). Usando el arma génica, se logró la expresión transitoria de genes extraños en plastidios de dicotiledóneas (Daniell et al., 1990; Ye et al., 1990), de monocotiledóneas (Daniell et al., 1991), la expresión prolongada de genes foráneos usando vectores de expresión de cloroplastos que se replican autónomamente (Daniell et al., 1990), y la integración estable de un marcador seleccionado en el genoma del cloroplasto del tabaco (Svab y Maliga, 1993). Se obtuvieron plantas de tabaco, resistentes a ciertos insectos, integrando el gen *cry/Act* en el genoma de cloroplastos del tabaco (McBride et al., 1995; Patente U.S. 5.451.513). La transformación estable de plastidios de plantas superiores se ha logrado hasta ahora sólo en el tabaco.

Estudios Anteriores Sobre el Genoma de Cloroplastos.

Hasta la fecha, la integración estable de un gen extraño en el genoma de cloroplastos de una planta superior sólo se ha dado a conocer en el tabaco. Esto se logró con un vector que fue específico para el tabaco y que se obtuvo a partir del genoma de cloroplastos del tabaco, esto es, el vector contenía una secuencia homóloga solamente con el genoma de cloroplastos del tabaco y que no se conservó de forma elevada en los genomas de cloroplastos de otras plantas. Tal vector es inadecuado para transformar de forma estable especies vegetales distintas del tabaco. El único documento publicado de la expresión de genes extraños en una especie vegetal distinta del tabaco es aquel de hojas y embriones de trigo (Daniell et al., 1991), pero no se logró la integración estable. Nunca se ha dado a conocer la integración estable de un gen extraño en el genoma de cloroplastos de una planta monocotiledónea. Al menos en cereales (monocotiledóneas), los protocolos de transformación/regeneración desarrollados previamente pueden no ser susceptibles a la transformación de plastidios debido a las ineficacias inherentes en esos sistemas. También, las selecciones secuenciales/en serie (selecciones repetidas), consideradas importantes para lograr la homoplasma (Daniell, 1997), pueden no ser factibles usando esos sistemas de regeneración empleados. El desarrollo reciente de protocolos de transformación/regeneración únicos de maíz (Rudraswamy, 1997) y de arroz (sin publicar) tiene el potencial de mostrar eficacias sustancialmente mayores, y permite más de una ronda de selección durante la regeneración.

Maliga et al., en la patente U.S. 5.451.513, y Svab et al., 1990, proponen una transformación del genoma de plastidios del tabaco mediante una técnica de selección no letal que emplea ADN de plastidio que codifica un fenotipo seleccionable no letal. Según Maliga et al., una selección no letal es absolutamente esencial para obtener líneas transplastgénicas.

A diferencia de la técnica de Maliga et al., el método de la invención proporciona una selección que es letal para todas las plantas no transformadas, salvo para el tabaco. Sólo las plantas transformadas sobreviven y continúan creciendo. Esta selección letal tiene lugar con virtualmente todos los antibióticos, incluyendo espectinomicina y estreptomycinina en un medio que contiene el antibiótico en una concentración de 500-1.000 µg/ml. Maliga et al. demostraron que condiciones similares eran no letales para el tabaco. Además, a diferencia de la técnica de Maliga et al., según la invención, la transformación hasta la homoplasma se puede lograr incluso en la primera ronda de selección.

En la Solicitud de Patente Europea nº 0 251 654, Cannon et al. describen la transformación de cloroplastos del tabaco mediada por transposones, por ejemplo, usando el transposón bacteriano Tn5. El vector que contiene el transposón se dirige a una región cromosómica conocida por ser una región "transcripcionalmente silenciosa", a fin de conservar la integridad transcripcional de los genes nativos. Se ha identificado que tal región transcripcionalmente silenciosa está localizada entre dos promotores divergentes conocidos de genes de cloroplastos, por ejemplo los promotores para los genes para la subunidad grande de cloroplastos de la ribulosa bifsosfato carboxilasa (RbcL, "LS RuBisCo") y para β -ATPasa (atpB). Estos promotores transcriben los genes en direcciones opuestas, lejos de la región silenciosa del cromosoma. No se proporciona, en el vector de expresión de Cannon et al., ningún terminador de la transcripción; se sabe que tales regiones terminadoras son absolutamente esenciales para la expresión génica en plastidios. Finalmente, Cannon et al. no demuestran que se logre la transformación estable de cloroplastos.

La invención descrita aquí tiene varias características distintivas con respecto a Cannon et al. La invención enseña la transformación estable transmisible a la prole. La integración no está dirigida a una región transcripcionalmente inactiva del cromosoma de cloroplastos. La invención integra un casete (que contiene un terminador de la transcripción, como se describe posteriormente en lo sucesivo) en una región transcripcionalmente activa del genoma de cloroplastos. Los promotores controlan la expresión de uno o más genes. A diferencia de Cannon et al., ningún transposón está implicado en la transformación del cloroplasto según la invención.

En NATO Asi Series, Daniell et al., 1994, dan a conocer la resistencia a insectos, obtenida mediante ingeniería genética, vía genomas de cloroplastos que muestran la expresión de la proteína CryIIA en plantas, para controlar insectos. McBride et al., 1995, y la patente U.S. 5.545.818 (1996), confirman lo expuesto por Daniell et al., y

muestran la expresión de la proteína CRYIAC de *Bacillus thuringiensis* en plastidios de plantas. Los vectores dados a conocer por McBride están diseñados para introducir el constructo sólo en el genoma de cloroplastos del tabaco.

Necesidad de un Vector para Transformar una Variedad de Plantas.

- 5 Es evidente, a partir del estado de la técnica, que existe una necesidad importante de un vector de integración y de expresión de cloroplastos para transformar, preferiblemente de forma estable, los genomas de cloroplastos de muchas especies diferentes de plantas. Tal "vector universal" permitiría la transformación del genoma de cloroplastos de una planta seleccionada diana con una secuencia que codifica ADN heterólogo (extraño), y eliminaría la necesidad de construir vectores cada uno de los cuales es específicamente adecuado para transformar el genoma de cloroplastos de la especie vegetal particular que se va a transformar.
- 10 Hasta donde alcanza el conocimiento del inventor, aún no se ha resuelto el problema para construir tal vector universal, competente para transformar plantas diferentes.

Conceptos de la Técnica Anterior de la Región Espaciadora Intergénica.

- 15 Aunque la secuencia nucleotídica de regiones codificantes del genoma, incluyendo el genoma de cloroplastos, a menudo se conserva entre especies, las secuencias que flanquean a genes funcionales, es decir, las regiones espaciadoras entre regiones codificantes, por el contrario, típicamente no se conservan. El dogma aceptado para la falta de conservación, y de este modo para el bajo grado de homología entre especies de las regiones espaciadoras, es que las regiones espaciadoras típicamente no realizan funciones esenciales. Por lo tanto, hay poca, si la hay, presión selectiva para conservar la secuencia de regiones espaciadoras entre especies. La secuencia de las regiones espaciadoras se puede alterar sin efectos indeseables.

- 20 Stummann et al., 1988, describen que el orden de genes del operón de ARN ribosómico del genoma de cloroplastos es el mismo entre diferentes especies de plantas, incluyendo el tabaco, el maíz, y una hepática, *Marchantia*, y que las secuencias codificantes de este operón son muy homólogas. Stummann también describe que la homología del operón entre especies es menor que la homología de las regiones codificantes génicas entre especies. Esto es consistente con la falta de conservación de las regiones espaciadoras; y sugiere que la homología de regiones espaciadoras entre especies, en el operón de ARN ribosómico, es relativamente baja.
- 25

La invención, contrariamente al dogma de falta de conservación de las regiones espaciadoras, usa regiones espaciadoras, que se conservan enormemente entre diferentes plantas, para construir vectores competentes para transformar una variedad de plantas.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

- 30 La invención proporciona vectores universales de integración y de expresión de cloroplastos, como se definen por las reivindicaciones, que son competentes para transformar e integrar de forma estable genes de interés en el genoma de cloroplastos de múltiples especies de plantas. Se describen plantas transformadas y su prole. Se transforman plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas, las cuales nunca han sido transformadas hasta ahora. Las plantas transformadas con un gen sintético expresan polímeros a base de proteínas (PBP) biodegradables valiosos.
- 35 Las plantas transformadas producen moléculas muy valiosas. Se proporciona resistencia a las cosechas agrícolas frente a la mayoría de las clases de herbicidas químicos. La resistencia a herbicidas se usa como un marcador seleccionable letal para la transformación de los cloroplastos. Las plantas transformadas son capaces de expresar, además del rasgo seleccionado, un rasgo no seleccionado secundario deseable. Se proporciona a las plantas transformadas resistencia frente a insectos, tanto contra insectos que son susceptibles a toxinas Bt como contra insectos que han desarrollado una resistencia a toxinas de Bt.
- 40

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

La Región Espaciadora Intergénica. El Concepto de la Invención.

- 45 Se ha descubierto, contrariamente a la creencia convencional, que el genoma de cloroplastos (ct) de plantas contiene regiones espaciadoras con secuencias nucleotídicas muy conservadas. La naturaleza muy conservada de las secuencias nucleotídicas de estas regiones espaciadoras del genoma de cloroplastos hace a tales regiones espaciadoras, según se ha descubierto, ideales para la construcción de vectores para transformar cloroplastos de especies vegetales ampliamente variables, todo esto sin la necesidad de construir vectores individuales para plantas diferentes o para especies de cosechas individuales, lo que requeriría primero una determinación de la secuencia de ADN de cada uno de los genomas de los cloroplastos. Este hallazgo tiene numerosas consecuencias útiles, e importantes aplicaciones prácticas.
- 50

Las Varias Realizaciones de la Invención

El Vector Universal.

La invención proporciona un vector universal de integración y de expresión, en lo sucesivo denominado como "UV", y su uso para la expresión de al menos un fenotipo en una variedad de plantas diferentes. Dicho "UV" se define por las reivindicaciones.

5 El vector universal de integración y de expresión comprende un casete de expresión (posteriormente descrito más abajo) que comprende los elementos genéticos necesarios para transformar transitoria o preferiblemente de forma estable los plastidios, por ejemplo el genoma de cloroplastos de una célula vegetal diana, con un ADN extraño (heterólogo) que codifica una molécula de interés, como un fenotipo para ser expresado por la planta, o una molécula no vegetal de valor elevado, como un péptido (o polipéptido) biológicamente activo. El vector universal está
10 construido con una región transcripcionalmente activa de un genoma de cloroplastos que se conserva enormemente en un amplio intervalo de genomas de cloroplastos de plantas superiores. Preferiblemente, esa región es la región espaciadora 2, la región espaciadora intergénica entre la región de ARN^{le}-t y la región de ARN^{Ala}-t. Tal región se denomina a menudo aquí como una región "espaciadora" debido a que, en el genoma de cloroplastos, es intergénica entre varios genes en el operón de ARNr que es transcrito mediante un promotor. Cuando se construye en el vector universal, tal región se denomina generalmente aquí como un "borde" o preferiblemente como una "secuencia de
15 flaqueo" o "secuencias de flaqueo". Esto es debido a que, en el vector universal, los elementos genéticos operablemente unidos para transformar establemente el plastidio de la planta diana están flanqueados a cada lado por una secuencia, es decir, un fragmento, de la región espaciadora. Las secuencias de flaqueo en el vector y las secuencias espaciadoras en el genoma de cloroplastos tienen suficiente homología entre sí para sufrir una recombinación homóloga. El vector universal se inserta en el espaciador de una región transcripcionalmente activa, en el genoma de los cloroplastos. Generalmente, la región espaciadora está situada en la región repetida invertida del genoma de los cloroplastos. El resto del constructo, es decir, distinto de las secuencias de flaqueo y distinto del casete de expresión, generalmente se denomina aquí como el "vector" que comprende secuencias bacterianas, como los vectores de clonación plasmídicos pUC, pBR322, pGEM o pBlueScript.

El Vector o Casete de Expresión.

25 El vector universal comprende un casete de expresión que está flanqueado a cada lado por una secuencia de flaqueo. En la patente U.S. 5.693.507 (1997), que se incorpora aquí como referencia, se describe un casete de expresión adecuado para uso en la invención. Ese casete comprende, unidos operablemente, una región de iniciación transcripcional, funcional en el cloroplasto de la planta, al menos una secuencia de ADN heterólogo que codifica una molécula diana de interés, por ejemplo un gen (o una fracción funcional del mismo) que codifica un compuesto biológicamente activo, y secuencias de control situadas en dirección 5' desde el extremo 5' y en
30 dirección 3' desde el extremo 3', y una región de terminación de la transcripción, para proporcionar la expresión de la secuencia codificante en el genoma del cloroplasto de una planta diana. Preferiblemente, el casete de expresión está flanqueado por secuencias de ADN de la planta, como secuencias de ADN del cloroplasto, a fin de facilitar la integración estable del vector de expresión en el genoma del cloroplasto. En la construcción del casete de expresión, la secuencia de ADN comprende uno o más sitios de clonación para la integración del gen o de los genes de interés.

Las secuencias espaciadoras que se han identificado en plastidios de plantas superiores se conservan ubicuamente entre una gran variedad de plantas. Se encontró que estas secuencias eran ideales para construir los vectores universales de la invención, los cuales son, como resultado, competentes para transformar el genoma de los cloroplastos de una gran variedad (o multiplicidad) de plantas diana mediante recombinación homóloga. De este modo, es irrelevante a partir de qué espaciador individual de una planta particular se construya el vector universal.

Como es sabido, generalmente será aconsejable tener al menos una secuencia nucleotídica heteróloga adicional que codifique un fenotipo seleccionable, tal como un gen que proporcione resistencia a antibióticos, o una porción funcional del mismo, que sirva como marcador asociado con el casete de expresión o con el vector universal de integración y de expresión. Esto facilita la identificación de las células vegetales en las que se ha integrado establemente el gen extraño. Los genes marcadores son conocidos en la bibliografía, por ejemplo β -lactamasa, genes resistentes a herbicidas, tales como el gen *psbA* mutante o EPSPS-*aroA*, el gen *cat* que codifica la cloranfenicol acetotransferasa, y el gen *uidA* que codifica la β -glucuronidasa (*gus*), y otros.

Se reconoce que el tabaco es único en no ser susceptible al efecto letal de estreptomycin y espectinomycin. Aunque las hojas de tabaco carecen de la pigmentación cuando se exponen a un medio con tal antibiótico, es observable el crecimiento continuado. Sin embargo, esta propiedad del tabaco es burlada fácilmente. Hay numerosos antibióticos disponibles que son letales para el tabaco, como la higromicina. Otro enfoque es seleccionar un gen que exprese un marcador visible, como un color, fluorescencia, etc., como el gen informador mGFP, que codifica una proteína fluorescente verde.

Método de Transformación.

55 La solicitud proporciona un método de transformación que puede producir homoplasma (integración de genes extraños en todos los genomas de los cloroplastos de la célula vegetal) después de una primera ronda de selección, sin la necesidad de un proceso de selección adicional. El método para transformar una planta usa el vector universal construido con secuencias de flaqueo procedentes de una especie vegetal distinta de la especie de la planta diana

a transformar. Como alternativa, el vector puede contener secuencias de flaqueo que proceden de la misma especie vegetal de la planta diana, incluyendo las procedentes del tabaco.

Método para Construir el Vector Universal.

5 La solicitud proporciona además un método para construir el vector universal de integración y de expresión de cloroplastos. Para ello, se determina una porción espaciadora del genoma de cloroplastos de cualquier planta, de forma que sea altamente homóloga con más de una especie de plantas. A partir del genoma de los cloroplastos identificado se obtiene (o se sintetiza) una secuencia nucleotídica que corresponde a la región espaciadora, y se incorpora en un vector adecuado, tal como mediante subclonación en un plásmido. La región espaciadora se coloca como secuencias de flaqueo del casete de expresión, que comprende los elementos genéticos necesarios para la transformación del plastidio y la expresión del gen o genes extraños.

10 Se puede usar cualquier método de transformación del cloroplasto. Para la transformación con el vector universal, es adecuado cualquier gen (o porción funcional del mismo) que se pueda utilizar para transformar un cloroplasto vegetal y codificar un péptido deseado para conferir el rasgo deseado a la planta diana.

Plantas Transformadas.

15 La descripción proporciona además plantas en las que el genoma del cloroplasto se ha transformado establemente, esto es, permanentemente, con el vector universal de la invención, incluyendo su descendencia.

20 La descripción incluye plantas monocotiledóneas, como cereales, o células vegetales, tales como maíz, arroz, cebada, avena, trigo y hierbas, y su descendencia en la que el genoma de los cloroplastos se ha transformado establemente con el vector universal derivado de la misma especie o de una especie diferente de la planta transformada. La descripción proporciona plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas, transformadas establemente tras una única ronda de selección, debido a homoplasma obtenible con el vector universal que comprende un origen de replicación (*ori*) del cloroplasto. La descripción también proporciona plantas establemente transformadas de especies diferentes, incluyendo variedades de la misma especie, géneros, familias, órdenes, y divisiones de plantas.

25 Una planta en la que el genoma de los cloroplastos se ha transformado establemente con uno o más genes extraños de interés incluye plantas maduras y su descendencia, como plantones y embriones. El término "planta", en este contexto, también incluye porciones de plantas, tales como explantes como esquejes, cultivos de tejidos, suspensiones de células, y callos.

Se incluyen plantas multicelulares transformadas establemente, su descendencia, la semilla, y los plastidios transformados, por ejemplo el cloroplasto, etc., y el método para regenerar las plantas transformadas.

30 En esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones, cuando se hace referencia a diferentes "especies", el término "especie" se refiere no sólo a la "especie" sino a variedades dentro de una especie, géneros, familias, orden y divisiones del reino vegetal. De este modo, se entiende que un vector universal, que se puede usar para transformar plantas de diferentes especies, es capaz de transformar plantas de diferentes variedades dentro de una especie, diferentes géneros, diferentes familias, diferentes órdenes, y diferentes divisiones. El término "planta" (o "plantas") pretende ser genérico como se usa aquí.

Expresión de Productos No Vegetales

Genes Biopolímeros.

Además, usando el vector universal de integración y de expresión, la descripción proporciona plantas transformadas con un gen biopolímero sintético que codifica polímeros a base de proteínas (PBPs) biodegradables.

40 Estos polímeros tienen propiedades importantes de importancia práctica, según se discute en lo sucesivo.

Producción de Moléculas de Gran Valor – Moléculas Biológicamente Activas.

45 El descubrimiento fascinante de que la transformación con un gen sintético que no necesita tener un análogo natural en la planta o en el animal, para producir PBPs, es factible, ha demostrado la amplia aplicabilidad del vector en aún otro campo del esfuerzo humano: la producción de moléculas biológicamente activas, como productos farmacéuticos, en plantas, a partir de cualquier gen o fracción funcional del mismo, sintético o natural.

50 Se describe además el uso de plantas transformadas como biorreactores (como factorías) para productos biofarmacéuticos. Hay al menos dos capacidades a menudo necesarias para la producción de proteínas de valor farmacéutico, no posibles en sistemas procariontes. Las plantas, a diferencia de las bacterias, son capaces de producir la proteína extraña en una conformación activa biológica. También, las plantas a menudo son más tolerantes a la alteración de sus rutas biosintéticas. De este modo, las plantas se pueden transformar con un gen no funcional en (o extraño a) las plantas, que puede ser sintético o no, que puede ser normalmente funcional (competente) en animales (mamíferos), en ovíparos, en peces u otras especies.

La descripción proporciona además plantas transformadas que comprenden un gen provisto de un casete de expresión, preferiblemente de un vector universal, que codifica una variedad de productos deseados, especialmente moléculas biológicamente activas como péptidos (polipéptidos), proteínas, insulina, seroalbúmina humana (HSA), y otras moléculas descritas adicionalmente en lo sucesivo. Se deja o se provoca que las plantas crezcan, y los productos se aíslan de la cosecha transformada, como tabaco, maíz, etc., y, si es deseable, se cosechan primero y, si es necesario, se purifican.

Tolerancia a Herbicidas.

La descripción proporciona además plantas transgénicas resistentes a herbicidas en las que se integra, preferiblemente de forma estable, un transgén extraño, que confiere resistencia a uno o más herbicidas, en el genoma de cloroplastos por medio del vector universal. Son de particular importancia las plantas transformadas que muestran resistencia a glifosato y de este modo son resistentes a "ROUNDUP™", un herbicida comercialmente disponible de Monsanto Company. El vector universal proporciona un medio eficaz para transformar el genoma de cloroplastos de cualquier planta, y para conferir resistencia (o tolerancia) a cualquiera de los productos químicos herbicidas.

Un aspecto diferente de la descripción proporciona un método para transformar una planta mediante un casete de expresión, preferiblemente mediante el vector universal, para provocar que produzca un rasgo (o fenotipo) no buscado (secundario u otro). [Véase, por ejemplo, Penazloza, V., et al. (1995), quien da a conocer que la expresión mediante el gen de higromicina β -fosfotransferasa confiere resistencia al herbicida glifosato].

En otro aspecto de la descripción, la tolerancia a los herbicidas se usa como un gen marcador para la transformación de cloroplastos.

Resistencia a Insectos.

Un aspecto adicional de la descripción proporciona resistencia a los insectos. Con la creciente preocupación por el uso de plaguicidas químicos, se ha apoyado ampliamente el uso de formulaciones de *Bacillus thuringiensis* (Bt). El *Bacillus thuringiensis* proporciona muchos tipos de inclusiones cristalinas que son tóxicas para los insectos. Las proteínas que comprenden estas inclusiones se han categorizado basándose en la clase de hospedante insecticida, y en la homología de las proteínas. Las toxinas CRYI y CRYII tienen actividad insecticida frente a lepidópteros, o lepidópteros y dípteros, respectivamente. Las protoxinas CRYI tienen un tamaño de 130-135 kDa que se escinden enzimáticamente en proteínas de 65 kDa para la actividad insecticida. La protoxina CRYII tiene un tamaño de 65 kDa, con una proteína con una masa molecular de 60-62 kDa para la actividad insecticida. Muchas plagas de insectos comercialmente importantes (especialmente en la familia Pyralidae) son susceptibles a la toxina CryIIA, incluyendo el barrenador europeo del maíz, *Ostrinia nubilalis*, el barrenador menor del tallo del maíz, *Elasmopalpus lignosellus*, el barrenador de la vaina de la judía de vaca, *Maruca testulalis*, el cogollero del tabaco, *Heliothis virescens*, el gusano de cuerno del tabaco, *Manduca sexta*, y la lagarta peluda, *Lymantria dispar*, Daniell et al. 1994.

Sin embargo, las formulaciones de Bt no han sido tan eficaces como se anticipó, principalmente debido a su susceptibilidad a la radiación UV, al recubrimiento inadecuado, y al alcance caro y limitado de los hospedantes. Por lo tanto, es tentador el suministro de toxinas de Bt vía plantas transgénicas con Bt.

Se ha producido el control aceptable de insectos con el algodón nuclearmente transgénico con Bt frente al cogollero del tabaco, *Heliothis virescens*, pero estas plantas no expresan suficiente toxina de Bt para controlar al gusano del capullo del algodón, *Helicoverpa zea*. Adicionalmente, estos genes de Bt se pueden cruzar con especies vegetales relacionadas, vía el polen. Para evitar estas preocupaciones, se ha evaluado la transformación y la expresión de cloroplastos debido a las siguientes razones. 1) Las células vegetales que contienen cloroplastos pueden contener hasta 10.000 copias de genes por célula, 2) los cloroplastos pueden leer el ADN bacteriano intacto, incluyendo operones, y 3) los genomas de los cloroplastos se heredan de forma materna y, por lo tanto, se elimina drásticamente el escape de genes extraños vía el polen, debido a que el ADN de los cloroplastos se degrada generalmente en el polen.

Se escogió la CRY2A debido a que la CRY2A es relativamente no homóloga con CRYIA y, por lo tanto, sólo muestra una ligera resistencia cruzada frente a algunas poblaciones de *H. virescens* resistentes a CRYIA. Debido a que la CRY2A está "naturalmente truncada", se pueden lograr niveles elevados de expresión sin sacrificar la región 3'.

En consecuencia, se ha proporcionado resistencia al genoma de cloroplasto del tabaco, transformado con un vector universal de la invención, frente a insectos normalmente susceptibles a toxinas de Bt, y también frente a insectos que han desarrollado resistencia o menor susceptibilidad a las toxinas de Bt. Los insectos que jamás habían sido exterminados mediante cualquier toxina CRY mostraron una mortalidad del 100% en el tabaco transformado.

Por lo tanto, la expresión de *cry2A*, en una planta, sería una herramienta valiosa para controlar múltiples plagas de insectos a la vez que se supera el desarrollo de resistencia a Bt. Otras proteínas insecticidas, tales como colesterol oxidasa, que exterminan al picudo del algodónero mediante un mecanismo diferente, se expresan en niveles elevados en los cloroplastos.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 5 La Figura 1 muestra un mapa del genoma del cloroplasto del tabaco. Las líneas gruesas en el mapa genómico representan las regiones repetidas invertidas del genoma del cloroplasto. Las flechas etiquetadas "UV" representan las secuencias de inserción para la realización preferida del vector universal de integración y de expresión (UV); la flecha etiquetada "TV" representa la secuencia de inserción para el vector del tabaco (TV).
- La Figura 2A muestra el vector del cloroplasto del tabaco (TV), pZS-RD-EPSPS, para la expresión de la resistencia a herbicidas .
- La Figura 2B muestra el vector universal de expresión y de integración de cloroplastos (UV), pSBL-RD-EPSPS, para la expresión de resistencia a herbicidas.
- 10 La Figura 3A muestra el vector universal de integración y de expresión de cloroplastos, pSBL-CG-EG121, para la expresión de biopolímeros.
- La Figura 3B muestra el vector de integración y de expresión del tabaco, pZS-CG-EG121, para la expresión de biopolímeros.
- 15 La Figura 4A-4E muestra la homología de secuencias de las regiones espaciadoras entre el tabaco y otras especies de cosechas. Se muestra mediante flechas un sitio para la inserción de genes extraños. En dirección 5' del sitio para la inserción de genes extraños, se muestra el sitio de un origen de la replicación (*ori*).
- La Figura 4F-4G muestra la alineación de secuencias de la región espaciadora (64 pb) del ADN_r 16S-23S de varias especies de cosechas con la secuencia del cloroplasto del tabaco, en la que (+) representa la hebra positiva y (-) la hebra negativa, respectivamente.
- 20 Las Figuras 5A-C muestran la construcción del borde del vector pSBL-CT.
- Las Figuras 6A-C muestran la construcción del casete del gen marcador seleccionable del vector pSBL-CtV1, casete el cual contiene un promotor (P_{rrn}) de ARN_r 16S de cloroplasto, el gen *aadA*, y una región no traducida 3' del gen *psbA* del cloroplasto.
- Las Figuras 7A-7D muestran los vectores pSBL-CtV2, pSBL-CtV3, pSBL-CtVH, pSBL-CtVHF, respectivamente.
- 25 La Figura 8A-B muestra los vectores pSBL-CtVHbT y pSBL-CtVHbTR, respectivamente.
- La Figura 9 muestra las plantas de tabaco transformadas y no transformadas que crecen en presencia de espectinomicina, indicando la selección no letal en el medio (500 µg/ml). Nótese el crecimiento de las hojas transformadas (blanqueadas) y no transformadas (verdes).
- Las Figuras 10A-10G muestran la transformación y regeneración de plastidios de maíz.
- 30 La Figura 11 muestra la transformación de plastidios de maíz. Las plantas de maíz transformadas crecen normalmente (brote del centro), mientras que las plantas no transformadas mueren en el medio letal, confirmando la selección letal mediante el antibiótico (1000 µg/ml de espectinomicina).
- Las Figuras 12A-12F muestran la transformación y regeneración de plastidios de arroz.
- Las Figuras 13A y 13B muestran el análisis mediante PCR de ADN aislado de las hojas de transformantes de arroz.
- 35 La Figura 14 muestra la transformación de plastidios de cacahuete. Las plantas de cacahuete transformadas crecen normalmente (en el centro y en la parte izquierda de la placa), mientras que las plantas no transformadas mueren en el medio letal (500 µg/ml de espectinomicina).
- La Figura 15 muestra la transformación de plastidios de haba de soja. Dos plantas transformadas muestran brotes, y las otras plantas mueren en el medio letal, confirmando la selección letal mediante el antibiótico (500 µg/ml de espectinomicina).
- 40 La Figura 16 muestra la transformación de embriones de boniato en el medio de selección letal (500 µg/ml de espectinomicina).
- La Figura 17 muestra la transformación de células de uva. Las células del cultivo transformadas se pusieron verdes, mientras que las células no transformadas mueren en el medio de selección letal (500 µg/ml de espectinomicina).
- 45 La Figura 18 muestra la expresión de biopolímero a base de proteína (PBP) mediante los vectores de integración y de expresión de cloroplasto en *E. coli*.

La Figura 19 muestra el análisis de transferencia Southern realizado con los transformantes procedentes de plantas transgénicas con PBP, usando el vector del tabaco (TV). Las sondas procedían de secuencias de borde de cloroplastos (A) o procedían de secuencias génicas polímeras (EG121) (B).

5 La Figura 20 muestra el análisis de transferencia Southern realizado con los transformantes procedentes de plantas transgénicas productoras de PBP, usando el vector universal (UV). Las sondas procedían de las secuencias del borde de los cloroplastos (A), o procedían del gen *aadA* (B).

La Figura 21A muestra los niveles de transcrito del gen extraño analizados mediante transferencia northern usando ARN total aislado de los transformantes de los cloroplastos, del control, y de una planta de tabaco transgénica nuclear que expresa de forma elevada el gen del biopolímero sintético (EG121).

10 La Figura 21B muestra el aumento de las líneas 4-7 de la Figura 21A.

La Figura 22 muestra el análisis de transferencia Western de proteína polímera purificada procedente de plantas transgénicas.

La Figura 23A muestra la mayor velocidad de crecimiento de *E. coli* que contiene el vector del tabaco con el gen de EPSPS.

15 La Figura 23B muestra la mayor velocidad de crecimiento de *E. coli* que contiene el vector universal con el gen de EPSPS.

Las Figuras 24A-24B muestran la integración de genes extraños en el genoma de plastidios mediante PCR usando los cebadores *rbcL* y *aadA* (A), o los cebadores 16SRNA y *aadA* (B).

20 Las Figuras 25A-25C muestran la integración del gen *aroA* en el cloroplasto mediante análisis de Southern, y la elevada generación de homoplasmia usando la sonda de EPSPS (A) o la sonda *rbcL-orf512*. El sitio de integración se muestra en (C).

Las Figuras 26A y 26B muestran la generación de semillas recogidas a partir de plantas de tabaco del control y de plantas de tabaco transformadas, respectivamente, en presencia de los marcadores seleccionables.

Las Figuras 27A y 27B muestran plantas de tabaco transgénicas y del control pulverizadas con glifosato.

25 Las Figuras 28A y 28B muestran la susceptibilidad del tabaco (control) y resistencia (transformadas) a insectos.

La Figura 29 muestra la proteína total (análisis de transferencia Western) aislada a partir de plantas de tabaco del control y de plantas de tabaco transgénicas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

El Vector Universal de Integración y de Expresión.

30 El vector universal de integración y de expresión como se describe aquí es competente para transformar de forma estable cloroplastos de diversas plantas diana diferentes. Se pueden proporcionar en el casete secuencias codificantes de ADN heterólogo para codificar un fenotipo, tal como resistencia a herbicidas, resistencia a insectos, u otros rasgos. El vector comprende además una secuencia de flanco a cada lado de la secuencia codificante de ADN, que es homóloga a una secuencia espaciadora del genoma del cloroplasto, secuencia espaciadora la cual se
35 conserva en los genomas de los cloroplastos de plantas diferentes. De esta manera, se facilita la integración estable del gen heterólogo en el genoma del cloroplasto de la planta diana a través de la recombinación homóloga de las secuencias del borde de flanco con secuencias espaciadoras complementarias, en el genoma del cloroplasto. El vector universal es competente para transformar cualquier especie vegetal.

40 Se ha encontrado que la región espaciadora de *trnI* y *trnA* se conservan enormemente en una gran variedad de especies vegetales, desde cianobacterias hasta plantas superiores, tales como monocotiledóneas y dicotiledóneas. Los genes *trnI* y *trnA* flanquean a cada lado una región espaciadora, denominada como región espaciadora 2 o región "espa 2" (Figura 4F-4G). Las regiones en un lado u otro de la región espaciadora tienen igualmente una homología casi perfecta con las regiones correspondientes entre especies de plantas desde cianobacterias hasta plantas superiores, excepto que las plantas superiores contienen dos intrones en los genes *trnI* y *trnA*. Unas
45 secuencias del borde más largas tienden a favorecer una integración más eficaz del ADN extraño. Por lo tanto, aunque no es esencial, la homología entre especies de los genes *trnI* y *trnA*, además de la homología de la región espaciadora, contribuye a la eficacia de la transformación y de la integración (Figura 4A-4E).

50 Si se incorporan en el vector secuencias del borde más largas, que incluyan porciones no homólogas, la porción no homóloga de la secuencia "formará un bucle" y "se cortará" en el proceso de recombinación, y no se integrará en el genoma del cloroplasto diana.

Se pueden construir diferentes vectores universales con la región espaciadora. Por ejemplo, se pueden constituir secuencias de flaqueo más cortas o más largas, con parte o con todos los genes *trnA* y *trnI* adyacentes a “espa 2”.

5 Un vector universal preferido comprende las secuencias de flaqueo y un casete de expresión que comprende los siguientes elementos genéticos para proporcionar la transcripción y la traducción de la secuencia codificante de ADN, organizado en el siguiente orden (desde el extremo 5' hasta el extremo 3'): una parte 5' de la secuencia de flaqueo, un promotor funcional en el cloroplasto, una secuencia de ADN con un sitio o sitios de clonación apropiados para la inserción de una o más secuencias codificantes para el fenotipo deseado o la molécula de interés, y para un marcador seleccionable, un terminador de la transcripción y una parte 3' de la secuencia de flaqueo. Se puede cambiar el orden de las secuencias de ADN que codifican el fenotipo deseado y el marcador seleccionable. Se pueden proporcionar secuencias de ADN vegetal de flaqueo adicionales para promover la integración estable. Preferiblemente, la secuencia de flaqueo comprende un origen de replicación (*ori*).

En una ilustración particular, la región espaciadora muy conservada reside en la repetición invertida del genoma del cloroplasto. Sin embargo, la localización particular del espaciador en el genoma del cloroplasto no es tan importante como su elevada homología con la región espaciadora de plantas diferentes.

15 Además, como se puede observar en las Figuras 4F-4G, la secuencia espaciadora 2 (o espa 2), que tiene una longitud de 64 pb, es demasiado corta para incluir el genoma *ori* del cloroplasto, que se encuentra en dirección 5' de ese espaciador. Si se desea incluir el *ori*, se seleccionará una secuencia espaciadora más larga, que englobe al *ori*, que incluirá la secuencia espaciadora y una secuencia adicional en las secuencias de flaqueo. Esto proporcionará un molde más largo para la recombinación homóloga en el genoma del cloroplasto del receptor, y promoverá la homoplasma.

Otro vector preferido es aquel en el que las secuencias de flaqueo comprenden, cada una, además de la región espaciadora 2, una porción o toda la región espaciadora intergénica entre los genes ARN^t^{le} y ARN^t^{Ala} del genoma del cloroplasto (Figura 4A-4E). Además, las secuencias de flaqueo pueden incluir parte o todos los genes ARN^t^{le} y ARN^t^{Ala}, respectivamente. De forma opcional, las secuencias de flaqueo comprenden, cada una, parte o todas las secuencias génicas de ARNr 16S y/o 23S.

Vectores Universales Ilustrativos.

Un vector universal preferido comprende una secuencia de ADN que comprende la secuencia de la región espaciadora 2 entre los genes *trnI* y *trnA* altamente conservados, entre los genes de ARNr 16S-23S del genoma del cloroplasto. Preferiblemente, esta región comprende parte o toda la secuencia de ADN (Figura 4F-4G) de los genes *trnI* y *trnA*. Esa región se corta por escisión a partir de una planta seleccionada, como el tabaco, y se subclona en el plásmido habitualmente disponible, como pUC19, por ejemplo en el sitio de PvuII. En el plásmido se inserta el casete de expresión que contiene un gen marcador seleccionable, un promotor de ARNr 16S del cloroplasto, un gen que codifica una enzima que confiere una resistencia a un antibiótico, como el gen *aadA* que codifica aminoglicósido-3'-adenil-transferasa, que confiere resistencia a estreptomycin/espectinomycin, y una región no traducida 3' del gen *psbA* del cloroplasto.

Específicamente, cuando se construyó un vector universal con el plásmido pSBL-Ct-bor (Figura 5), se insertó en el plásmido un casete de gen marcador seleccionable que contiene un promotor de ARNr 16S del cloroplasto, el gen *aadA* que codifica aminoglicósido-3'-adenil-transferasa, que confiere resistencia a estreptomycin/espectinomycin, o un gen de resistencia a herbicidas, y una región no traducida 3' del gen *psbA* del cloroplasto (Figura 6). Este casete de gen marcador seleccionable se insertó entonces en el borde universal, en dos orientaciones diferentes. En el vector pSBL-CtV1, el casete del gen marcador seleccionable se insertó en el gen *trnI* (Figura 6A). En el vector pSBL-CtV2 (Figura 7A), el casete del gen marcador seleccionable se insertó entre los genes *trnI* y *trnA*, en la región espaciadora, en la dirección de la transcripción del ARNr 16S. En el vector pSBL-CtV2 R (mapa no mostrado), el casete del gen marcador seleccionable se insertó entre los genes *trnI* y *trnA*, en la región espaciadora, en la dirección opuesta de la transcripción de ARNr 16S.

Se han insertado varios genes de interés en el vector pSBL-CtV2, una realización preferida del vector universal. Por ejemplo, el vector pSBL-CtV3 (Figura 7B) contiene el gen informador mGFP que codifica una proteína fluorescente verde, aislada de la medusa. Este gen también puede ser útil para la selección visible de plantas transformadas, o en horticultura ornamental, por ejemplo en cosechas ornamentales como árboles de Navidad o incluso en el césped, que puede brillar con fluorescencia verde al iluminarlo con luz azul.

El vector pSBL-CtVH (Figura 7C) contiene un marcador seleccionable diferente, la higromicifosfotransferasa (gen de *hph* accionado por el promotor del gen *atpB* del cloroplasto), que confiere resistencia al antibiótico higromicina. Este vector se puede usar para transformar plantas que son resistentes a otros antibióticos, y es particularmente útil para transformar monocotiledóneas, que generalmente son resistentes a otros antibióticos usados habitualmente. Este gen puede conferir rasgos adicionales, tales como resistencia a herbicidas, un rasgo no buscado.

El vector pSBL-CtVHF (Figura 7) contiene los genes GFP y *hph*, que se puede usar para la selección letal, o una combinación de selección letal/visible.

Un Vector de Cloroplastos Específico para Tabaco y un Vector Universal de Cloroplasto.

El vector pZS-RD-EPSPS de cloroplastos del tabaco (Figura 2A) ("TV") y el vector universal pSBL-RD-EPSPS (Figura 2B) ("UV") contienen ambos el promotor Prn (del ARNr 16S), el gen *aadA* (para la selección de espectinomicina), el gen *aroA* mutante, que codifica la enzima EPSPS sintasa (para la selección de glifosato), y la región 3' de *psbA*. Las secuencias de flaqueo, en pZS-RD-EPSPS, contienen *rbcL* y *orf 512*, y en pSBL-RD-EPSPS contienen los genes *trnI* y *trnA* que facilitan la integración en la región de copia individual grande (Figura 1 en la flecha "TV"), o en las regiones repetidas invertidas (Figura 1 en las flechas UV), del genoma de cloroplastos del tabaco, respectivamente.

El glifosato es el ingrediente activo en el herbicida de Monsanto ROUNDUP™, y se usa como un marcador seleccionable para la selección de plantas transgénicas mediante herbicidas.

Construcción de Vectores de Cloroplastos.

Se usaron protocolos estándares para la construcción de vectores, incluyendo el Klenow que llena la desfosforilación. En la Figura 2A se muestra el vector de expresión pZS-RD-EPSPS de cloroplastos del tabaco. En la Figura 2B se muestra el vector universal pSBL-RD-EPSPS de cloroplastos. La construcción de estos vectores se muestra adicionalmente en los ejemplos. Ambos plásmidos se amplificaron en la cepa XL1 Blue de *E. coli*. Se registraron curvas de crecimiento en medio mínimo M-9. Ambos vectores se usaron para la selección en glifosato, para confirmar la resistencia a ROUNDUP™.

El vector de expresión pZS-RD-EPSPS de cloroplastos es específico para el tabaco, y ya se ha señalado que no es útil para transformar otras plantas (Maier et al., 1995). Por el contrario, el vector universal pSBL-RD-EPSPS (Figura 2B) de expresión y de integración de cloroplastos es competente para transformar genomas de cloroplastos de numerosas especies vegetales, debido a la universalidad del vector como se describe anteriormente. El vector universal integra genes extraños en la región espaciadora 16S-23S del genoma del cloroplasto. El vector universal usa, como secuencias de blanqueo para la recombinación homóloga, los genes *trnA* y *trnI* (los ARNs de transferencia de cloroplastos que codifican alanina e isoleucina), procedentes de la región repetida invertida del genoma del cloroplasto. La secuencia de borde de cloroplasto usada en esta invención también contiene el origen de replicación (*oriA*) de cloroplastos, según se confirma en varias especies de cosechas incluyendo el guisante (Nielsen et al., 1993) y el tabaco (Lu et al., 1996), lo que puede explicar la homología de secuencia altamente conservada en esta región. Este origen de replicación proporciona un aumento del número de moldes del plásmido para la integración eficaz en el genoma del cloroplasto del receptor, y lograr la homoplasma.

Como se ha demostrado anteriormente, en la construcción del vector universal, se inserta un gen marcador seleccionable, que confiere resistencia a un antibiótico (u otro marcador seleccionado), un gen que codifica la molécula diana, y los otros elementos (como se describe aquí), en un sitio de restricción conveniente en el fragmento de ADN que contiene la región espaciadora. Si se desea, el gen extraño que codifica la molécula diana se puede insertar en el casete de expresión tras la inserción del casete en el fragmento de ADN que contiene la región espaciadora conservada, de forma que, antes de la inserción, el casete incluirá múltiples sitios de clonación para la inserción de una o más secuencias codificantes de ADN.

La posición del sitio de restricción en la secuencia espaciadora puede determinar la longitud respectiva de las dos secuencias de flaqueo, que serán fracciones (de igual o diferente longitud) de la región espaciadora. De este modo, las dos secuencias de flaqueo no necesitan ser idénticas en longitud en tanto cada una contenga suficiente complementariedad con el genoma del cloroplasto diana para promover la recombinación homóloga.

Debido a que el vector de la invención tiene tal grado elevado de homología con la región espaciadora de los genomas de los cloroplastos de múltiples especies de plantas, es competente para transformar no sólo las especies de plantas a partir de las cuales deriva la secuencia borde del vector, sino cualquier especie vegetal.

Como se usa en esta memoria descriptiva, el término "homólogo" significa que una secuencia de ADN procedente de una especie vegetal posee regiones de identidad de secuencia con porciones de una secuencia de ADN procedente de otra especie vegetal. Esto es, si dos secuencias de ADN son muy homólogas, la especie de ADN puede tener una identidad de secuencia del 100%, o una identidad menor que el 100%. Por ejemplo, para los fines de la integración del genoma del cloroplasto, se considera que una secuencia de 400 pb, que en conjunto sólo es homóloga en un 25%, pero que contiene una porción de 100 pb que es homóloga en un 85% hasta 90% o más, es altamente homóloga con el genoma del cloroplasto.

También se ha demostrado que es beneficiosa la inclusión de un *ori* del cloroplasto dentro de las secuencias de flaqueo del vector universal. Sin estar sujeto por la teoría, se cree que la presencia del *ori* en el vector universal promueve la homoplasma después de una única ronda de selección, sin la necesidad de una segunda etapa de selección. Esto es especialmente importante en la transformación de plantas monocotiledóneas, tales como maíz o arroz, en las que no es factible una segunda etapa de selección debido a la dificultad de hacer crecer estas plantas en cultivo procedente de esquejes de hojas, con la necesidad resultante de hacer crecer estas plantas a partir de embriones. Si se desea un *ori* pero falta, se puede introducir en una secuencia de flaqueo o en cualquier otra parte. Si se desea aumentar el número de copias del vector universal introducido, se insertará un fragmento de ADN del

cloroplasto, que contiene un *ori*, fuera de las secuencias de flaqueo, de forma que funcionará sólo para amplificar el número de copias del vector universal, y no se integrará en el genoma del cloroplasto.

En oposición a derivarlas a partir de una planta específica, las secuencias de flaqueo se pueden derivar a partir de una región espaciadora obtenida sintéticamente como se muestra más abajo.

- 5 Para la transcripción y traducción de la secuencia de ADN que codifica el polipéptido de interés, se usa toda la región promotora procedente de un gen capaz de expresarse en el cloroplasto. La región promotora puede incluir promotores obtenibles a partir de genes de cloroplastos, tales como el gen *psbA* de la espinaca o del guisante, la región promotora de *rbcL* y *atpB* del maíz, y los promotores de ARNr. En la patente n° 5.693.507 también se describen promotores competentes, y se identifican otras fuentes de bibliografía.
- 10 Las secuencias de flaqueo mostradas por la patente n° 5.693.507 y las otras publicaciones, para promover la integración estable, no son las secuencias de flaqueo del vector universal de expresión y de integración descrito aquí, que se conservan de forma elevada de una especie vegetal a otra, mientras que no lo hacen las secuencias de flaqueo de esa patente ni de las otras publicaciones.

Identificación de Secuencias Espaciadoras Intergénicas.

- 15 La descripción proporciona métodos para identificar secuencias espaciadoras intergénicas no transcritas apropiadas en plantas, que son apropiadas para construir los vectores universales. El método comprende aislar ADN genómico de plastidios, llevar a cabo la hibridación con una sonda marcada radiactivamente de un espaciador conocido, detectar y aislar las secuencias del plastidio que muestren el grado deseado de homología con la sonda. Como ilustración, para determinar si un genoma de plastidio, de estructura y de secuencia desconocida, posee la región espaciadora, se llevan a cabo transferencias Southern utilizando como sonda la región espaciadora del tabaco. El ADN genómico del plastidio se aísla y se rompe por escisión mediante una enzima de restricción apropiada, según procedimientos bien probados. La hibridación con la sonda espaciadora se realiza tanto en condición restrictiva (por ejemplo, formamida al 50% a 68°C, lavado en 0,1 X SSC a 68°C) como en condición no restrictiva (por ejemplo, 6 X SSC, a 68°C, lavado en 2 X SSC a 50°C) (1 X SSC es NaCl 0,15 M, citrato de sodio 0,015 M), para detectar las secuencias de plastidios que muestren una homología aproximadamente del 90-100% o un 60-100% con el espaciador del tabaco, respectivamente. Después, se aíslan las secuencias identificadas de los plastidios. Si el requisito de recombinación homóloga es más permisivo, puede ser satisfactorio un grado menor de hibridación con la sonda, tal como alrededor de 60%.
- 20
- 25

- 30 De este modo, cualquier región espaciadora conocida o desconocida, de suficiente homología para la recombinación, es adecuada para la construcción del UV. Igualmente, se puede usar la secuencia conocida de cualquier secuencia espaciadora intergénica altamente conservada para identificar y aislar secuencias de plastidios que sean homólogas con una secuencia espaciadora conocida.

Como alternativa, se puede usar el programa BLAST, como se describe aquí anteriormente, para identificar las regiones altamente conservadas en genomas de plastidios de los que se conocen las secuencias.

- 35 Plantas que se Pueden Transformar.

- Las plantas que se pueden transformar mediante el vector universal como se describe aquí incluyen cualquier planta inferior, tal como cianobacterias, cualquier planta superior, tales como especies vegetales monocotiledóneas y dicotiledóneas. Las plantas a transformar pueden ser plantas solanáceas o plantas que crecen bajo tierra. Una lista no exclusiva de ejemplos de plantas superiores que se pueden transformar con el vector universal incluye cereales tales como cebada, maíz, avena, arroz y trigo, cucurbitáceas tales como pepino, melón y sandía; legumbres tales como alubia, judía de vaca, guisante, cacahuete; cosechas de oleaginosas tales como colza (cánola) y haba de soja; plantas solanáceas tales como tabaco; cosechas de tubérculos tales como patata y boniato; y vegetales como tomate, pimiento y rábano; frutas tales como pera, uva, melocotón, ciruela, plátano, manzana, y fresa; cosechas de fibras como las del género *Gossypium*, tales como algodón, lino y cáñamo, y otras plantas tales como remolacha, algodón, café, rábano, plantas florales comerciales tales como clavel y rosas; herbáceas tales como caña de azúcar o césped; árboles de hoja perenne tales como abeto, picea, y pino; y árboles de hoja caduca, tales como arce y roble. De mayor interés presente son las cosechas económicamente más importantes, como maíz, arroz, haba de soja, trigo y algodón. Ninguna de estas plantas, según se sabe hasta la presente, distintas del tabaco, nunca se ha transformado de forma estable vía el genoma de cloroplastos, y ninguna de ellas, incluyendo el tabaco, se ha transformado de forma estable mediante un vector universal como se describe aquí. Una planta a partir de la cual se obtiene frecuentemente la secuencia de ADN es el tabaco, debido a que es la planta más concienzudamente caracterizada, pero es adecuado cualquier otro genoma de cloroplastos.
- 40
- 45
- 50

Se recordará como se describe anteriormente que el vector usado para transformar de forma estable el tabaco no fue competente para transformar el genoma de cloroplastos de otras plantas.

- 55 Método para la Transformación.

Los casetes de expresión se pueden transformar en una célula vegetal de interés, mediante cualquiera de un número de métodos conocidos. Estos métodos incluyen, por ejemplo, los siguientes. La transformación mediante bombardeo con partículas de wolframio, la transformación mediada por polietilenglicol, el uso de un haz de láser, la electroporación, la microinyección, o cualquier otro método capaz de introducir ADN en un cloroplasto. Véase, por ejemplo, Sandford, 1988; Daniell, 1993; Daniell, 1997; Patente U.S. n° 5.693.507; Kin Ying et al., 1996. El uso de estas técnicas permite la aplicación a una variedad amplia tanto de plantas monocotiledóneas como dicotiledóneas.

Expresión de moléculas no Vegetales a Partir de Plantas Transformadas

La creciente utilidad del vector universal de expresión y de integración como se describe aquí se muestra claramente mediante la aptitud del vector para generar plantas transformadas para expresar moléculas no vegetales y valiosas.

Polímeros a base de Proteínas Biodegradables.

El vector universal se ha usado para transformar tabaco con un gen sintético que expresa polímeros a base de proteínas (PBPs). Tales polímeros, y los genes que los expresan, son conocidos en la bibliografía (Daniell, et al., 1997). Son de particular interés los polímeros a base de proteínas (PBP) que tienen secuencias pentámeras que se repiten, como GVGVP (Yeh et al., 1987). Estos polímeros PBP muestran una propiedad útil de transición a la temperatura de fase inversa. La proteína se hace insoluble cuando la temperatura se eleva por encima del estado de transición. Los PBPs ofrecen un amplio intervalo de materiales similares a los de los polímeros a base del petróleo, tales como hidrogeles, elastómeros, y plásticos. También muestran una extraordinaria biocompatibilidad, permitiendo de ese modo un intervalo completo de aplicaciones médicas que incluyen la prevención de adhesiones postquirúrgicas, reconstrucción de tejido y suministro programado de fármacos (Urry et al., 1993). Por la parte no médica, las aplicaciones potenciales incluyen el uso en transductores, máquinas moleculares, superabsorbentes y plásticos biodegradables (Daniell et al., 1997). Tales polímeros incluyen el polímero $(\text{Val}^1\text{-Pro}^2\text{-Gly}^3\text{-Val}^4\text{-Gly}^5)_n$ (VPGVP)_n, en el que "n" puede variar de 1 hasta centenares de unidades, como 250, o sus análogos. Las posibilidades comerciales importantes y los aspectos relacionables se discuten por Daniell, 1995. Los plásticos biodegradables útiles están fabricados a partir de PBP. Los genes que tienen estos PBP también son útiles en la invención por cuanto se pueden usar como soportes, es decir, el gen de una molécula de interés se puede fundir con el gen de PBP de la integración y expresión de cloroplastos.

En un estudio anterior, el gen de polímero sintético que codifica (GVGVP)₁₂₁ se hiperexpresó en *E. coli* hasta el grado en que los cuerpos de inclusión del polímero ocuparon casi el 80-90% del volumen celular (Guda et al., 1995; Daniell et al., 1997). El mismo gen también se expresó en el compartimento nuclear de células de tabaco cultivadas (Zhang et al., 1995) y en hojas de plantas transgénicas del tabaco (Zhang et al., 1996).

En un sistema modelo, se usó la región intergénica de los genes *trnI* y *trnA*, en la región espaciadora de ARNr 16S-23S del genoma del tabaco (Figura 1), para construir un vector universal para la integración del gen marcador seleccionable, gen *aadA*, y el gen de polímero sintético (EG121). El vector se insertó en la región repetida invertida del genoma del cloroplasto. Las plantas de tabaco transformadas expresaron un nivel elevado de la proteína polímera. También son transformables los genomas de cloroplastos de otras especies vegetales con el gen sintético para expresar el polímero a base de proteína, usando el vector universal.

Producción de Moléculas de Gran Valor.

Los estudios con el biopolímero han mostrado que se puede expresar un producto no vegetal mediante un gen sintético, haciendo posible de este modo, por medio de los vectores descritos, expresar moléculas biológicamente valiosas a partir de plantas transformadas con una gran variedad de secuencias codificantes de ADN. La secuencia codificante de ADN estará comprendida en un vector universal, o, si se desea, en un casete de expresión, como se describe anteriormente.

Se sabe que las plantas transgénicas producen moléculas valiosas biológicamente activas mediante transformación nuclear pero no vía la transformación de cloroplastos. Véase las siguientes referencias bibliográficas, todas las cuales se incorporan aquí como referencia. Daniell, 1995; Miele, 1997; Lyons, 1996; Daniell, y Guda, 1997; Arntzen, 1997.

Expresión de moléculas biológicamente activas.

Se pueden obtener plantas transformadas con el vector universal o con el casete de expresión para expresar moléculas valiosas biológicamente activas en partes de las plantas que contienen cloroplastos. Las plantas se recolectarán entonces mediante prácticas conocidas. Las plantas transformadas que contienen esos productos se pueden administrar así oralmente. Arntzen, 1997. La producción de productos farmacéuticos mediante plantas transgénicas se ha realizado con péptidos (proteínas) para muchas aplicaciones farmacéuticas, que incluyen vacunas, inmunomoduladores, factores de crecimiento, hormonas, proteínas de la sangre, inhibidores, y enzimas. Los productos biológicos típicos derivados de plantas transgénicas, que se han dado a conocer, incluyen vacunas contra enfermedades víricas; epítomos peptídicos víricos, como el virus de la inmunodeficiencia humana, epítomos peptídicos no víricos, proteínas antígenas bacterianas; péptidos bioactivos, toxinas recombinantes, anticuerpos

producidos por plantas (anticuerpos recombinantes), proteínas séricas, y metabolitos secundarios de las plantas. Todos estos productos se pueden expresar en cloroplastos de plantas transgénicas, según la invención.

5 Los péptidos o proteínas farmacéuticos típicos, producidos en plantas transgénicas, incluyen antígeno de superficie de la hepatitis B, proteína de la cápsida del virus de Norwalk, el virus de la glosopeda, el rinovirus 14 humano, el virus de la inmunodeficiencia humana, la proteína de superficie de *S. mutans*, la enterotoxina de *E. coli*, la subunidad B, epítomos del circumsporozoito malárico, epítomo de la proteína ZP3 del ratón (vacuna); el anticuerpo 6D4 catalítico del ratón, el anticuerpo monoclonal mAB Guy's 13 de ratón, el anticuerpo monoclonal mAB B1-8, la proteína de Fv antifitocrómica, la antisustancia P (anticuerpo); la seroalbúmina humana (HSA), la proteína C humana (proteína sérica); la α -tricosantina, la ricina (citotoxina); el factor de crecimiento epidérmico humano (factor de crecimiento); la leu-encefalina (neuropéptido) y la β -glucosidasa ácida humana (hGC) (enzima). Muchas de estas moléculas se han expresado en tabaco, tubérculos de patata, etc.

10 Es de particular interés la producción de insulina y seroalbúmina humana (HSA) con el vector universal de integración y expresión, o con un vector de expresión. La HSA ya se ha producido en plantas transgénicas (nucleares) de patata y de tabaco. Sijmons et al., 1990. Los productos mencionados anteriormente se pueden producir vía la transformación de cloroplastos como se describe aquí.

Insulina.

15 Se describe además un método para expresar insulina como una proteína de fusión polimérica a partir de una planta transformada. La planta se puede transformar con un casete de expresión o con el vector universal de integración y de expresión que comprende un gen biopolimérico sintético, como (GVGVP)₄₀. Una planta adecuada es el tabaco, debido a la facilidad de la manipulación mediante ingeniería genética y a la necesidad de encontrar usos alternativos de esta cosecha controvertida.

20 Para la expresión en bacterias, el método comprende construir un vector para la expresión en *E. coli* como una fusión del gen (GVGVP)₄₀ polímero con un gen proinsulínico, expresar las proteínas de fusión de polímero-insulina en *E. coli* (que se hace crecer de manera conocida), purificar la proteína recombinante utilizando las propiedades de transición de temperatura del polímero a base de proteína, y separar mediante ruptura la insulina del polímero, usando métodos bien conocidos.

25 Para la transformación en plantas, se introduce en una planta diana, como el tabaco, un casete de expresión o el vector universal de integración y de expresión, que comprende la fusión del gen polímero con el gen proinsulínico. La proteína de fusión de polímero-insulina se expresa en la planta, la proteína de fusión polimérica se extrae del cloroplasto y de los compartimientos citosólicos de las células vegetales, la insulina se separa mediante ruptura a partir de la proteína polimérica con ditioneitol (DTT) o con los otros métodos conocidos, y se recoge la insulina. Como alternativa, el producto de fusión de insulina-polímero se puede expresar en una cosecha comestible, o en partes comestibles de la cosecha.

30 La técnica de fusionar una secuencia de ADN, que codifica una molécula de actividad biológica, a un gen sintético que expresa un polímero a base de proteína para la expresión en un hospedante bacteriano o de levadura adecuado, o en una planta transformada, es un método muy prometedor de amplia aplicabilidad.

Seroalbúmina Humana Recombinante en Plantas.

35 Se ha producido seroalbúmina humana recombinante (rHSA), que es indistinguible de la proteína humana auténtica, en plantas transgénicas nucleares de tabaco y de patata (Sijmons et al., 1990). Esto demostró la expresión de una proteína valiosa en plantas transgénicas, pero también que fue posible lograr un procesamiento apropiado mediante fusión de HSA a una prosequencia de una planta que dio como resultado la separación mediante ruptura y la secreción de la proteína correcta. El genoma del cloroplasto de una planta seleccionada como el tabaco se puede transformar fácilmente con un vector universal como se describe aquí, y se puede hacer para expresar HSA.

Aplicabilidad General.

40 Como se describe aquí, el vector universal permite la transformación de plantas, hacer que la planta exprese una molécula biológica que puede proporcionar un fenotipo deseado a la planta y/o producir un producto deseado el cual puede tener, aunque no es necesario, actividad biológica (o un precursor para un producto final). La secuencia nucleotídica codificante puede ser sintética o natural. La molécula producida puede ser ajena a las plantas, no funcional en la planta, o funcional. El vector universal tiene amplias aplicaciones en el dominio de la transformación de plantas.

45 Se contempla que se puede producir cualquier molécula biológicamente activa (precursor o derivado de la misma) mediante planta transgénica transformada con el vector universal de la invención, con adaptaciones adecuadas según se requiera para un caso particular.

Tolerancia a Herbicidas de Plantas con Cloroplastos Transformados

Se describe además el uso del vector universal para conferir resistencia o tolerancia a herbicidas a las plantas. El avance de la tecnología de transferencia génica ha hecho posible la introducción de genes de resistencia a herbicidas en las plantas, haciendo de ese modo al herbicida selectivo para una cosecha particular.

Modificaciones de la Enzima Diana.

- 5 La primera etapa con respecto a este enfoque es la identificación y modificación necesaria de la enzima diana (gen) del herbicida para conferir tolerancia, lo cual se ha realizado de forma bastante extensa. El sulfometurón metilo es un herbicida de tipo sulfonilurea que bloquea el crecimiento de bacterias, levadura, y plantas superiores inhibiendo la primera enzima de la ruta de aminoácidos de cadena ramificada, la acetolactato sintasa (ALS). Los genes mutantes para ALS se aislaron de *E. coli* y de levadura que confieren resistencia a sulfometurón metilo. Yadav, et al. (1986).
 10 La resistencia a herbicidas en el tabaco, y en otras varias cosechas, se ha logrado mediante manipulación por ingeniería genética del gen de ALS. Gabard, et al. (1989); Miki, et al. (1990). Aún otro enfoque para manipular mediante ingeniería la resistencia a herbicidas en plantas ha sido la expresión de la enzima fosfinotricina acetil transferasa (PAT) que detoxifica el herbicida fosfinotricina. DeBlock, et al. (1987).

Glifosato.

- 15 El glifosato es un herbicida potente, de amplio espectro, que es enormemente eficaz contra hierbas anuales y perennes y contra malas hierbas de hoja ancha. El glifosato es medioambientalmente seguro puesto que se degrada rápidamente en el suelo, tiene una movilidad mínima en el suelo, y tiene muy poca toxicidad para las formas de vida no vegetales. El glifosato funciona uniéndose a la enzima 5-enol-piruvilshiquimato-3-fosfato (EPSP) sintasa, e inhibiéndola. La EPSP sintasa (EPSPS) cataliza la formación de EPSP, que es importante en la ruta de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos, a partir de shiquimato-3-fosfato y fosfato inorgánico. La nula toxicidad del glifosato con respecto a los animales es debido al hecho de que esta reacción se produce sólo en las plantas y en los microorganismos. Desafortunadamente, debido a que la reacción para formar EPSP se produce en todas las plantas, el glifosato no tiene selectividad entre malas hierbas y plantas deseadas, tales como cosechas y plantas ornamentales.
 20 Se han usado dos enfoques para intentar desarrollar una planta resistente al glifosato, mediante manipulación por ingeniería genética. Un enfoque se basa en la sobreproducción de EPSP sintasa de tipo salvaje, de forma que, después de la inhibición competitiva de EPSP sintasa por el glifosato, la EPSP sintasa residual confiere tolerancia a glifosato. El segundo enfoque se basa en la expresión de un gen mutante (*aroA*) que codifica la EPSP sintasa resistente a glifosato.
 25 En todos los ejemplos anteriormente mencionados, sin excepción, los genes resistentes a herbicidas se han introducido en el genoma nuclear.
 30

La Necesidad de la Transformación de Cloroplastos.

- 35 Existe una seria necesidad de desarrollar una planta resistente a herbicidas, particularmente una planta resistente a los herbicidas más ampliamente usados, en la que la proteína que confiere resistencia al herbicida se produce en el cloroplasto, y en la que el gen que confiere resistencia a herbicidas no pueda escapar al medioambiente a través del polen.

- 40 El vector universal de la invención responde a esta necesidad mediante transformación de cualquier planta diana para proporcionar tolerancia a cualquier herbicida seleccionado, como el glifosato. Las cosechas comerciales importantes, como el trigo, el arroz, el maíz, la soja, se pueden hacer resistentes a un herbicida seleccionado por medio del vector universal.

- 45 La descripción proporciona una planta transgénica resistente a herbicidas en la que se integra, en el genoma del cloroplasto, un transgén extraño que confiere resistencia a uno o más herbicidas, por medio del vector universal. La planta transgénica puede ser una planta madura, una planta inmadura, tal como un plantón, un embrión, un callo, un tejido cultivado, o una suspensión celular, o una porción de una planta tal como un esqueje o un callo. Los herbicidas que son adecuados para la invención, para los cuales los genes que confieren resistencia se pueden integrar de forma estable en el genoma de cloroplastos, incluyen todos los herbicidas conocidos (y también aquellos por desarrollar).

Clase de Herbicidas.

Los herbicidas controlables mediante la invención se han agrupado generalmente en varias clases químicas.

- 50 Una primera clase incluye los herbicidas de PSII (fotosistema II) que interfieren con la reducción de plastoquinona en el sitio aceptor de PSII, que incluyen productos químicos tales como triazinas, triazinonas, derivados de urea, biscarbamatos, nitrilos, nitrofenoles, piridazinonas sustituidas, fenilcarbamatos, anilidas, cianoacrilato, DCMU, carboanilidas, uracilos, específicamente por ejemplo diclorofenildimetilurea, atrazina, metribuzina, lenacilo, fenmedifam, ioxinilo y dinoseb. Estos productos químicos se unen a una proteína de unión de 32 kDa (la proteína Q_B, D1, proteína de unión a herbicida) en la membrana de tilacoide de cloroplastos, bloqueando de ese modo el
 55

transporte electrónico fotosintético. El gen del plastidio que codifica un precursor de la proteína Q_B se denomina *psbA*, cuyas secuencias muestran un grado muy elevado de homología en plantas diferentes. El herbicida de PSII más importante es atrazina, desarrollado por Ciba-Geigy.

5 Otra clase son los herbicidas de PSI (fotosistema I), un complejo de proteína unida a membrana que cataliza la oxidación realizada por la luz de plastocianina (PC) y la reducción de ferredoxina (Fd). Típicos de estos productos químicos son los herbicidas bipiridílicos paraquat y dicuat.

10 Otra clase de herbicidas son los herbicidas de tipo ariloxifenoxipropanoatos (APP) o de acetil coenzima A carboxilasa, que inhiben la acetil-CoA carboxilasa y la biosíntesis subsiguiente de ácidos grasos en plastidios. Típicos de los APPs son la ciclohexanodiona (CHD), setoxidina, haloxifop, quizalofop, fenoxaprop (y sus moléculas sustituidas con alquilos inferiores), diclofop, setoxidina, cletodina y tralcoxim.

Aún otra clase de herbicidas incluye los análogos de auxina como macropop, clorambeno, dicamba, benazolina, ácido 1-naftilacético, ácido 3,6-dicloropicolínico, picloram, fluoroxipir, quinclorac, MCPA y 2,4-D.

Una clase adicional son los herbicidas mitóticos, denominados herbicidas dinitroanilínicos, como trifluralina, orizalina y pendimetalina.

15 Otra clase química de herbicidas a la que se aplica la invención es aquella que actúa en la biosíntesis de aminoácidos, tales como los ácidos aminometilfosfónicos terciarios clorsulfurón, glufosina y glifosato.

Otra clase de herbicidas son los herbicidas que inhiben la acetolactato sintasa (ALS), como las sulfonilureas, las imidazolinonas, triazolopirimidinas y los pirimidiniltiobenzoatos, tales como clorsulfurón, imazapir, flumetsulam (y otros enumerados en el capítulo 4, Tabla I de *Herbicide Resistance in Plants*, 1994, citada más abajo).

20 Los ejemplos de herbicidas de tipo sulfonilureas son sulfometurón metilo (el ingrediente activo de OustTM) y clorsulfurón (el ingrediente activo de GleanTM). El imazapir, una de las imidazolinonas, es el ingrediente activo del herbicida de American Cyanamid ArsenalTM, y el imazametabenz es una mezcla de dos imidazolinonas (índice Merk, 11ª edición 4825). Las formas mutadas de ALS localizadas en los genes estructurales de ALS, *ilvG* e *ILV2*, se pueden usar para conferir resistencia a herbicidas usando el vector universal.

25 A pesar de las diferencias químicas entre las imidazolinonas y las sulfonilureas, estas sustancias inhiben la misma enzima, ALS. Parece que las quinonas y un herbicida de imidazolinona compiten con un herbicida de sulfonilurea por un sitio común en ALS. En consecuencia, se pueden transformar plantas que mostrarán una resistencia a ambos grupos de estos y de otros herbicidas.

30 Otro grupo de productos químicos controlables mediante la invención, usando el vector universal que tiene actividad herbicida, está tipificado por la L-fosfinotricina, que es un componente del tripéptido "bialafós". Este tripéptido está comercializado con el nombre comercial "HerbiaceTM" por Meiji Seika, Japón, y como "BastaTM" por Hoechst AG, Alemania. La L-fosfinotricina es un potente inhibidor de la glutamina sintetasa, que provoca un aumento rápido de la concentración de amoníaco en plantas, y que conduce a la muerte de la célula vegetal.

35 A pesar de los intensos estudios, no se ha desarrollado ningún producto satisfactorio para proporcionar tolerancia a herbicidas a las plantas, mediante transformación de cloroplastos. Con el herbicida de tipo glifosato se ha informado que las plantas transgénicas transformadas de núcleo regenerado mostraron tolerancia a glifosato, pero también mostraron un crecimiento alterado, y no han dado como resultado plantas transgénicas con un nivel elevado de tolerancia a glifosato; véase Schultz, et al., 1990.

Transformantes de Cloroplastos.

40 Como se describe, el cloroplasto de plantas diana que son susceptibles a herbicidas se transforma con un vector de la invención que porta la secuencia codificante necesaria, confiriendo de ese modo una resistencia a herbicidas. El cloroplasto transformado comprende un genoma que lleva un transgén extraño que confiere la tolerancia a herbicidas. El cloroplasto puede ser un cloroplasto maduro, o puede ser un cloroplasto inmaduro, tal como un etioplasto. Preferiblemente, el gen que confiere resistencia a herbicidas codifica la EPSP sintasa que se une a glifosato de forma menos fácil (tiene afinidad reducida) que como lo hace la EPSP sintasa de tipo natural. Si está presente, el segundo transgén es generalmente un gen que confiere resistencia a antibióticos a la planta. De este modo, la resistencia a herbicidas se puede usar a título de selección letal como un marcador para la transformación de cloroplastos mediante selección de los transformantes mediante exposición a un medio con una concentración letal del herbicida seleccionado, al que sobrevivirán los transformantes.

50 El origen del segundo gen puede ser procariota (por ejemplo, bacteriano) o eucariota (por ejemplo, planta).

La descripción también se refiere a la producción de una planta resistente a varios herbicidas, ya sea de la misma clase de herbicidas o de diferentes clases de herbicidas, y a la planta transformada resistente a múltiples herbicidas.

Se sabe que algunas especies vegetales han desarrollado una tolerancia natural y no permanente a ciertos tipos de herbicidas.

Se describe además un método para producir una planta resistente a herbicidas, que comprende transformar el cloroplasto de la planta introduciendo uno o más transgenes extraños que codifican una proteína que confiere resistencia a herbicidas al genoma del cloroplasto de la planta. Preferiblemente, el transgén codifica una forma mutante de la enzima que tiene una afinidad reducida por un herbicida dado que la que tiene la enzima de origen natural.

5 La siguiente Tabla enumera una variedad de tipos de determinantes de resistencia (productos químicos o “moléculas”), que inhiben o que confieren resistencia, y los herbicidas típicos relacionados con esto.

Tabla I

DETERMINANTE DE LA RESISTENCIA	HERBICIDAS
Glutathion S-transferasa	s-triazina simazina cloracetamida metalaclor
Análogos de la auxina	2,4-D MCPA mecopop clorambeno
EPSP sintasa	glifosato
Q _b (<i>psbA</i>) – Tipo PS II	atrazina terbutina diclorofenildimetilurea metribuzina lenacilo fenmedifam loxinilo dinoseb
Acetohidroxiácido sintasa (ALS)	sulfonilureas clorosulfurón imazapir sulfometurón metilo imidazolinonas
Glutamina sintasa	fosfinotricina
Tipo PS I	paracuat, dicuat
Enzimas que inhiben la acetil coenzima A carboxilasa (tipo APP)	ariloxifenoxipropanoato (APP), ciclohexanodiona
Disgregantes mitóticos	trifluralina, orizalina, pendimetalina, dinitroanilina

10 Para un repaso comprensivo sobre el tópico de la resistencia a herbicidas en plantas, véase *Herbicide Resistance Crops, Agricultural, Environmental, Economic, Regulatory and Technical Aspects*, 1996, CRC Press, Inc., Editor, Stephen O. Duke and *Herbicide Resistance in Plants, Biology and Biochemistry*, 1994, CRC, Press, Editado por Stephen B. Powles y Joseph A.M. Holtum. En el primero de estos libros de referencia, el capítulo 3 sobre Técnicas para Producir Cosechas Resistentes (y las numerosas referencias citadas allí) es de particular interés como
15 antecedente de la invención. Ambos libros se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

Según la invención, también se ha descubierto que, en el procedimiento para expresar un rasgo diana, se puede expresar otro rasgo mediante la planta transformada que puede ser bastante deseable, de hecho más deseable que el rasgo inicialmente perseguido. En esas situaciones, se permitirá que las plantas se expresen, y se seleccionarán en base a ese otro rasgo.

20 La invención se ejemplifica en los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1

Vectores Universales de Integración y de Expresión de Cloroplastos de tabaco

Se construyeron vectores universales ejemplares de cloroplastos cortando primero el fragmento *Bam*HI (130656-140992) del ADN del cloroplasto del tabaco que contiene los genes de ARNr 16S y 23S, y subclonándolo en un plásmido bacteriano pUC19 habitualmente disponible. En la Figura 1 se muestra un mapa del genoma del cloroplasto del tabaco. En el plásmido pUC19, en el sitio *Pvu*II (Figura 5B), se subclonó un fragmento de 2,1 kpb de *Hind*III-*Eco*RI presente en este fragmento, que contiene una secuencia borde universal que comprende los genes *trn*I y *trn*A (Figura 5A), incluyendo la región espaciadora entre los genes. El plásmido resultante se denominó pSBL-Ct Bor (Figura 5C).

El vector pSBL-RD-EPSPS (Figura 2B) contiene un gen mutante de la EPSP sintasa que codifica la enzima EPSP sintasa. El glifosato, el ingrediente activo en ROUND UP™, de Monsanto, se une a la proteína EPSP sintasa y bloquea la síntesis de aminoácidos esenciales, dando como resultado la muerte de una planta. La EPSP sintasa codificada por el gen mutante no se une a glifosato, y por lo tanto confiere resistencia a herbicidas a las plantas de la cosecha.

Otros genes, tales como aquellos que confieren resistencia a factores medioambientales adversos tales como tolerancia a sales/sequías (genes de osmotolerancia tales como betaína aldehído deshidrogenasa, (BADH), para la sobreproducción de betaína glicínica) o termotolerancia (genes que codifican proteínas del choque térmico) o proteínas de tolerancia al choque del frío, o a resistencia a patógenos, tales como antimicrobianos (péptidos líticos, quitinasa) o antivirales (proteínas de revestimiento), se pueden insertar de forma individual o en combinaciones sin conflictos en el vector universal de cloroplastos, o en diferentes casetes del mismo vector universal de cloroplastos, para transformar la planta diana en aquella con el rasgo deseado.

Construcción de un Vector Universal de Integración de Cloroplastos que Contiene una Región Espaciadora 2 Sintética

Se construyó un vector universal de cloroplastos, que contiene sólo la región espaciadora 2 del genoma del cloroplasto del tabaco, subclonando primero un oligonucleótido sintético, que comprende la región espaciadora 2, en el plásmido bacteriano pUC19. Se sintetizaron las hebras positivas y negativas de la secuencia espaciadora de 64 pares de bases, y la secuencia de la hebra positiva fue la siguiente:

5'-GCTGCGCCAGGGAAAAGAATAGAAGAAGCATCTGACTACTTCATGCATGCTCCACTTGGCTCGG-3'

Los fragmentos sintéticos se mezclaron y se dejaron hibridar, después se ligaron en el plásmido pUC19 en el sitio *Pvu*II (Figura 5B). La inserción de un gen marcador seleccionable apropiado, y un gen heterólogo, se realizó como se describe anteriormente para pSBL-Ct-Bor (Figura 5C).

Para preparar una secuencia más larga, que incluye los genes ARNt^{Ile} y el ARNt^{Ala}, se siguió la misma metodología.

TRANSFORMACIÓN DE PLANTAS DIFERENTES

Ejemplo 2

Transformación de Cloroplastos del Tabaco.

El siguiente ejemplo describe un protocolo clásico para la transformación de cloroplasto de tabaco para el cual se puede usar cualquier vector. Más abajo se identifican dos de tales vectores. Todos los nuevos vectores de cloroplasto se ensayaron primero en tabaco como se describe en Daniell, (1997). Se hicieron crecer asépticamente plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*, variedad Petit Havana) mediante germinación de semillas en medio de MSO que contiene sales de MS (4,3 g/litro), mezcla de vitamina B5 (mioinositol, 100 mg/litro; tiamina-HCl, 10 mg/litro; ácido nicotínico, 1 mg/litro; piridoxina-HCl, 1 mg/litro), sacarosa (30 g/litro) y fitagar (6 g/litro), a pH 5,8. Para el bombardeo, se seleccionaron hojas verdes completamente expandidas de plantas de alrededor de dos meses.

Las hojas se colocaron con el envés hacia arriba sobre un papel de filtro Whatman n° 1 que descansa sobre un medio RMOP* en cápsulas de Petri estándares (100 x 15 mm), para el bombardeo. Se revistieron microproyectiles de volframio (1 µm) o de oro (0,6 µm) con ADN de plásmido de interés (por ejemplo, pSBL-RD-EPSPS o pZS-RD-EPSPS), y se llevaron a cabo bombardeos con un dispositivo biolístico PDS1000/He (Bio-Rad), como se describe por Daniell, 1997. Tras el bombardeo, las cápsulas de Petri se cerraron herméticamente con Parafilm, y se incubaron a 24°C en un fotoperíodo de 12 h. Dos días después del bombardeo, las hojas se cortaron en pequeñas piezas de alrededor de 5 mm² de tamaño, y se colocaron en el medio de selección letal (RMOP que contiene un marcador seleccionable, tal como alrededor de 500 µg/ml de dihidrocloruro de espectinomicina), tocando el envés al medio en cápsulas de Petri profundas (100 x 25 mm) (alrededor de 10 piezas por cápsula). Seleccionados de los brotes que murieron, los brotes regenerados resistentes a espectinomicina se cortaron en trozos pequeños (alrededor de 2 mm²) y se subclonaron en cápsulas de Petri profundas recientes (alrededor de 5 piezas por cápsula) que contienen el mismo medio de selección letal. Los brotes resistentes, procedentes del segundo ciclo de cultivo, se transfirieron a un medio de enraizamiento (medio MSO suplementado con IBA, 1 µg/litro, y un antibiótico apropiado como 500 µg/ml de dihidrocloruro de espectinomicina). Las plantas que echaron raíces se transfirieron al suelo y se hicieron crecer a 26°C en condiciones de luz continua para un análisis posterior.

Después de transferirlos al medio de selección letal, los explantes palidieron gradualmente y, en alrededor de 3-8 semanas, se desarrollaron callos y brotes desde el lado bombardeado de la hoja 0. Los brotes resistentes procedentes de cada callo se consideraron como un clon.

5 La identificación sistemática mediante PCR de transformantes de cloroplasto después del primer ciclo de cultivo mostró que 12 de 20 clones resistentes integran los genes extraños como el gen *aadA* ligado al gen de EG121, en el genoma del cloroplasto. Estos 12 clones se llevaron a otras etapas de regeneración. Todo el procedimiento de regeneración, partiendo del bombardeo hasta la transferencia al suelo, tarda alrededor de 3-5 meses.

La Figura 9 muestra plastidios de tabaco transformados y sin transformar que crecen en presencia de espectinomicina, indicando selección no letal en el medio (500 µg/ml).

10 **Ejemplo 3**

Transformación de Cloroplasto del Maíz.

15 Esterilización de la superficie y germinación de semillas de maíz. La superficie de semillas de maíz se esterilizaron en una disolución que contiene 20% (v/v) de lejía comercial y 0,5% de SDS, durante 15 minutos, con agitación continua, y después se aclararon en serie en agua estéril doblemente destilada (sddw), cuatro a cinco veces. El medio de germinación a base de MS líquido (CSG modificado), que contiene sales de MS (4,3 g/l), sacarosa (30 g/l),
20 vitaminas de DM (1,0 mg/l de tiamina-HCl, 0,5 mg/l de ácido nicotínico, 0,5 mg/l de piridoxina-HCl y 100 mg/l de mioinositol) y BA (2,0 mg/l), a pH 5,8, es suministrado por la caja Magenta™ (45 ml) que contiene ocho capas de estopilla, y después se sometió a un autoclave. Las semillas se colocaron en CSG modificado (25 semillas por cada genotipo por caja), y se cultivaron durante tres días (16 h o luz continua; 25°C) para la germinación. Las secciones nodales se cortaron asépticamente de plantones de tres días. La sección nodal aparece como una demarcación clara sobre el plantón germinante, y representa el séptimo nódulo (Figura 10A). Cuando se cortan, las secciones transversales nodales tienen aproximadamente 1,2-1,5 mm de longitud (Figura 10B).

25 Las Figuras 10A-G muestran el esquema de transformación y regeneración de plastidios de maíz. A) plantón de maíz de tres días; las flechas y la línea representan el séptimo nódulo para la escisión del explante; B) secciones transversales nodales antes del bombardeo; las flechas representan el margen de una sección; C) sección nodal positiva a GUS (transformación nuclear); ensayo histoquímico realizado tres días después del bombardeo; D) inducción de múltiples brotes a partir de una sección nodal (control) después de ocho semanas en cultivo; E) brote de control en el medio de alargamiento durante tres semanas; F) plántula de control enraizada; G) selección de maíz, que tiene transformado su plastidio, en medio líquido que contiene espectinomicina y estreptomomicina durante
30 ocho semanas.

35 Inducción de múltiples brotes: los explantes de sección nodal se colocan en medio de inducción de brotes de maíz [CSI; sales de MS, sacarosa y vitaminas de DM como antes, BA (2,0 mg/l, CPA (0,25 mg/l) y fitagar (8 g/l) a pH 5,8], con el extremo acropetalico hacia arriba, y se colocaron en las condiciones de cultivo previamente mencionadas. En todos los medios, excepto para CSG modificado y RG1 (arroz), tanto los PGR como los antibióticos se esterilizan mediante filtración, y se añaden después de someterlos a autoclave. Los tejidos se subcultivan cada dos semanas en medio CSI reciente para la formación de múltiples brotes (Figura 10D). Los brotes adventicios se separan de los agrupamientos de brotes después de ocho semanas de cultivo, y se alargan en medio semisólido a base de MS que contiene sacarosa, vitaminas de DM, glicina (10 mg/l) y asparagina (150 mg/l), a pH 5,8, durante tres semanas (Figura 10E). Las plántulas se enraízan (Figura 10F) en el mismo medio que contiene IBA (0,5 mg/l). Las plántulas enraizadas se pueden hacer crecer en medio a base de MS líquido libre de PGR, en tubos de ensayo (150 x 25 mm) que contienen estopilla como material de anclaje, para lograr un crecimiento más rápido. Las plántulas regeneradas se transplantan a medios para colocación en macetas, se aclimatan y después se hacen crecer hasta la madurez en el invernadero.

45 La Figura 11 muestra la transformación de plastidios de maíz. Las plantas de maíz transformadas crecen normalmente (brote medio), mientras que las plantas no transformadas mueren en el medio letal, confirmando la selección letal mediante el antibiótico espectinomicina (1000 µg/ml).

Ejemplo 4

Transformación de Cloroplastos de Arroz.

50 Esterilización de la superficie de semillas de arroz, y precultivo. Primero se esteriliza la superficie de semillas sin pelar procedentes de cualquier genotipo (tipos índica o japónica) en 70% de etanol durante 10 minutos en agitación continua, y después se aclaran con ddw alrededor de 5 veces. Las semillas se empapan entonces en una disolución de Benlato al 0,2% (p/v) durante 20 minutos, se aclaran con sddw cinco veces, y después en lejía al 50% durante 20 minutos, con los enjuagues de sddw repetidos. Las semillas se precultivan en medio RG1 [sales de MS, sacarosa y vitaminas de DM como antes, BA (2,0 mg/l), a pH 5,8]. Al igual que con el maíz, el RG1 líquido se suministra a cajas Magenta™ que contienen estopilla antes de someter a un autoclave. Las semillas se colocan en RG1 (100 semillas de cualquier genotipo por caja), y se precultivan toda la noche (16 h o luz continua; 23°C) antes del bombardeo al día siguiente.

Bombardeo de Embriones en Semillas de Arroz Intactas.

Las semillas precultivadas se empaquetan fuertemente de forma vertical, con el extremo del embrión hacia arriba (Figura 12A), en el área central de 2,5 cm de una cápsula de Petri (25 por cápsula) que contiene medio RG1.1 (RG1 más 8,0 g/l de fitagar), y se bombardearon con microproyectiles revestidos con ADN.

5 Precipitación de ADN.

El procedimiento es igual al descrito para el maíz, con las siguientes modificaciones. Se usaron 10 µl de ADN (1,0 µg/µl) y 20 µl de isopropanol (2X vol de ADN), 60 µl de CaCl₂ 2,5 M y 15 µl de espermidina 0,1 M. Cada disparo suministra 2,0 µg de ADN y 720 µg de volframio.

10 Las Figuras 12A-F muestran el esquema de transformación y regeneración de plastidios de arroz. A) semillas de arroz, con el embrión hacia arriba, justo antes del bombardeo; las flechas apuntan a los márgenes del embrión; B) inducción de múltiples brotes a partir de un embrión de control después de siete semanas en cultivo; C) selección de brotes de arroz con plastidio transformado que proceden de un embrión inicial de arroz en medios que contienen espectinomina y estreptomina después de ocho semanas en medio selectivo; las flechas apuntan a dos transformantes putativos; D) regenerantes de arroz de control; E) Priscilla transgénica 2.3; F) Priscilla transgénica 2.4.

Inducción de Múltiples Brotes y Selección de Transplastómicos Después del Bombardeo.

20 Las semillas de arroz se separan y se extienden en el medio RG1.1 (manteniendo la polaridad), y se colocan en la oscuridad durante dos días después del bombardeo. El extremo del embrión de la semilla se corta entonces (embrión más una pequeña cantidad de endoesperma) del resto del endoesperma, el cual se desecha. Los embriones se colocan en 50 ml de medio RG2 líquido (en un matraz de 250 ml), para la inducción de múltiples brotes (Figura 12B). El medio RG2 contiene sales de MS, sacarosa y vitaminas de DM como antes, y BA (6,0 mg/l) a pH 5,8. El medio RG2 usado para la selección incluye espectinomina (1000 µg/ml) más sulfato de estreptomina (100 µg/ml). Los cultivos se colocan en la cámara de crecimiento (fotoperíodo de 16 h; 25°C), y se subcultivan cada dos semanas en medios de selección recientes. Los brotes verdes se seleccionan de las agrupaciones de brotes que proceden de cada embrión, y se colocan nuevamente en medios selectivos (Figura 12C). El enraizamiento se logra en medio RG3 [sales de MS, sacarosa y vitaminas de DM como antes, IBA (0,5 mg/l) a pH 5,8], más antibióticos. (Los brotes se pueden enraizar separadamente o como racimos de múltiples brotes). Las plántulas se transplantan a medios de adaptación a macetas, se aclimatan y después se vuelven a colocar en macetas en una mezcla de arcilla:arena (1:1), y se hacen crecer hasta madurez en el invernadero (Figuras 12D, E, F).

30 Desarrollo de Protocolos de Transformación y Regeneración de Plastidios para Maíz y Arroz.

Como se describe anteriormente, se desarrollaron (Rudraswamy, 1997) protocolos únicos de transformación nuclear y regeneración de maíz (Figura 10), y se adaptaron para la transformación de plastidios. (Previamente a este trabajo, los explantes de sección nodal no se habían usado para la transformación ni la regeneración). Se indujeron múltiples brotes en secciones nodales cortadas de plántulas de tres días de 21 genotipos (ninguno relacionado con A118 o B73) que incluyeron genotipos híbridos (16 de grano, uno dulce) y endogámicos (cuatro). Después de ocho semanas en cultivo, se generaron 16-32 brotes (24 de media) por explante. Los brotes se enraizaron, y los regenerantes no mostraron fenotipos aberrantes en los análisis de invernadero (estudio limitado de dos plantas por genotipo). El ADN también se pudo suministrar en explantes de sección nodal de todos los genotipos (Figura 10C; expresión transitoria de β-glucuronidasa). Para la transformación de plastidios, los explantes de sección nodal se bombardearon con pSBL-ctV2, y después se colocaron en un medio de inducción de múltiples brotes que contiene espectinomina y estreptomina. Los brotes que surgen se pudieron cortar y se volvieron a colocar en medio de inducción de brotes para las rondas subsiguientes de selección.

45 Como se describe anteriormente, las semillas de arroz diana maduras intactas, sin pelar, únicas, con el embrión hacia arriba, no usadas en protocolos de transformación dados a conocer previamente, se acoplaron con un protocolo de inducción de múltiples brotes (Figura 12) para embriones maduros (escindidos dos días después del bombardeo). Se indujeron múltiples brotes en los ocho genotipos ensayados (Litton, Priscilla – dos variedades de cultivo de Mississippi recientemente liberadas, más seis líneas de descendencia). La respuesta observada debería ser similar en otras numerosas variedades de cultivo, puesto que el explante inicial es un embrión maduro. Los regenerantes (no transformados) se mantienen para la recogida de semilla F1. Después de la transformación de plastidios, la multiplicación de brotes ocurrió en presencia de espectinomina/estreptomina, y, al igual que con el maíz, los brotes pudieron sufrir numerosas rondas de selección debido a la proliferación de brotes (de origen axilar o adventicio desconocido) a partir de la base de brotes cortados. El enraizamiento también se logró en medios selectivos.

55 Las Figuras 13A-B muestran el análisis mediante PCR de ADN aislado a partir de hojas de primera generación de transformantes de arroz. El análisis mediante PCR se realizó con ADN aislado de las hojas de la primera generación. Los productos de la PCR no fueron abundantes como se observa en plantas transgénicas de cloroplasto del tabaco (Figura 13A, línea 11, 13B, línea 12). Esto puede ser debido a dos razones. El protocolo usado para aislar

el ADN no es adecuado para hojas gruesas de arroz; o los cebadores diseñados para el tabaco no hibridan tan bien con ADNct del arroz. No obstante, para el análisis preliminar, se usaron cebadores del tabaco para ensayar la integración del gen *aadA* en el genoma de la planta a partir del vector universal. La falta de producto indicaría mutantes espontáneos, capaces de crecer en espectinomicina sin el gen *aadA* (Figura 13A, líneas 7-10). Se detectó un producto de PCR de 1,57 Kb en cuatro líneas (Figura 13A, líneas 2-6) transformadas con el vector universal. En las condiciones de selección usadas, se detectaron cuatro mutantes de diez líneas transformadas con el vector universal. Los cebadores también se diseñaron para identificar específicamente la integración en el genoma de los plastidios. Para el vector universal, el cebador en el genoma del cloroplasto nativo cayó en el gen de ARNr 16S, fuera de la secuencia de flaqueo del vector del cloroplasto (producto de PCR de 1,60 Kb). Los productos esperados se observaron para las líneas transgénicas obtenidas usando el vector universal (Figura 13B, líneas 5, 6). Las plantas no bombardeadas (controles) no produjeron ningún producto de PCR, como era de esperar (Figura 13B, línea 2; Figura 13A, línea 1). Los resultados de la PCR identificaron dos plantas de arroz "Priscilla" (2.3 y 2.4) que contienen plastidios transformados (Figuras 12 y 13).

Ejemplo 5

15 Transformación de Cloroplastos de Cacahuete (*Arachis hypogaea*).

Se obtuvieron cacahuetes transgénicos que tienen genomas de cloroplastos transformados, usando el vector universal pSBL-CG-CtV2 (Figura 7A). El tejido del cacahuete se hizo crecer en cultivo según el protocolo descrito por Kanyand et al., 1994. Las condiciones del bombardeo fueron las mismas que para la transformación de cloroplastos del tabaco, como se describe anteriormente, excepto que se usaron secciones epicotílicas para el bombardeo mientras se usaron discos de ruptura de presión variable. Nunca se ha dado a conocer previamente la transformación de cloroplastos del cacahuete.

La Figura 14 muestra la transformación de plastidios del cacahuete. Las plantas de cacahuete transformadas crecen normalmente (en el centro y en el lado izquierdo de la placa), mientras que las plantas no transformadas mueren en el medio letal (500 µg/ml).

Ejemplo 6

Transformación de Cloroplastos de Haba de Soja.

Las habas de soja transgénicas, que tienen genomas de cloroplastos transformados, se obtuvieron usando el vector universal pSBL-CG-CtV2 (Figura 7A). Las condiciones del bombardeo fueron las mismas que para la transformación de cloroplastos del tabaco. Nunca se ha dado a conocer previamente la transformación de cloroplastos de haba de soja.

La Figura 15 muestra la transformación de plastidios de haba de soja. Dos plantas transformadas muestran brotes, la otra planta muere en el medio letal, confirmando la selección letal mediante el antibiótico espectinomicina (500 µg/ml).

Ejemplo 7

35 Transformación de Cloroplastos del Boniato.

Las plantas de boniato transgénicas, que tienen genomas de cloroplastos transformados, se obtuvieron usando el vector universal pSBL-CG-CtV2 (Figura 7A). Los tejidos del boniato se hicieron crecer en cultivo según el protocolo descrito por Zhang et al., 1996. Las condiciones del bombardeo fueron las mismas que para la transformación de cloroplastos del tabaco, como se describe anteriormente, excepto que se bombardearon los callos y los embriones primarios, y, tras el bombardeo, se transfirieron a placas que contienen 100 mg/ml de espectinomicina. Nunca se ha dado a conocer previamente la transformación de cloroplastos del boniato.

La Figura 16 muestra la transformación de embriones de boniato en el medio de selección letal del antibiótico espectinomicina (500 µg/ml). Nótese los callos blanqueados (a la derecha) y los embriones verdes (a la izquierda).

Ejemplo 8

45 Transformación de Cloroplastos de la Uva.

Las plantas de uva transgénicas, que tienen genomas de cloroplastos transformados, se obtuvieron usando el mismo vector universal pSBL-CG-CtV2. El tejido de la uva se hizo crecer en cultivo según el protocolo de Hebert et al., 1993. Todos los protocolos de transformación de cloroplastos fueron iguales que para el tabaco, excepto que, para el bombardeo, se usaron células en la fase exponencial de crecimiento, alrededor de 4 días después del subcultivo. Nunca se ha dado a conocer previamente la transformación de cloroplastos de la uva.

La Figura 17 muestra la transformación de células de uva. Las células de cultivo transformadas se pusieron verdes, mientras que las células no transformadas murieron en el medio de selección letal del antibiótico espectinomicina (500 µg/ml).

Ejemplo 9

Transformación de Otras Plantas.

5 La transformación de plantas por medio de bombardeo con microproyectiles es una técnica favorecida para introducir, en las plantas diana, el vector universal que tiene la secuencia nucleotídica deseada que codifica la molécula de interés. En la Tabla II se muestran plantas transgénicas ilustrativas obtenidas mediante bombardeo con microproyectiles.

Tabla II

Plantas Transgénicas Recuperadas Mediante Bombardeo Con Microproyectiles

Especie Vegetal	Explante Utilizado para la Transformación
Alfalfa	Callos procedentes de pecíolos, secciones del tallo
Arabidopsis	Secciones de la raíz
Cebada	Callo embriogénico, embriones inmaduros
Plátano	Células en suspensión embriogénicas
Haba	Meristemos
Cítrico	Células embriogénicas
Algodón	Suspensiones embriogénicas; meristemos
Arándano	Secciones del tallo
Pepino	Cotiledones
Orquídea Dendrobium	Protocormos
Eucalipto	Embriones cigóticos
Uva	Células en suspensión embriogénicas
Maíz	Suspensiones embriogénicas; embriones inmaduros
Avena	Células embriogénicas
Papaya	Embriones cigóticos/somáticos; hipocotilos
Forraje	Callos embriogénicos
Melocotón	Callos derivados de embriones
Cacahuete	Meristemos
Álamo	Células embriogénicas
Arroz	Embriones cigóticos

10 La transformación de plantas mediante el uso de la pistola génica se describe en Daniell, 1997. Cada cosecha de la que se informó que era transformable nuclearmente vía el bombardeo con microproyectiles en esa Tabla puede tener su genoma del cloroplasto transformado usando el vector universal como se describe aquí.

Ejemplo 10

Expresión de Productos no Vegetales

15 Los ejemplos que siguen ilustran la expresión de biopolímeros biodegradables a base de proteínas (PBPs), y el análisis de los transformantes.

Vector pSBL-CG-EG121.

El vector pSBL-CG-EG121 (Figura 3A) contiene el gen (GVGVP)_{121mer} (denominado EG121) que codifica un biopolímero biodegradable a base de proteína (PBP) que tiene muchas aplicaciones médicas y no médicas.

Construcción de Vectores de Expresión de Cloroplastos.

Los protocolos estándar para la construcción de vectores fueron como se esquematizan mediante Sambrook et al., 1989. Los vectores de integración y de expresión de cloroplastos pSBL-CtV2 (Figura 7A) y pZS197 se digirieron, respectivamente, con *Xba*I (un sitio único entre el gen *aadA* y la región 3' de *psbA*) y con *Spe*I (un sitio único a 120 pb en dirección 3' del gen *aadA* en la región reguladora 3' de *psbA*), se rellenaron con el fragmento de Klenow, y se desfosforilaron. El gen polímero EG121, junto con la secuencia de Shine-Dalgarno (GAAGGAG), del vector pET11d, se escindió como un fragmento *Xba*I-*Bam*HI del plásmido pET11d-EG121. Los extremos pegajosos del fragmento del inserto se llenaron con el fragmento Klenow, y se ligaron con vectores pSBL-CtV2 o pZS197, produciendo vectores de expresión de cloroplastos pSBL-CG-EG121 (Figura 3A) y pZS-CG-EG121 (Figura 3B), que integran los genes *aadA* y EG121 en la región repetida invertida (IR) o en la región espaciadora entre los genes *rbcl* y *orf* 512 del genoma del cloroplasto del tabaco. Véase la Figura 1 para los sitios de integración de "UV" y "TV", respectivamente.

Expresión del Biopolímero en *E. coli* y en Tabaco.

El vector del plásmido pSBL-CG-EG121 (Figura 3A) se transformó en la cepa XL-1 Blue de *E. coli*, y se hizo crecer en caldo Terrific en presencia de ampicilina (100 µg/ml) a 37°C durante 24 h. Se llevó a cabo una SDS-PAGE según Laemmli, 1970, usando un gel de resolución al 12% y un gel de apilamiento al 5%, y se llevó a cabo durante 5 h a una corriente constante de 30 mAmps. Los extractos de proteína bruta procedentes de las células de *E. coli* se prepararon y se sometieron a electroforesis como se describe por Guda et al., 1995. Después de la electroforesis, los polipéptidos se visualizaron mediante tinción negativa con CuCl₂.

La Figura 18 muestra la expresión de vectores de integración y de expresión de cloroplastos en la cepa HMS174 (DE3) de *E. coli*. La línea 1 muestra la proteína polímera purificada; la línea 2 muestra el control de *E. coli* sin transformar; la línea 3 muestra la cepa XL-1 Blue de *E. coli* transformada con el vector universal pSBL-CG-EG121 (Figura 3A); la línea 4 muestra *E. coli* transformada con el vector del tabaco; y la línea 5 muestra a la cepa HMS174 (DE3) de *E. coli* transformada con el vector pET11d-EG121, en el que el promotor T7 transcribe el gen del polímero. El nivel de expresión mediante el promotor Prn en *E. coli* fue casi equivalente al del promotor T7 altamente eficaz que dirige al gen del polímero.

Análisis de Transferencia Southern.

El ADN total se extrajo de hojas de plantas transformadas y de tipo salvaje, usando el procedimiento CTAB de Rogers y Bendich, 1988.

Las Figuras 19 y 20 muestran el análisis de transferencia Southern realizado independientemente con los transformantes obtenidos usando los vectores del tabaco (Figura 19) y el universal (Figura 20). El ADN total se digirió con *Eco*RI y con *Hind*III en el caso de los transformantes del vector universal (UV), o con *Eco*RI y con *Eco*RV en el caso de los transformantes del vector del tabaco (TV). La presencia de un sitio *Eco*RI en el extremo 3' del gen polímero permitió la escisión de fragmentos de tamaño predicho en los transformantes de los cloroplastos solamente. Para confirmar la integración de genes extraños y la homoplasma, se sondaron transferencias individuales con las secuencias borde correspondientes. En el caso de los transformantes del TV, después de la segunda o tercera ronda de selección, la secuencia borde se hibridó con fragmentos de 4,6 y 1,6 kpb (Figura 19A, líneas 2, 3 y 4), y con un fragmento nativo de 3,1 kpb en el tipo salvaje (Figura 19A, línea 1). Por otro lado, en el caso de los transformantes del UV, después de la primera ronda de selección, la secuencia borde se hibridó con fragmentos de 4,0 kpb y 1,2 kpb (Figura 20A, líneas 1 y 2), mientras que se hibridó con un fragmento nativo de 2,1 kpb en el control (Figura 20A, línea 3). Además, los transformantes del TV también mostraron el fragmento nativo de 3,1 kpb (Figura 19A, líneas 2 y 3) similar al de la planta de tipo salvaje, indicando una condición heteroplásmica de los genomas de cloroplastos transformados, incluso aunque han estado bajo varias rondas de selección. Sin embargo, ambos transformantes del UV mostraron una condición homoplásmica, incluso después de la primera ronda de selección (Figura 20A, líneas 1, 2).

Ya se dio a conocer anteriormente la presencia de heteroplasma incluso después de la segunda selección, y se sugirió que la selección se debería realizar hasta lograr la homoplasma (Svab y Maliga, 1993). Esto es consistente con la observación de que existe un grado elevado de heteroplasma después de un segundo ciclo de selección en los transformantes del TV (Figura 19A, líneas 2 y 3). Sin embargo, en el caso de los transformantes del UV, no se observó condición heteroplásmica, lo cual puede ser debido al mecanismo de corrección de copias entre las dos regiones IR y/o a la presencia del origen de replicación (*ori*) del cloroplasto en la secuencia borde, lo que debería aumentar el número de copias del plásmido introducido, antes de la integración.

Las transferencias en gel de ADN también se sondaron con el gen *aadA* (plantas integradas con el UV) o con el gen EG121 (plantas integradas con el TV), para reconfirmar la integración de genes extraños en los genomas de los cloroplastos. En las plantas integradas con el TV, la sonda del gen polímero se hibridó con un fragmento de 4,6 kpb, sólo en las líneas de los transformantes de los plastidios (Figura 19B, líneas 2, 3 y 4). También, en las plantas integradas con el UV, la secuencia de *aadA* se hibridó con un fragmento de 4,0 kpb esperado (Figura 20B), que también se hibridó con la secuencia borde en las líneas de los transformantes de plastidios (Figura 20A, líneas 1 y 2).

Análisis de los Niveles de Transcritos en Tabaco Transgénico, y Transferencia Northern.

Los niveles de transcritos de genes extraños se analizaron mediante transferencia Northern (Figura 21) usando ARN total aislado de los transformantes de cloroplastos, del control, y una planta transgénica de tabaco que expresa de forma elevada el gen polímero (EG121) vía el genoma nuclear (Zhang et al., 1996). La secuencia del gen polímero (EG121) se hibridó con un fragmento de 1,8 kpb en los transformantes de los cloroplastos (líneas 1-4, 5-6), y también con fragmentos de mayor tamaño en uno de los transformantes de cloroplastos (línea 6). En el caso del transformante nuclear, se observó un transcrito de alrededor de 2,1 kpb (línea 7). Esto fue debido a la presencia de una cola poli A en el extremo 3' del transcrito del polímero proporcionada por el terminador *nos*. Los fragmentos de mayor tamaño, observados en la línea 6, pueden ser los transcritos di-, tri- o policistrónicos que están siendo procesados en los cloroplastos. Esto es un fenómeno habitual en la expresión de genes de cloroplastos debido a que muchos genes de plastidios se organizan en unidades transcripcionales policistrónicas que dan lugar a conjuntos complejos de ARNm que solapan. La cuantificación de los niveles de transcritos reveló que los transformantes de los cloroplastos estaban produciendo 11 veces (línea 5), o más de cincuenta veces (línea 6), más de los transcritos del polímero con respecto a un transformante nuclear que expresa de forma elevada (línea 7, planta con la mayor expresión entre treinta y cinco plantas transgénicas nucleares con TV examinadas). Esto se atribuye directamente a la presencia de un mayor número de copias génicas en los cloroplastos de plantas transgénicas. Los transformantes de plastidios integrados con el vector del tabaco (TV) mostraron niveles más bajos de transcrito de polímero (líneas 1-4), en comparación con los transformantes integrados con el vector universal (líneas 5, 6), debido a que el gen polímero existe como dos copias por genoma de plastidio transformado, en transformantes con el vector universal, frente a una única copia en los transformantes con el TV y las condiciones heteroplásmicas observadas en los transformantes con el TV.

Análisis de Transferencia Western.

La proteína polímera se purificó a partir de hojas procedentes de transformantes de cloroplastos del tabaco de tipo salvaje y plantas transgénicas nucleares, siguiendo el método descrito recientemente por Zhang et al., 1995. El polímero purificado se analizó mediante SDS-PAGE según Laemmli, 1970, usando un gel de resolución al 12% y un gel de apilamiento al 5%, y realizando el experimento durante 5 h a una corriente constante de 30 mAmps. Los polipéptidos polímeros de alrededor de 60 kDa se visualizaron mediante tinción negativa con CuCl_2 0,3 M. Los geles se destiñeron en EDTA sódico 0,25 M y Tris-HCl 0,25 M, pH 9,0, con tres cambios de tampón a intervalos de 10 minutos. La inmunotransferencia Western y la tinción (Figura 22) se llevaron a cabo como se describe por Zhang et al., 1996, usando un antisuero monoclonal surgido frente al polímero AVGVGP que reacciona bien de forma cruzada con el polímero GVGVP y el "Immuno-Blot Assay Kit" (Bio-Rad). Los polipéptidos polímeros a alrededor de 60 kDa se observan en los transformantes de plastidios de plantas integradas con IR. En la línea 5 (Figura 22) se observa la expresión del polímero a partir de una planta transgénica nuclear de generación F2 que expresa de forma elevada (planta de mayor expresión entre 35 plantas transgénicas examinadas), mientras que, como se observa en la línea 4 (Figura 22), en el control sin transformar no se expresó ningún polímero. En los transformantes de los cloroplastos se muestra un nivel once a cincuenta veces mayor de transcritos del polímero (Figura 21). En el caso de proteínas de origen natural de los cloroplastos, como valina y prolina, cuyas rutas biosintéticas están compartimentadas en cloroplastos, es de esperar que se produzcan mayores niveles de proteína.

Ejemplo 11

Manipulación Mediante Ingeniería Genética de la Tolerancia a Glifosato Vía los Genomas Nucleares y de Cloroplastos

Vectores de Integración y de Expresión de Cloroplastos con EPSPS en Tabaco.

La secuencia que codifica EPSPS se ha integrado recientemente en el genoma del cloroplasto del tabaco (Figura 1). El vector del cloroplasto pZS-RD-EPSPS (Figura 2A) contiene el promotor de ARNr 16S (Prm) que dirige los genes *aadA* y EPSPS con la región 3' de *psbA* del genoma del cloroplasto del tabaco. Este constructo integra a los genes de EPSPS y *aadA* en la región espaciadora entre los genes *rbcl* y *orf512* del genoma del cloroplasto del tabaco. Figura 1, en la flecha del "TV".

Ensayo para Determinar la Resistencia a Glifosato. Expresión Génica en *E. coli*.

Debido a la gran similitud en los sistemas de transcripción y traducción entre *E. coli* y cloroplastos (Brixey et al., 1997), primero se ensayaron los vectores de expresión del cloroplasto en *E. coli* para determinar la resistencia en este caso a glifosato antes de proceder con la transformación de plantas superiores. La mayor tasa de crecimiento de *E. coli* que contiene el vector del tabaco, comparada con el control que contiene pZS197 (similar a pZS-RD-EPSPS pero que carece del gen de EPSPS), en presencia de 10 mM y 40 mM de glifosato (Figura 23A), indica tolerancia a glifosato de *E. coli* que expresa el gen de EPSPS. Otra curva de crecimiento (Figura 23B) confirma la expresión de EPSPS vía el vector universal en *E. coli*. De este modo, la tolerancia a glifosato de *E. coli* es debida a la expresión del gen de EPSPS, presente tanto en el vector del tabaco como en el vector universal.

CARACTERIZACIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS DE TABACO

Integración del Gen.

Se bombardearon hojas verdes completamente expandidas de *Nicotiana tabacum* var. Petit Havana con los vectores de cloroplastos de tabaco y el universal. Dos días después del bombardeo, los explantes de hoja se transfirieron a medio letal de selección que contiene espectinomicina (500 µg/ml). Se obtuvieron plantas transgénicas en 3-5 meses después del bombardeo. Típicamente, de las 16 hojas bombardeadas, se identificaron 10 brotes transformados independientemente.

El análisis mediante PCR se realizó con ADN aislado de los brotes de la primera o de la segunda generación, y también de las plantas transgénicas maduras. Se usaron cebadores para confirmar la integración del gen *aadA* en el genoma de la planta del tabaco así como de los vectores universales. La falta de un producto indicaría mutantes espontáneos, capaces de crecer en espectinomicina sin el gen *aadA*. El producto de la PCR esperado (887 pb) se obtuvo a partir de seis líneas (Figuras 24A-B, líneas 1-6) transformadas con el vector del tabaco. Se detectó un producto de PCR de 1,57 Kb en cuatro líneas (Figuras 24A-B, líneas 1-4) transformadas con el vector universal. En las condiciones de selección usadas, se detectaron cuatro mutantes de diez líneas transformadas con el vector del tabaco. Por otro lado, todas las líneas transgénicas transformadas con el vector universal mostraron integración del gen *aadA*.

Integración de Cloroplasto Mediante PCR.

También se diseñaron cebadores para identificar específicamente la integración en el genoma del plastidio. La estrategia aquí fue descargar un cebador sobre el genoma del cloroplasto nativo, adyacente al punto de integración del vector, mientras se descarga el otro sobre el gen *aadA*. Se diseñó un cebador para que cayese inmediatamente fuera del gen *rbcL* en el vector del tabaco (producto de PCR de 2,08 Kb). Para el vector universal, el cebador en el genoma del cloroplasto nativo cayó en el gen de ARNr 16S (producto de PCR de 1,60 Kb). Los productos esperados se observaron para las líneas transgénicas obtenidas usando el vector del tabaco (Figuras 24A-B, líneas 2-7) así como el vector universal (Figuras 24A-B, líneas 1-4). Las plantas no bombardeadas (controles) no produjeron ningún producto de PCR, como era de esperar (Figuras 24A, líneas 1 y 9; 24B, líneas 5 y 11). De este modo, todas las plantas transgénicas examinadas resultaron ser transformantes de cloroplastos y no transformantes nucleares, quizás debido al requisito de mayores niveles de aminoglicósido adenil transferasa (AADA) en plantas transgénicas en condiciones de selección restrictivas. Los bajos niveles de AADA, presentes en el codicilo de plantas transgénicas nucleares, habrían eliminado los transformantes nucleares. Los resultados del análisis de PCR son concluyentes, y proporcionan una señal definitiva de la integración de genes extraños en el cloroplasto usando los vectores tanto del tabaco como universales.

Análisis de Southern.

La integración del gen *aroA* en el cloroplasto también se confirmó mediante análisis de Southern. Además, el nivel elevado de resistencia a glifosato observado (Figura 20A) se confirmó mediante la determinación del número de copias del gen extraño en las plantas transgénicas. La sonda, para determinar la integración del gen extraño en el genoma del cloroplasto, comprendía un fragmento de 654 pb del cebador aleatorio del gen EPSPS, marcado con P³². El ADN total, que comprende tanto ADN de orgánulos como ADN genómico, se digirió con *EcoRI*. La presencia de un sitio *EcoRI* de 200 pb en dirección 5' desde el sitio de integración, en el genoma del cloroplasto, se usó para confirmar la integración del gen de EPSPS en el genoma del cloroplasto en plantas transgénicas. La sonda hibridada al gen nativo de EPSPS, presente en el genoma nuclear, se observa como un fragmento de 4,5 Kb. Además, la sonda se hibridó a los genomas de cloroplastos digeridos de las plantas de tabaco transgénicas, generando los fragmentos de 3,5 Kb y 4,35 Kb en la Figura 25A, líneas 2, 3 y 4. La sonda no se hibridó al genoma del cloroplasto digerido de la planta de control sin transformar (Figura 25A, línea 1), puesto que el gen extraño no está presente en el genoma del cloroplasto del tabaco. Esto demuestra claramente la integración, del gen de EPSPS, en el genoma del cloroplasto.

Números de Copias de Genes.

El número de copias del gen integrado se determinó estableciendo la homoplasma para el genoma de cloroplasto transgénico. Los cloroplastos del tabaco contienen 5000-10.000 copias de su genoma por célula (McBride et al., 1995). Si sólo se transforma realmente una fracción de los genomas, el número de copias, por defecto, debe ser menor que 10.000. Estableciendo que en los transgénicos el genoma transformado con EPSPS es el único presente, se podría afirmar que el número de copias es 5000-10.000 por célula. Esto se demostró digiriendo el ADN total con *EcoRI* y sondando con las secuencias de flanqueo que permiten la recombinación homóloga en el genoma del cloroplasto. La sonda comprendía un fragmento de 2,9 Kb de las secuencias de *rbcL-orf 512*. Un genoma de cloroplasto transformado con el gen de EPSPS incorpora un sitio de *EcoRI* entre la región *rbcL-orf 512* del genoma del cloroplasto, generando de ese modo un fragmento adicional cuando se digiere con esta enzima (Figura 25C). El análisis de hibridación Southern reveló un fragmento de 4,43 Kb en la Figura 25B, línea 1, para el control sin transformar. En las líneas 2, 3 y 4, se generaron dos fragmentos (4,35 Kb y 3 Kb) debido a la incorporación del casete del gen de EPSPS entre las regiones *rbcL* y *orf512* (la Figura 25C proporciona un diagrama esquemático,

significando las líneas punteadas en gris el punto de integración del ADN extraño). El fragmento de 4,43 Kb, presente en el control, está ausente en los transgénicos. Esto prueba que sólo el genoma del cloroplasto transgénico está presente en la célula, y que no hay genoma del cloroplasto nativo, sin transformar, sin el gen de EPSPS. Esto demuestra la naturaleza homoplásmica de los transformantes, proporcionando simultáneamente una estimación de 5000-10.000 copias del gen de EPSPS extraño por célula. Esto explicaría entonces los niveles elevados de tolerancia a glifosato que se observaron en las plantas de tabaco transgénicas (Figura 20A).

Progenie.

Las semillas recogidas de plantas transgénicas autopolinizadas se hicieron germinar en presencia de espectinomocina (500 µg/ml). Todas las semillas germinaron, permanecieron verdes y crecieron normalmente (Figura 26B). La resistencia uniforme a espectinomocina indicó que el gen *aadA* se transmitió a toda la progenie. La falta de diversificación sugirió homoplasmia debido a que una condición heteroplásmica habría dado lugar a una progenie diversificada en espectinomocina (Svab et al., 1990; Svab y Maliga, 1993). La falta de variación en la pigmentación clorofílica entre la progenie también subraya la ausencia de efecto de posición, un artefacto de la transformación nuclear. Todos los plantones del control estaban blanqueados, y no crecieron en presencia de espectinomocina (Figura 26A).

Tolerancia a Glifosato.

Se pulverizaron plantas de control y transgénicas de dieciocho semanas con volúmenes iguales de glifosato a diferentes concentraciones (0,5 a 5 mM). Las plantas de tabaco del control fueron extremadamente sensibles al glifosato. Murieron en siete días, incluso a una concentración de 0,5 mM de glifosato (Figura 27B). Por otro lado, las plantas transgénicas en su cloroplasto sobrevivieron a concentraciones tan altas como 5 mM de glifosato (Figura 27A). Estos resultados son intrigantes, considerando el hecho de que el gen de EPSPS de la petunia usado en estos vectores de cloroplasto tiene un nivel bajo de tolerancia a glifosato, y también contiene el péptido de tránsito para la selección en los cloroplastos.

Esta es la primera noticia de una expresión de un gen nuclear eucariota en el compartimiento de un cloroplasto procariota. Es bien sabido que la preferencia del codón es significativamente diferente entre el compartimiento del cloroplasto procariota y el compartimiento nuclear eucariota. De forma ideal, un gen mutante *aroA* (que no se une a glifosato), procedente de un sistema procariota, se debería expresar en el compartimiento del cloroplasto. Tales genes están ahora disponibles y muestran un nivel mil veces mayor de resistencia a glifosato que el gen de la petunia usado en este trabajo. A la luz de estas observaciones, es posible que la integración de genes procariotas con resistencia a herbicidas, en el genoma del cloroplasto, como se realiza aquí, pueda dar como resultado niveles increíblemente elevados de resistencia a herbicidas a la vez que aún se mantenga la eficacia de la prevención de la expansión biológica, es decir, se evita la diseminación mediante el polen.

Ejemplo 12

Tolerancia del Maíz a Glifosato.

Se construye un vector universal de cloroplasto usando el ADN del cloroplasto de maíz según lo siguiente. Primero, se construye el vector pSBL-Ct-bor (Figura 5C) según lo siguiente: el subclón de ADN de cloroplasto de maíz, que contiene una de las regiones repetidas invertidas, se construye con el plásmido bacteriano pUC19. En segundo lugar, se construye un subclón más pequeño, que contiene sólo el operón de ARNr, a partir del primer subclón, y el fragmento presente en el segundo subclón, que contiene los genes *trnA* y *trnI*, y las regiones espaciadoras que representan la borde universal se subclonan en un plásmido pUC19 en el sitio de *PvuII*. El plásmido resultante se denomina pSBL-Ct-bor. Dentro del plásmido pSBL-Ct-bor, se inserta un casete de un gen marcador seleccionable que contiene un promotor de ARNr 16S de cloroplasto, el gen *aadA* (que codifica aminoglicósido 3'-adeniltransferasa que confiere resistencia a estreptomocina/espectinomocina) y una región no traducida 3' del gen *psbA* del cloroplasto, para construir el vector pSBL-CORN. El casete del gen marcador seleccionable se inserta entre los genes *trnI* y *trnA* en la región espaciadora, en la dirección de la transcripción de ADNr 16S.

El vector pSBL-CORN-*aroA*, que contiene un gen mutante *aroA* procedente de *Salmonella typhimurium* (Stalker et al., 1985; Comai et al., 1983), que codifica la enzima EPSPS sintasa, se construye insertando el gen mutante *aroA* en el vector pSBL-CORN. Las plantas de maíz transgénicas que expresan el gen mutante *aroA* son resistentes al tratamiento con glifosato como "RoundupTM", mientras que las plantas del control sin transformar no lo son.

Ejemplo 13

Transformación de Cloroplastos para la Tolerancia a Imidazolinonas o Sulfonilureas.

El plásmido pSBL-CORN se modifica mediante inserción de un fragmento de ADN que contiene una forma mutada del gen de acetolactato sintasa de *Saccharomyces cerevisiae* (Falco y Dumas, 1985; Yadav et al., 1986), para generar el plásmido pSBL-CORN-ASL1. Este gen codifica una acetolactato sintasa que no es inhibida por imidazolinonas o sulfonilureas, y confiere tolerancia a herbicidas que contienen sulfometurón metilo, y a herbicidas

que contienen imazapir. Las plantas de tabaco transformadas, que expresan el gen mutante de acetolactato sintasa, son resistentes a pulverizaciones de herbicidas de tipo imidazolinona y sulfonilureas.

5 El vector pSBL-CORN-ALS2 es un derivado de pSBL-CORN que contiene copias mutadas de los genes suRA y suRB del tabaco (Chaleff y Ray, 1984). Estos genes codifican el polipéptido de acetolactato sintasa del tabaco. El plásmido pSBL-CORN-ALS2 se construye ligando los genes suRA y suRB, aislados del ADN genómico del tabaco, en el vector pSBL-CORN. El vector resultante confiere resistencia a herbicidas de tipo imidazolinonas y sulfonilureas.

Ejemplo 14

Transformación de Cloroplastos para la Tolerancia a Inhibidores del Fotosistema II.

10 La resistencia a herbicidas del fotosistema (PS) II se produce a partir de mutaciones dentro del gen *psbA*, que encierra a la proteína Q_B y que se conserva enormemente entre muchas plantas. Las plantas resistentes poseen mutaciones que alteran a aminoácidos en posiciones específicas dentro de las proteínas Q_B, por ejemplo, los restos 219, 251, 255, 264 y 275 (Hirschberg y McIntosh, 1993; Galloway y Mets, 1984; Gloden y Haselkorn, 1985; Erickson et al., 1984; Johanningmeier et al., 1987). De este modo, los genes que poseen estas mutaciones se pueden utilizar
15 para conferir resistencia a herbicidas que funcionan inhibiendo el transporte de electrones llevado a cabo por el sistema del PS II.

Los ejemplos de estos herbicidas incluyen diclorofenildimetilurea (DCMU), atrazina, metribuzina, lenacilo, fenmedifam, loxinilo y dinoseb.

20 El gen mutante *psbA*, que contiene una mutación de serina a glicina en el resto 264, se aísla de ADN genómico de *Chlamydomonas*, usando las endonucleasas de restricción apropiadas. El fragmento resultante se puede ligar en el vector de expresión de cloroplastos universal pSBL-ctV2, y se puede introducir en XL1 Blue de *E. coli*. El plásmido purificado procedente de esta cepa de *E. coli* se utiliza para transformar plantas. Daniell (1997). La incorporación de los genes mutantes *psbA* en el genoma del cloroplasto, y la selección de los transformantes apropiados, se lleva a cabo como se ha descrito previamente. Las plantas transformadas que producen la proteína mutada *psbA*, que
25 contiene la sustitución de serina a glicina, son resistentes a AtrazineTM, mientras que las plantas del control no lo son.

30 El gen mutante *psbA*, que contiene una mutación de valina a isoleucina en el resto 219, se aísla de ADN genómico de *Chlamydomonas*, usando las endonucleasas de restricción apropiadas. El vector universal se construye como se describe anteriormente. Es de esperar que las plantas transgénicas como el maíz, que expresan *psbA* que contiene la mutación de valina a isoleucina en el resto 219, sean resistentes a pulverizaciones de DCMU.

Ejemplo 15

Tolerancia a Análogos de la Auxina. 2,4-D.

35 El vector universal de expresión de cloroplastos *psbL*-ctV2 se puede escindir con *XbaI*, y se puede ligar con un fragmento de ADN que contiene un gen que codifica monooxigenasa. El constructo resultante se puede transformar en cloroplastos para generar plantas transgénicas que contienen múltiples copias del gen de la monooxigenasa. Es de esperar que las plantas resultantes, que expresan niveles elevados de monooxigenasa, sean tolerantes a 2,4-D.

Ejemplo 16

Transformación de Cloroplastos para la Resistencia a Insectos.

40 Las plantas del tabaco se pueden transformar con el vector universal pSBL-CtVHbT (Figura 8A) que contiene el gen *cryIIA* y que expresa la protoxina CryIIA, confiriendo de este modo resistencia a plagas de insectos como la familia Pyralidae, tales como el gusano de cuerno del tabaco. Incluso los insectos que han desarrollado una resistencia o son menos susceptibles a la toxina Bt son exterminados por la toxina Bt expresada por el gen en el vector del cloroplasto descrito aquí.

45 El vector pSBL-CtVHbT se construye escindiendo mediante ruptura pSBL-CtVH con *SmaI* y ligando el producto con el gen *cryIIA* que codifica la proteína CryIIA. El producto contenía el gen *cryIIA* en la orientación transcripcional correcta (Figura 8A).

50 La integración del gen *cryIIA* en el genoma del cloroplasto del tabaco se ha confirmado mediante análisis de PCR. Se estimó que el número de copias de *cryIIA* por célula era 10.000 mediante la realización de transferencias Southern. Llevando a cabo transferencias Western, se estimó que la proteína CryIIA era entre un 5 y un 10% de la proteína celular total. Este es el nivel más elevado de proteína CryIIA jamás dado a conocer en plantas transgénicas con Bt. Se realizaron bioensayos de hojas cortadas usando tabaco "Petit Havana" no transformado y tabaco transformado con *cryIIA*. Se colocaron cinco a diez larvas sobre cada hoja, y se evaluaron para determinar la mortalidad y el daño a la hoja después de 3-5 días. Usando *H. virescens* (YDK) susceptible, todas las larvas murieron en un período de 3 días en el tabaco transformado con *cryIIA*, mientras que no hubo ninguna mortalidad y

5 hubo una defoliación esencialmente del 100% en el "Petit Havana" no transformado. Se obtuvieron resultados similares usando *H. virescens* resistente a CryIAc (YHD2, resistente unas 40-50.000 veces) y resistente a CryII-A (CXC, resistente unas 2000 veces). Además, se observó una mortalidad del 100% frente a *Helicoverpa zea* (gusano del capullo del algodón), y frente a *Spodoptera exigua* (gardama), ninguno de los cuales ha demostrado previamente que es exterminado por una proteína Cry.

La Figura 28A y 28B muestran un bioensayo de (A) planta no transformada de control, y (B) planta transgénica. Los insectos ensayados demostraron una mortalidad del 100%: el cogollero del tabaco es susceptible a CryI, y el gusano del capullo del algodón y la gardama son resistentes a CryI y CryII.

10 La Figura 29 muestra la proteína total aislada mediante análisis de transferencia Western de plantas del control (línea C) y plantas transgénicas (línea B). Las líneas D-H representan concentraciones diferentes de proteína CryIIA purificada (1-20%). La línea A muestra patrones de proteína.

Otros insectos controlables se describen anteriormente en la descripción de la invención.

Referencias

- Arntzen Ph.D., Charles J. (1997) *Public Health Reports* **112**: 190-197.
- 15 Brixey, P.J., Guda, H. y Daniell, H. (1997) *Biotechnol. Lett.* **19**, 395-399.
- Carlson, P.S. (1973) *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **70**:598-602.
- Chaleff y Ray. (1984) *Science* **223**:1148.
- Cornai, L., Faciotti, D., Hiatt, W., Thomson, G., Rose, R., y Stalker, D. (1983) *Science* **221**:370.
- Daniell, H., Guda, C., McPherson, D.T., Xu, J., Zhang, X. y Urry, D.W. (1997) *Math. Mol. Biol.*, **63**:359-371.
- 20 Daniell, H., y Guda, C. (1997) *Chemistry and Industry*, páginas 555-558.
- Daniell, H., Krishnan, M. y McFadden, B.A. (1991) *Plant Cell Rep.* **9**: 615-619.
- Daniell, H., y McFadden. (1987) *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* **84**: 6349-6353.
- Daniell, H., Vivekananda, J., Neilson, B., Ye, G.N., Tewari, K.K., y Sanford, J.C. (1990) *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* **87**: 88-92.
- 25 Daniell, H. Porobo Dessai, A., Prakash, C.S. y Moar, W.J. (1994) *NATO Asi Series. Ed., J.H. Cherry.* **H86**: 598-604.
- Darkocsik, C., Donovan, W.P. y Jany, C.S. (1990) *Mol. Microbiol.* **4**: 2087-2094.
- Daniell, H., (1995) *Inform.* **6**: 1365-1370.
- Daniell, H., Ramanujan, P., Krishnan, M., Gnanam, A. y Rebeiz, C.A. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Comun* **111**:740-749.
- 30 Daniell, H. y Rebeiz, C.A. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Comun.* **106**:466-471.
- Daniell, H. (1993) *Methods in Enzymology.* **217**:536-556.
- Daniell, H. (1997a) *Meth. Mol. Biot.* **62**: 453-488.
- DeBlock, M., Botterman, J., Vandewiele, M., Docky, J., Thuén, C., Gossele, V., Movva, N.R., Thomson, C., Van Montagu, M., y Leemans, J. (1987) *EMBO J.* **6**: 2513-2518.
- 35 Erickson et al. (1984) *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* **81**:3617.
- Falco y Dumas. (1985) *Genetics* **109**: 21.
- Gabard, J.M., Charest, P.J., Iyer, V.N. y Miki, B.L. (1989) *Plant Phys.* **91**:574-580.
- Galloway y Mets. (1984) *Plant Physiol.* **74**: 469.
- Gloden y Haselkorn. (1985) *Science* **229**: 1104.
- 40 Guda, C., Zhang, X., McPherson, D.T., Xu, J., Cherry, J., Urry, D.W. y Daniell, H. (1995) *Biotechnol. Lett.* **17**: 745-750.
- Hirschberg y McIntosh. (1993) *Science* **222**: 1346.

- Johanningmeier et al. (1987) *FEBS Lett* **211**: 221.
- Kanyand et al. (1994) *Plant Cell Reports* **14**: 1-5.
- Kin Ying et al. (1996) *The Plant Journal* **10**: 737-743.
- King, J. (1996) *Science* **274**: 180-181.
- 5 Laemmli, U.K. (1970) *Nature* **227**: 680-685.
- Langevin, S.A., Clay, K. y Grace, J.B. (1990) *Evolution* **44**: 1000-1008.
- Lewellyn y Fitt (1996) *Molecular Breeding* **2**: 157-166.
- Lu, Z., Kunnimalaiyaan, M. y Nielsen, B.L. (1996) *Plant Mol. Biol.* **32**: 693-706.
- Lyons, P.C., May, G.D., Mason, H.S., y Arntzen, C.J., (1996) *Pharmaceutical News* **3**: 7-12.
- 10 Maier, R.M., Neckerman, K., Igloi, G.L. y Kossel, H. (1995) *J. Mol. Biol.* **251**: 614-628.
- May, G.D., Mason, H.S., Lyons, P.C. (1996) *American Chemical Society*, p. 194-204.
- Miele, L. (1997) *Elsevier Trends Journals*, Vol. 15.
- Mikkelson, T.R., Anderson, B. y Jbrgenson, R.B. (1996) *Nature* **380**: 31.
- 15 Miki, B.I., Labbe, H., Hatori, J., Ouellet, T., gabard, J., Sunohara, G., Charest, P.J. e Iyer, V.N. (1990) *Theoretical Applied Genetics* **80**: 449-458.
- McBride, K.E., Svab, Z., Schaaf, D.J., Hogan, P.S., Stalker, D.M. y Maliga, P. (1995) *Bio/Technology* **13**: 362-365.
- Nielsen, B.L., Lu, Z. y Tewari, K.K. (1993) *Plasmid* **30**: 197-211.
- Oard, J.H., Linscombe, S.D., Braveramn, M.P., Jodari, F., Blouin, D.C., Leech, M., Kohli, A., Vain, P. Cooley, J.C. y Christou, P. (1996) *Mol. Breed.* **2**: 359-368.
- 20 Penazloza, V., et al. (1995) *Plant Cell Reports* **14**:482-487.
- Rudraswamy, V., y Reichert, N.A. (1997) M.S. Thesis. Mississippi State Univ.
- Rogers, S.O., y Bendich, A.J. (1988) en *Plant Molecular Biology Manual*, ed. Gelvin, S.B. y Schilperoot, R.A. (Kulwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands) p.A6:1-10.
- 25 Sambrook, J., Fritch, E.F. y Maniatis, T. (1989) en *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanford, J.C. (1988) *Trends In Biotech.* **6**: 299-302.
- Sankula, S., Braverman, M.P., Jordari, F., Linscombe, S.D. y Oard, J.A. (1996) *Weed Technol.* **11**:70-75.
- Schultz, A., Wengenmayer, F. y Goodman, H. (1990) *Critical Review in Plant Sciences* **9**: 1-15.
- Shaner y Anderson, P.C., (1985), *Biotechnology in Plant Science*, 287.
- 30 Sijmons, P.C., Cekker, B.M.M., Schrammeijer, B., Verwoerd, T.C., van den Elzen, P.J.M., Hoekema, A. (1990) *Biotechnology* **8**: 217-221.
- Stalker, et al. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**: 4724.
- Stummann et al. (1988) *Physiologia Plantarum* **72**: 139-146.
- Svab, Z. y Maliga, P. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **90**: 913-917.
- 35 Svab, Z., Hajdukiewicz, P. y Maglia, P. (1990) *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* **87**: 8526-8530.
- Umbeck, P.F., et al. (1991) *Econ. Entomology* **84**: 1943-1950.
- Urry, D.W., Nicol, A., Gowda, D.C., Hbban, L.D., McKee, A., Williams, T., Olsen, D.B. y Cox, B.A. (1993) en *Biotechnological Polymers: Medical, Pharmaceutical and Industrial Applications*, ed. Gebelein, C.G. (Technomic Publishing Co., Inc., Atlanta, GA), p. 82-103.
- 40 Widner, W.R. y Whiteley, H.R. (1989) *J. Bacteriol.* **171**: 961-974.

Yadav, et al. (1986) *Proc. Natl. Acad. (USA)* **83**: 4418-4422.

Ye, G.N., Daniell, H. y Sanford, J.C. (1990) *Plant Mol Biol.* **15**: 809-819.

Yeh, H., Ornstein-Goldstein, N., Indik, Z., Sheppard, P., Anderson, N., Rosenbloom, J., Cicilia, G., Yoon, K. y Rosenbloom, J. (1987) *Collagen Related Res.* **7**: 235-247.

5 Zhang, X., Guda, C., Datta, R., Dute, R., Urry, D.W. y Daniell, H. (1996) *Plant Cell Reports* **15**: 381-385.

Zhang, X., Guda, C., Dalla, R., Dute, R., Urry, D.W., Danell, H.(1995) *Biotechnology Letters* **17**: 1279-1284.

Zhang , X., Urry, D.W. y Daniell, H. (1996) *Plant Cell Rep.* **16**: 174-179.

Current Protocols in Molecular Biology, Asubel et al., eds., John Wiley y Sons, Inc. (1997) Vol. I, II y III.

10 Herbicide Resistance Crops, Agricultural, Environmental, Economic, Regulatory and Technical Aspects, Duke, S.O., ed., CRC Press, Inc. (1996).

Herbicide Resistance in Plants, Biology and Biochemistry, Powles, S.B., y Holtum, J.A.M., eds., CRC, Press, Inc. (1994).

En las siguientes realizaciones preferidas de la memoria descriptiva

15 1. Un vector universal de integración y de expresión, competente para transformar de forma estable el genoma del cloroplasto de diferentes especies vegetales, que comprende un casete de expresión que comprende, operablemente unidas, una secuencia de ADN heteróloga que codifica una molécula de interés, y secuencias de control situadas en dirección 5' desde el extremo 5' y en dirección 3' desde el extremo 3' de la secuencia codificante, para proporcionar la expresión de la secuencia codificante en el genoma del cloroplasto de una planta diana, y, flanqueando cada lado del casete de expresión, secuencias de ADN de flaqueo que son homólogas con una secuencia espaciadora del genoma del cloroplasto diana, secuencia la cual se conserva en el genoma del cloroplasto de diferentes especies vegetales, con lo que se facilita la integración estable de la secuencia codificante heteróloga en el genoma del cloroplasto de la planta diana mediante la recombinación homóloga de las secuencias de flaqueo con las secuencias homólogas en el genoma del cloroplasto diana.

25 2. Un vector universal de integración y de expresión, competente para transformar de forma estable el genoma del cloroplasto de diferentes especies vegetales, que comprende un casete de expresión que comprende, operablemente unidas, una secuencia de ADN heteróloga que codifica un péptido de interés, y secuencias de control situadas en dirección 5' desde el extremo 5' y en dirección 3' desde el extremo 3' de la secuencia codificante, para proporcionar la expresión de la secuencia codificante en el genoma del cloroplasto de una planta diana, y, flanqueando cada lado del casete de expresión, secuencias de ADN de flaqueo que son homólogas con una secuencia espaciadora del genoma del cloroplasto diana, secuencia la cual se conserva en el genoma del cloroplasto de diferentes especies vegetales, con lo que se facilita la integración estable de la secuencia codificante heteróloga en el genoma del cloroplasto de la planta diana mediante la recombinación homóloga de las secuencias de flaqueo con las secuencias homólogas en el genoma del cloroplasto diana.

3. El vector del apartado 2, que comprende una secuencia nucleotídica heteróloga que codifica un fenotipo seleccionable.

40 4. El vector del apartado 3, en el que las secuencias de flaqueo comprenden, cada una, una porción de la región espaciadora 2 intergénica entre los genes ARNt^{lle} y ARNt^{Ala} del genoma del cloroplasto, con lo que se facilita, en el genoma del cloroplasto diana, la recombinación homóloga doble con la región espaciadora 2 conservada.

5. El vector del apartado 4, en el que las secuencias de flaqueo comprenden, cada una, además de la porción de la región espaciadora, parte o todos los genes de ARNt^{lle} y ARNt^{Ala}, respectivamente.

45 6. El vector del apartado 5, en el que las secuencias de flaqueo comprenden, cada una, además de la porción de la región espaciadora, parte o todas las secuencias de genes de ARNr 16S y/o 23S.

7. El vector del apartado 4, en el que la región espaciadora está localizada en una repetición invertida del genoma del cloroplasto.

8. El vector del apartado 5, en el que la región espaciadora está localizada en una repetición invertida del genoma del cloroplasto.

50 9. El vector del apartado 6, en el que la región espaciadora está localizada en una repetición invertida del genoma del cloroplasto.

10. El vector del apartado 4, que comprende, en la región espaciadora, un origen de la replicación del cloroplasto, con lo que se promueve la homoplasma con el genoma.
11. El vector del apartado 5, que comprende, en la región espaciadora, un origen de la replicación del cloroplasto, con lo que se promueve la homoplasma con el genoma.
- 5 12. El vector del apartado 6, que comprende, en la región espaciadora, un origen de la replicación del cloroplasto, con lo que se promueve la homoplasma con el genoma.
13. El vector del apartado 7, que comprende, en la región espaciadora, un origen de la replicación del cloroplasto, con lo que se promueve la homoplasma con el genoma.
- 10 14. El vector del apartado 8, que comprende, en la región espaciadora, un origen de la replicación del cloroplasto, con lo que se promueve la homoplasma con el genoma.
- 15 15. El vector del apartado 9, que comprende, en la región espaciadora, un origen de la replicación del cloroplasto, con lo que se promueve la homoplasma con el genoma.
16. El vector del apartado 4, en el que el ADN de las secuencias de flaqueo se origina a partir de una especie vegetal distinta de la planta diana.
- 15 17. El vector del apartado 5, en el que el ADN de las secuencias de flaqueo se origina a partir de una especie vegetal distinta de la planta diana.
18. El vector del apartado 6, en el que el ADN de las secuencias de flaqueo se origina a partir de una especie vegetal distinta de la planta diana.
- 20 19. El vector del apartado 7, en el que el ADN de las secuencias de flaqueo se origina a partir de una especie vegetal distinta de la planta diana.
20. El vector del apartado 8, en el que el ADN de las secuencias de flaqueo se origina a partir de una especie vegetal distinta de la planta diana.
21. El vector del apartado 9, en el que el ADN de las secuencias de flaqueo se origina a partir de una especie vegetal distinta de la planta diana.
- 25 22. El vector del apartado 10, en el que el ADN de las secuencias de flaqueo se origina a partir de una especie vegetal distinta de la planta diana.
23. El vector del apartado 11, en el que el ADN de las secuencias de flaqueo se origina a partir de una especie vegetal distinta de la planta diana.
- 30 24. El vector del apartado 12, en el que el ADN de las secuencias de flaqueo se origina a partir de una especie vegetal distinta de la planta diana.
25. El vector del apartado 13, en el que el ADN de las secuencias de flaqueo se origina a partir de una especie vegetal distinta de la planta diana.
26. El vector del apartado 14, en el que el ADN de las secuencias de flaqueo se origina a partir de una especie vegetal distinta de la planta diana.
- 35 27. El vector del apartado 15, en el que el ADN de las secuencias de flaqueo se origina a partir de una especie vegetal distinta de la planta diana.
28. El vector del apartado 13, en el que el ADN de las secuencias de flaqueo se origina a partir de una planta distinta de la planta diana procedente de la misma especie vegetal que la especie vegetal diana.
- 40 29. El vector del apartado 14, en el que el ADN de las secuencias de flaqueo se origina a partir de una planta distinta de la planta diana procedente de la misma especie vegetal que la especie vegetal diana.
30. El vector del apartado 15, en el que el ADN de las secuencias de flaqueo se origina a partir de una planta distinta de la planta diana procedente de la misma especie vegetal que la especie vegetal diana.
31. Una planta transformada de forma estable, que comprende cloroplasto transformado de forma estable con el vector del apartado 4, o la progenie de la misma.
- 45 32. Una planta transformada de forma estable, que comprende cloroplasto transformado de forma estable con el vector del apartado 5, o la progenie de la misma.

33. Una planta transformada de forma estable, que comprende cloroplasto transformado de forma estable con el vector del apartado 6, o la progenie de la misma.
34. Una planta transformada de forma estable, que comprende cloroplasto transformado de forma estable con el vector del apartado 7, o la progenie de la misma.
- 5 35. Una planta transformada de forma estable, que comprende cloroplasto transformado de forma estable con el vector del apartado 8, o la progenie de la misma.
36. Una planta transformada de forma estable, que comprende cloroplasto transformado de forma estable con el vector del apartado 9, o la progenie de la misma.
- 10 37. Una planta transformada de forma estable, que comprende cloroplasto transformado de forma estable con el vector del apartado 10, o la progenie de la misma.
38. Una planta transformada de forma estable, que comprende cloroplasto transformado de forma estable con el vector del apartado 11, o la progenie de la misma.
39. Una planta transformada de forma estable, que comprende cloroplasto transformado de forma estable con el vector del apartado 12, o la progenie de la misma.
- 15 40. Una planta transformada de forma estable, que comprende cloroplasto transformado de forma estable con el vector del apartado 25, o la progenie de la misma.
41. Una planta transformada de forma estable, que comprende cloroplasto transformado de forma estable con el vector del apartado 26, o la progenie de la misma.
- 20 42. Una planta transformada de forma estable, que comprende cloroplasto transformado de forma estable con el vector del apartado 27, o la progenie de la misma.
43. Una planta transformada de forma estable, que comprende cloroplasto transformado de forma estable con el vector del apartado 28, o la progenie de la misma.
44. Una planta transformada de forma estable, que comprende cloroplasto transformado de forma estable con el vector del apartado 29, o la progenie de la misma.
- 25 45. Una planta transformada de forma estable, que comprende cloroplasto transformado de forma estable con el vector del apartado 30, o la progenie de la misma.
46. La planta transformada de forma estable del apartado 31, que es una planta solanácea.
47. La planta transformada de forma estable del apartado 32, que es una planta solanácea.
48. La planta transformada de forma estable del apartado 33, que es una planta solanácea.
- 30 49. La planta transformada de forma estable del apartado 40, que es una planta solanácea.
50. La planta transformada de forma estable del apartado 41, que es una planta solanácea.
51. La planta transformada de forma estable del apartado 42, que es una planta solanácea.
52. La planta transformada de forma estable del apartado 31, que es monocotiledónea.
53. La planta transformada de forma estable del apartado 32, que es monocotiledónea.
- 35 54. La planta transformada de forma estable del apartado 33, que es monocotiledónea.
55. La planta transformada de forma estable del apartado 31, que es dicotiledónea.
56. La planta transformada de forma estable del apartado 32, que es dicotiledónea.
57. La planta transformada de forma estable del apartado 33, que es dicotiledónea.
58. La planta transformada de forma estable del apartado 34, que es monocotiledónea.
- 40 59. La planta transformada de forma estable del apartado 35, que es monocotiledónea.
60. La planta transformada de forma estable del apartado 36, que es monocotiledónea.
61. La planta transformada de forma estable del apartado 34, que es dicotiledónea.

62. La planta transformada de forma estable del apartado 35, que es dicotiledónea.
63. La planta transformada de forma estable del apartado 36, que es dicotiledónea.
64. La planta transformada de forma estable del apartado 37, que es monocotiledónea.
65. La planta transformada de forma estable del apartado 38, que es monocotiledónea.
- 5 66. La planta transformada de forma estable del apartado 39, que es monocotiledónea.
67. La planta transformada de forma estable del apartado 37, que es dicotiledónea.
68. La planta transformada de forma estable del apartado 38, que es dicotiledónea.
69. La planta transformada de forma estable del apartado 39, que es dicotiledónea.
70. La planta transformada de forma estable del apartado 40, que es monocotiledónea.
- 10 71. La planta transformada de forma estable del apartado 41, que es monocotiledónea.
72. La planta transformada de forma estable del apartado 42, que es monocotiledónea.
73. La planta transformada de forma estable del apartado 64, que es maíz, arroz, hierba, centeno, cebada, avena o trigo.
- 15 74. La planta transformada de forma estable del apartado 65, que es maíz, arroz, hierba, centeno, cebada, avena o trigo.
75. La planta transformada de forma estable del apartado 66, que es maíz, arroz, hierba, centeno, cebada, avena o trigo.
76. La planta transformada de forma estable del apartado 67, que es haba de soja, cacahuete, uva, patata, boniato, guisante, cáñola, tabaco, tomate o algodón.
- 20 77. La planta transformada de forma estable del apartado 68, que es haba de soja, cacahuete, uva, patata, boniato, guisante, cáñola, tabaco, tomate o algodón.
78. La planta transformada de forma estable del apartado 69, que es haba de soja, cacahuete, uva, patata, boniato, guisante, cáñola, tabaco, tomate o algodón.
- 25 79. La planta transformada de forma estable del apartado 70, que es maíz, arroz, hierba, centeno, cebada, avena o trigo.
80. La planta transformada de forma estable del apartado 71, que es maíz, arroz, hierba, centeno, cebada, avena o trigo.
81. La planta transformada de forma estable del apartado 72, que es maíz, arroz, hierba, centeno, cebada, avena o trigo.
- 30 82. La planta transformada de forma estable del apartado 67, que es haba de soja, cacahuete, uva, patata, boniato, guisante, cáñola, tabaco, tomate o algodón.
83. La planta transformada de forma estable del apartado 68, que es haba de soja, cacahuete, uva, patata, boniato, guisante, cáñola, tabaco, tomate o algodón.
- 35 84. La planta transformada de forma estable del apartado 69, que es haba de soja, cacahuete, uva, patata, boniato, guisante, cáñola, tabaco, tomate o algodón.
85. Un procedimiento para transformar de forma estable una especie vegetal diana, que comprende introducir un vector universal de integración y de expresión en el genoma del cloroplasto de la planta diana, y permitir que la planta transformada crezca, siendo el vector competente para transformar de forma estable el cloroplasto de diferentes especies vegetales, y comprendiendo un casete de expresión que comprende, operablemente unidas, una secuencia de ADN heteróloga que codifica una molécula de interés, y secuencias de control situadas en dirección 5' desde el extremo 5' y en dirección 3' desde el extremo 3' de la secuencia codificante, para proporcionar la expresión de la secuencia codificante en el cloroplasto de la planta diana, una secuencia heteróloga que codifica un fenotipo seleccionable, y, flanqueando cada lado del casete de expresión, secuencias de ADN de flaqueo que comprenden, cada una, una porción de la región espaciadora 2 intergénica entre los genes ARNt^{le} y ARNt^{Ala} del genoma del cloroplasto, que son homólogas con una secuencia espaciadora del genoma del cloroplasto diana, secuencia la cual se conserva en el genoma del cloroplasto de diferentes especies vegetales, con lo que se facilita la integración estable de la secuencia

codificante heteróloga en el genoma del cloroplasto de la planta diana mediante la recombinación homóloga de las secuencias de flanqueo con las secuencias homólogas, en el genoma del cloroplasto diana.

- 5 86. Un procedimiento para transformar de forma estable una especie vegetal diana, que comprende introducir un vector universal de integración y de expresión en el genoma del cloroplasto de la especie vegetal diana, y permitir que la planta transformada crezca, siendo el vector competente para transformar de forma estable el cloroplasto de diferentes especies vegetales, y comprendiendo un casete de expresión que comprende, operablemente unidas, una secuencia de ADN heteróloga que codifica un péptido de interés, y secuencias de control situadas en dirección 5' desde el extremo 5' y en dirección 3' desde el extremo 3' de la secuencia codificante, para proporcionar la expresión de la secuencia codificante en el cloroplasto de la planta diana,
- 10 una secuencia nucleotídica heteróloga que codifica un fenotipo seleccionable, y, flanqueando cada lado del casete de expresión, secuencias de ADN de flanqueo que comprenden, cada una, una porción de la región espaciadora 2 intergénica entre los genes ARN^t_{le} y ARN^t_{Ala} del genoma del cloroplasto, que son homólogas con una secuencia espaciadora del genoma del cloroplasto diana, secuencia la cual se conserva en el genoma del cloroplasto de diferentes especies vegetales, con lo que se facilita la integración estable de la
- 15 secuencia codificante heteróloga en el genoma del cloroplasto de la planta diana mediante la recombinación homóloga de las secuencias de flanqueo con las secuencias homólogas, en el genoma del cloroplasto diana.
87. El procedimiento del apartado 86, en el que la planta transformada es heteroplásmica.
88. El procedimiento del apartado 86, en el que la planta transformada es homoplásmica.
89. El procedimiento del apartado 88, en el que la planta transformada es una planta de primera generación.
- 20 90. El procedimiento del apartado 86, en el que la planta diana es una planta solanácea.
91. El procedimiento del apartado 86, en el que la planta transformada es monocotiledónea.
92. El procedimiento del apartado 86, en el que la planta transformada es dicotiledónea.
93. El procedimiento del apartado 91, en el que la planta transformada es una de las siguientes plantas monocotiledóneas: maíz, arroz, hierba, centeno, cebada, avena o trigo.
- 25 94. El procedimiento del apartado 92, en el que la planta transformada es una de las siguientes plantas dicotiledóneas: haba de soja, cacahuate, uva, boniato, guisante, cáñola, tabaco, tomate o algodón.
95. El procedimiento del apartado 86, que comprende aislar el péptido de interés.
96. El procedimiento del apartado 86, en el que el péptido de interés es un polipéptido.
- 30 97. El procedimiento del apartado 96, en el que el polipéptido es un polímero sintético a base de proteína (PBP).
98. El procedimiento del apartado 97, en el que el PBP tiene secuencias pentámeras que se repiten (GVGVP)_n, en las que "n" es un número entero de 1 a 250, "G" es glicina, "V" es valina y "P" es prolina.
99. El procedimiento del apartado 98, en el que "n" es 121.
100. El procedimiento del apartado 96, en el que el polipéptido expresado de interés es insulina.
- 35 101. El procedimiento del apartado 100, que comprende aislar la insulina.
102. El procedimiento del apartado 100, en el que la insulina está en forma de proinsulina.
103. El procedimiento del apartado 102, en el que la proinsulina está fusionada con un PSP.
104. El procedimiento del apartado 100, en el que la planta transformada es tabaco.
105. El procedimiento del apartado 96, en el que el polipéptido de interés es seroalbúmina humana (HSA).
- 40 106. El procedimiento del apartado 105, en el que la planta transformada es tabaco.
107. El vector del apartado 4, en el que el péptido de interés es una molécula biológicamente activa.
108. El vector del apartado 107, en el que el péptido es un polipéptido que es un polímero sintético a base de proteína (PBP).
- 45 109. El vector del apartado 108, en el que el PBP tiene secuencias pentámeras que se repiten (GVGVP)_n, en las que "n" es un número entero de 1 a 250, "G" es glicina, "V" es valina y "P" es prolina.

110. El vector del apartado 109, en el que el polipéptido es $(GVGVP)_n$, en la que el número entero "n" es 121.
111. El vector del apartado 108, en el que el PBP está fusionado a una molécula biológicamente activa.
112. El vector del apartado 111, en el que la molécula biológicamente activa es insulina.
113. El vector del apartado 112, en el que la insulina está en forma de proinsulina.
- 5 114. El polipéptido obtenido mediante el procedimiento del apartado 96.
115. El PBP obtenido mediante el procedimiento del apartado 97.
116. La proinsulina obtenida mediante el procedimiento del apartado 102.
117. La HSA obtenida mediante el procedimiento del apartado 105.
- 10 118. Una planta transformada de forma estable, que comprende un genoma de cloroplasto transformado de forma estable con el vector del apartado 107, que comprende una molécula biológicamente activa.
119. La planta cosechada del apartado 118.
120. La molécula biológicamente activa aislada de la planta del apartado 118.
121. La molécula biológicamente activa del apartado 120, que es insulina.
122. La planta transformada de forma estable del apartado 118, que es tabaco.
- 15 123. Una especie vegetal diana, resistente a herbicidas, transformada de forma estable, o la progenie de la misma, que comprende cloroplasto transformado de forma estable con un vector universal de integración y de expresión, competente para la transformación estable del cloroplasto de diferentes especies vegetales, que comprende un casete de expresión el cual comprende una proteína heteróloga de interés expresada mediante una secuencia de ADN heteróloga en el genoma del cloroplasto de la especie vegetal diana, un fenotipo seleccionado distinto de la tolerancia a dicho herbicida, y, flanqueando cada lado del casete de expresión, secuencias de ADN de flaqueo que comprenden, cada una, una porción de la región espaciadora 2 intergénica entre los genes $ARNt^{Ile}$ y $ARNt^{Ala}$ del genoma del cloroplasto, que son homólogas con una secuencia espaciadora del genoma del cloroplasto diana, secuencia la cual se conserva en el genoma del cloroplasto de diferentes especies vegetales, con lo que se facilita la integración estable de la proteína heteróloga en el genoma del cloroplasto de la planta diana mediante la recombinación homóloga de las secuencias de flaqueo con las secuencias homólogas en el genoma del cloroplasto diana.
- 20 124. La planta diana resistente a herbicidas del apartado 123, en la que la proteína de interés es una forma mutante de una enzima que tiene una afinidad por el herbicida menor que la que tiene la enzima de origen natural.
- 25 125. La planta diana resistente a herbicidas del apartado 123, en el que el herbicida es glifosato.
- 30 126. La planta diana resistente a herbicidas del apartado 125, en la que la enzima es EPSP sintasa.
127. La planta diana resistente a herbicidas del apartado 124, en el que el herbicida se selecciona de al menos uno de los siguientes tipos: de tipo PSI, PSII, APP, análogo de la auxina, mitótico, ácidos aminometilfosfóricos terciarios, y de los tipos inhibidores de ALS.
- 35 128. La planta diana resistente a herbicidas del apartado 127, en la que el herbicida es del tipo PSI seleccionado de paraquat y diquat.
129. La planta diana resistente a herbicidas del apartado 127, en la que el herbicida se selecciona de atrazina, dinoseb, lenacilo y metribuzina.
- 40 130. La planta diana resistente a herbicidas del apartado 127, en la que el herbicida es del tipo APP seleccionado de ciclohexanodiona, haloxifop, cletodim, y fenoxaprop, y sus moléculas sustituidas con alquilos inferiores.
131. La planta diana resistente a herbicidas del apartado 127, en la que el herbicida es un análogo de la auxina seleccionado de MCPA y 2,4-D.
- 45 132. La planta diana resistente a herbicidas del apartado 127, en la que el herbicida es un herbicida de tipo mitótico, que es dinitroanilina.
133. La planta diana resistente a herbicidas del apartado 124, en la que el herbicida es un tipo de ácido aminometilfosfórico terciario, que es glifosato.

134. La planta diana resistente a herbicidas del apartado 127, en la que el herbicida es un tipo inhibidor de ALS, seleccionado de sulfonilureas e imidazolinas.
135. La planta diana resistente a herbicidas del apartado 127, en la que el herbicida se selecciona de bromoxinilo, metilsulfurón, clorsulfurón, fosfotricina e imazapir.
- 5 136. La planta diana resistente a herbicidas del apartado 123, en la que el fenotipo expresado es resistencia a antibióticos.
137. La planta resistente a herbicidas del apartado 123, en la que el fenotipo seleccionable está codificado por el gen de higromicina que confiere resistencia a herbicidas.
- 10 138. La planta diana resistente a herbicidas del apartado 127, que es maíz, arroz, hierba, centeno, cebada, avena, trigo, haba de soja, cacahuete, uva, boniato, guisante, cáñola, tabaco, tomate o algodón.
139. La planta diana resistente a herbicidas del apartado 138, que es una planta homoplásmica.
140. Un procedimiento para conferir resistencia a herbicidas a una especie vegetal diana, que comprende introducir en la planta un vector universal de integración y de expresión, competente para transformar de forma estable el cloroplasto de diferentes especies vegetales, vector el cual comprende un casete de expresión que comprende, operablemente unidas, una secuencia de ADN heteróloga que codifica una proteína de interés que confiere resistencia a un herbicida, y secuencias de control situadas en dirección 5' desde el extremo 5' y en dirección 3' desde el extremo 3' de la secuencia codificante, para proporcionar la expresión de la secuencia codificante en el cloroplasto de la planta diana, una secuencia nucleotídica heteróloga que codifica un fenotipo seleccionable distinto de la tolerancia a dicho herbicida, y, flanqueando cada lado del casete de expresión, secuencias de flanqueo que comprenden, cada una, una porción de la región espaciadora 2 intergénica entre los genes ARNt^{lle} y ARNt^{Ala} del genoma del cloroplasto, las cuales son homólogas con una secuencia espaciadora del genoma del cloroplasto diana, secuencia la cual se conserva en el genoma del cloroplasto de diferentes especies vegetales, con lo que se facilita la integración estable de la secuencia codificante heteróloga en el genoma del cloroplasto de la planta diana mediante la recombinación homóloga de las secuencias de flanqueo con las secuencias homólogas en el genoma del cloroplasto diana; y hacer crecer a la planta transformada.
- 15 20 25
141. El procedimiento del apartado 140, en el que la secuencia de ADN codifica una forma mutante de una enzima que tiene una afinidad por el herbicida menor que la que tiene la enzima de origen natural.
142. El procedimiento del apartado 141, en el que la enzima es EPSP sintasa, y el herbicida es glifosato.
- 30 143. El procedimiento del apartado 142, en el que la secuencia de ADN es el gen de EPSP sintasa, que es un gen de EPSP sintasa mutante.
144. El procedimiento del apartado 140, que comprende seleccionar las plantas diana transformadas, viables, de un medio que es letal para las plantas no transformadas.
- 35 145. El procedimiento del apartado 144, en el que las plantas diana transformadas viables son plantas homoplásmicas.
146. El procedimiento del apartado 144, en el que las plantas diana transformadas viables son plantas heteroplásmicas.
- 40 147. El procedimiento del apartado 140, en el que la planta diana resistente a herbicidas es tabaco, la secuencia nucleotídica codifica un fenotipo seleccionable que es letal para el tabaco, o un rasgo visual que permite seleccionar las plantas de tabaco transformadas de las plantas no transformadas.
148. El procedimiento del apartado 147, en el que el fenotipo seleccionable letal es higromicina, a la que el tabaco no es resistente de forma natural.
149. El procedimiento del apartado 147, en el que el rasgo visual es la expresión de un color.
- 45 150. El procedimiento del apartado 140, para transformar de forma estable el fenotipo de una especie vegetal diana, con lo que la planta transformada crecida expresa el fenotipo seleccionable y otro rasgo, además de la expresión de ese fenotipo.
151. El procedimiento del apartado 150, en el que el fenotipo seleccionado se confiere mediante expresión del gen de la higromicina β -fosfotransferasa, y el rasgo adicional que se confiere es la resistencia al herbicida glifosato.
- 50 152. Un procedimiento para determinar la transformación del cloroplasto y la expresión de un rasgo diana en base a la adquisición por la especie vegetal diana de resistencia a un herbicida seleccionado debido a la

transformación de la especie vegetal, que comprende introducir en la planta un vector universal de integración y de expresión, competente para transformar de forma estable el cloroplasto de diferentes especies vegetales, que comprende un casete de expresión el cual comprende, operablemente unidas, una secuencia de ADN heteróloga que codifica el rasgo diana deseado, y secuencias de control situadas en dirección 5' desde el extremo 5' y en dirección 3' desde el extremo 3' de la secuencia codificante, para proporcionar la expresión de la secuencia codificante en el cloroplasto de una planta diana, una secuencia nucleotídica heteróloga que codifica un fenotipo seleccionable, y, flanqueando cada lado del casete de expresión, secuencias de ADN de flanqueo que comprenden, cada una, una porción de la región espaciadora 2 intergénica entre los genes ARNt^{le} y ARNt^{Ala} del genoma del cloroplasto, que son homólogas con una secuencia espaciadora del genoma del cloroplasto diana, secuencia la cual se conserva en el genoma del cloroplasto de diferentes especies vegetales, con lo cual se facilita la integración estable de la secuencia codificante heteróloga en el genoma del cloroplasto de la planta diana mediante recombinación homóloga de las secuencias de flanqueo con las secuencias homólogas en el genoma del cloroplasto diana; exponer a las plantas, en las que se ha introducido el vector, a una concentración letal del herbicida; y seleccionar las plantas que no mueren frente a su exposición, seleccionándose de ese modo a las plantas transformadas que expresan el rasgo diana deseado.

153. El procedimiento del apartado 152, en el que el herbicida seleccionado se selecciona de al menos uno de los siguientes tipos: de tipo PSI, PSII, APP, análogo de la auxina, mitótico, ácidos aminometilfosfóricos terciarios, y de los tipos inhibidores de ALS.

154. Una especie vegetal diana establemente transformada, resistente a insectos, o la progenie de la misma, que comprende genoma de cloroplasto transformado de forma estable con un vector universal de integración y de expresión, competente para la transformación estable del cloroplasto de diferentes especies vegetales, que comprende un casete de expresión el cual comprende una secuencia de ADN heteróloga que expresa una proteína diana que confiere resistencia a un insecto diana en el genoma del cloroplasto de la especie vegetal diana, un fenotipo seleccionado distinto de la tolerancia al insecto diana, y, flanqueando cada lado del casete de expresión, secuencias de ADN de flanqueo que comprenden, cada una, una porción de la región espaciadora 2 intergénica entre los genes ARNt^{le} y ARNt^{Ala} del genoma del cloroplasto, las cuales son homólogas con una secuencia espaciadora del genoma del cloroplasto diana, secuencia la cual se conserva en el genoma del cloroplasto de diferentes especies vegetales, con lo que se facilita la integración estable de la proteína heteróloga en el genoma del cloroplasto de la planta diana mediante la recombinación homóloga de las secuencias de flanqueo con las secuencias homólogas en el genoma del cloroplasto diana, en la que la proteína heteróloga es la toxina de la proteína CryIIA expresada por el gen *cryIIA*, proteína la cual confiere resistencia a insectos.

155. La especie vegetal diana, transformada de forma estable, resistente a insectos, del apartado 154, en la que el insecto es susceptible a la toxina de Bt.

156. La especie vegetal diana, transformada de forma estable, resistente a insectos, del apartado 154, en la que se supera la falta de susceptibilidad del insecto a la toxina de Bt.

157. La especie vegetal diana, transformada de forma estable, resistente a insectos, del apartado 155, en la que la planta diana es tabaco, y el insecto es el cogollero del tabaco.

158. La especie vegetal diana, transformada de forma estable, resistente a insectos, del apartado 156, en la que la planta diana es tabaco, algodón o remolacha, y el insecto es un gusano del capullo del algodón o una gardama, de tipo resistente a la toxina de Bt.

159. La planta diana, transformada de forma estable, resistente a insectos, del apartado 154, en la que el insecto es el cogollero del tabaco, el gusano del capullo del algodón, o gardama.

160. Un vector seleccionado de los siguientes: pSBL-RD-EPSPS, pSBL-CG-EG121, pSBL-Ct-Border, pSBL-Ct-V1, pSBL-Ct-V2, pSBL-Ct-V3, pSBL-Ct-VH, pSBL-Ct-VHF, y pSBL-Ct-VHBt.

161. El vector del apartado 160, que es un vector universal de integración y expresión que es pSBL-RD-EPSPS, pSBL-CG-EG121, pSBL-CtV1, pSBL-CtV2, pSBL-CtV3, pSBL-CtVH, pSBL-Ct-VHF, y pSBL-Ct-VHBt.

162. Una secuencia de ADN aislada, que comprende la secuencia de ADN intergénica entre los genes de ADN_r 16S y 23S del genoma del cloroplasto de la planta, secuencia intergénica la cual se conserva enormemente en una multiplicidad de diferentes especies de plantas.

163. La secuencia de ADN aislada del apartado 162, que comprende la región espaciadora 2 que es la secuencia intergénica de ADN entre los genes de trnI y trnA del genoma del cloroplasto de la planta.

164. La secuencia intergénica de ADN aislada del apartado 163, que comprende los genes de trnI y trnA.

165. La secuencia de ADN aislada del apartado 163, que comprende una de las repeticiones invertidas del genoma del cloroplasto de la planta.
166. La secuencia de ADN aislada del apartado 165, que comprende un origen de la replicación.
- 5 167. La secuencia de ADN aislada del apartado 163, que comprende el operón de ARNr en la región espaciadora 2.
168. El vector universal de integración y de expresión del apartado 4, en el que la región espaciadora 2 comprende el operón de ARNr.
169. El vector universal de integración y de expresión del apartado 4, en el que las secuencias de flaqueo son sintéticas.
- 10 170. La especie vegetal diana resistente a herbicidas del apartado 85, en la que la secuencia de ADN, que codifica la proteína de interés, es de origen procariota.
171. El vector universal de integración y de expresión del apartado 2, que no incluye un transposón.
172. La especie vegetal diana transformada de forma estable del apartado 41, que no incluye un transposón.
- 15 173. El procedimiento para transformar de forma estable una especie vegetal diana del apartado 86, en el que el vector universal no incluye un transposón.
174. El vector universal de integración y de expresión del apartado 4, que comprende un promotor funcional en el cloroplasto.
- 20 175. El vector universal de integración y de expresión del apartado 4, que comprende una secuencia nucleotídica que codifica un fenotipo seleccionable que permite la identificación y selección de plantas transformadas, viables, de plantas no transformadas, no viables.
176. El procedimiento del apartado 86, que comprende seleccionar, de un medio que es letal para las plantas no transformadas, la planta diana transformada viable.
- 25 177. La planta diana establemente transformada, tolerante a herbicidas, o la progenie de la misma del apartado 123, que permite la identificación y selección de las plantas transformadas, viables, frente a las plantas no transformadas, no viables.
178. El procedimiento del apartado 140, que comprende seleccionar, de un medio que es letal para las plantas no transformadas, la planta diana transformada viable.
- 30 179. Un casete de expresión competente para transformar de forma estable genoma del cloroplasto de una planta diana, que comprende, operablemente unidas, una secuencia de ADN heteróloga que codifica una molécula de interés, secuencias de control para proporcionar la expresión de la secuencia codificante en el genoma del cloroplasto de la planta diana, y, flanqueando cada lado del casete, secuencias de ADN de la planta para facilitar la integración estable del ADN con el genoma del cloroplasto diana mediante recombinación homóloga, con lo que el ADN se integra de forma estable en él, y se hereda a través de la replicación de los orgánulos en las células hijas.
- 35 180. El casete de expresión del apartado 175, en el que la secuencia de ADN heteróloga es una secuencia sintética que codifica un polímero a base de proteína (PBP).
181. El casete de expresión del apartado 176, en el que el PBP tiene secuencias pentámeras que se repiten (GVGVP)_n, en las que "n" es un número entero de 1 a 250, "G" es glicina, "V" es valina y "P" es prolina.
- 40 182. El casete de expresión del apartado 177, en el que la secuencia codificante sintética es el gen biopolímero sintético EG121, y el PBP expresado es la proteína polímera (GVGVP)₁₂₁.
- 45 183. Un genoma de cloroplasto de una planta diana, transformado de forma estable, activo en la transcripción y en la traducción, el cual es competente para la integración estable de una secuencia de ADN heteróloga, que comprende un casete de expresión que comprende una molécula heteróloga de interés codificada por una secuencia de ADN heteróloga y expresada por secuencias de control en el genoma del cloroplasto de la planta diana, y ADN de la planta que flanquea cada lado del casete de expresión lo que facilitó la integración estable del ADN en el genoma del cloroplasto diana mediante recombinación homóloga, ADN el cual se hereda a través de la replicación de orgánulos en células hijas.
184. El cloroplasto transformado de forma estable del apartado 179, en el que la molécula de interés es un polímero a base de proteína (PBP).

185. El cloroplasto transformado de forma estable del apartado 180, en el que el PBP tiene secuencias pentámeras que se repiten (GVGVP)_n, en las que “n” es un número entero de 1 a 250, “G” es glicina, “V” es valina y “P” es prolina.
- 5 186. El cloroplasto transformado de forma estable del apartado 181, en el que la secuencia codificante sintética es el gen biopolímero sintético EG121, y el PBP expresado es la proteína polímera (GVGVP)₁₂₁.
187. El biopolímero sintético (GVGVP)_n que se expresa a partir del cloroplasto transformado de forma estable del apartado 182, en el que “n”, “G”, “V” y “P” son como se definen aquí.
188. El biopolímero sintético del apartado 183, que es (GVGVP)₁₂₁.

REIVINDICACIONES

1. Un vector universal de integración y de expresión, competente para transformar de forma estable el genoma del cloroplasto de diferentes especies vegetales, que comprende un casete de expresión que comprende, operablemente unidas, una secuencia de ADN heteróloga que codifica un péptido de interés, y secuencias de control situadas en dirección 5' desde el extremo 5' y en dirección 3' desde el extremo 3' de la secuencia codificante, para proporcionar la expresión de la secuencia codificante en el genoma del cloroplasto de una planta diana, y, flanqueando cada lado del casete de expresión, secuencias de ADN de flanqueo que son homólogas con una secuencia espaciadora del genoma del cloroplasto diana, secuencia la cual se conserva en el genoma del cloroplasto de diferentes especies vegetales, y secuencia la cual se inserta en una región espaciadora transcripcionalmente activa entre dos genes localizados en la misma hebra de ADN, con lo que se facilita la integración estable de la secuencia codificante heteróloga en el genoma del cloroplasto de la planta diana mediante la recombinación homóloga de las secuencias de flanqueo con las secuencias homólogas en el genoma del cloroplasto diana; en el que dicha secuencia codificante heteróloga codifica proteína de seroalbúmina humana, en el que el vector universal de integración y de expresión se puede usar para transformar plantas de diferentes familias.
2. Un vector universal de integración y de expresión, competente para transformar de forma estable el genoma del cloroplasto de diferentes especies vegetales, que comprende un casete de expresión que comprende, operablemente unidas, una secuencia de ADN heteróloga que codifica un péptido de interés, y secuencias de control situadas en dirección 5' desde el extremo 5' y en dirección 3' desde el extremo 3' de la secuencia codificante, para proporcionar la expresión de la secuencia codificante en el genoma del cloroplasto de una planta diana, y, flanqueando cada lado del casete de expresión, secuencias de ADN de flanqueo que son homólogas con una secuencia espaciadora del genoma del cloroplasto diana, secuencia la cual se conserva en el genoma del cloroplasto de diferentes especies vegetales, y secuencia la cual se inserta en una región espaciadora transcripcionalmente activa entre dos genes localizados en la misma hebra de ADN, con lo que se facilita la integración estable de la secuencia codificante heteróloga en el genoma del cloroplasto de la planta diana mediante la recombinación homóloga de las secuencias de flanqueo con las secuencias homólogas en el genoma del cloroplasto diana; en el que dicha secuencia codificante heteróloga codifica un anticuerpo recombinante, en el que el vector universal de integración y de expresión se puede usar para transformar plantas de diferentes familias.
3. Un vector universal de integración y de expresión, competente para transformar de forma estable el genoma del cloroplasto de diferentes especies vegetales, que comprende un casete de expresión que comprende, operablemente unidas, una secuencia de ADN heteróloga que codifica un péptido de interés, y secuencias de control situadas en dirección 5' desde el extremo 5' y en dirección 3' desde el extremo 3' de la secuencia codificante, para proporcionar la expresión de la secuencia codificante en el genoma del cloroplasto de una planta diana, y, flanqueando cada lado del casete de expresión, secuencias de ADN de flanqueo que son homólogas con una secuencia espaciadora del genoma del cloroplasto diana, secuencia la cual se conserva en el genoma del cloroplasto de diferentes especies vegetales, y secuencia la cual se inserta en una región espaciadora transcripcionalmente activa entre dos genes localizados en la misma hebra de ADN, con lo que se facilita la integración estable de la secuencia codificante heteróloga en el genoma del cloroplasto de la planta diana mediante la recombinación homóloga de las secuencias de flanqueo con las secuencias homólogas en el genoma del cloroplasto diana; en el que dicha secuencia codificante heteróloga codifica una vacuna, en el que el vector universal de integración y de expresión se puede usar para transformar plantas de diferentes familias.
4. Un genoma de cloroplasto de una planta diana, transformado de forma estable, activo en la transcripción y en la traducción, genoma de cloroplasto el cual se ha transformado con un casete de expresión que comprende una molécula heteróloga de interés codificada por una secuencia de ADN heteróloga, regulada por secuencia de control para proporcionar expresión de la secuencia de ADN codificada en el genoma de cloroplasto de la planta diana, y ADN de la planta que flanquea cada lado del casete de expresión lo que facilitó la integración estable del ADN en el genoma del cloroplasto diana mediante recombinación homóloga, ADN el cual se hereda a través de la replicación de orgánulos en células hijas, en el que el casete de expresión se inserta en una región espaciadora transcripcionalmente activa entre dos genes localizados en la misma hebra de ADN del genoma del cloroplasto de la planta diana, dicha molécula heteróloga de interés es seroalbúmina humana, en el que el vector universal de integración y de expresión se puede usar para transformar plantas de diferentes familias.
5. Un genoma de cloroplasto de una planta diana, transformado de forma estable, activo en la transcripción y en la traducción, genoma de cloroplasto el cual se ha transformado con un casete de expresión que comprende una molécula heteróloga de interés codificada por una secuencia de ADN heteróloga, regulada por secuencia de control para proporcionar expresión de la secuencia de ADN codificada en el genoma de cloroplasto de la planta diana, y ADN de la planta que flanquea cada lado del casete de expresión lo que facilitó la integración estable del ADN en el genoma del cloroplasto diana mediante recombinación homóloga, ADN el cual se hereda a través de la replicación de orgánulos en células hijas, en el que el casete de expresión se inserta en una región espaciadora transcripcionalmente activa entre dos genes localizados en la misma hebra de ADN del genoma del cloroplasto de la planta diana, dicha molécula heteróloga de interés es un anticuerpo recombinante, en el que el vector universal de integración y de expresión se puede usar para transformar plantas de diferentes familias.

6. Un genoma de cloroplasto de una planta diana, transformado de forma estable, activo en la transcripción y en la traducción, genoma de cloroplasto el cual se ha transformado con un casete de expresión que comprende una molécula heteróloga de interés codificada por una secuencia de ADN heteróloga, regulada por secuencia de control para proporcionar expresión de la secuencia de ADN codificada en el genoma de cloroplasto de la planta diana, y ADN de la planta que flanquea cada lado del casete de expresión lo que facilitó la integración estable del ADN en el genoma del cloroplasto diana mediante recombinación homóloga, ADN el cual se hereda a través de la replicación de orgánulos en células hijas, en el que el casete de expresión se inserta en una región espaciadora transcripcionalmente activa entre dos genes localizados en la misma hebra de ADN del genoma del cloroplasto de la planta diana, dicha molécula heteróloga de interés es una vacuna, en el que el vector universal de integración y de expresión se puede usar para transformar plantas de diferentes familias.

7. Una planta o célula vegetal, o su progenie, transformada de forma estable, activa en la transcripción y en la traducción, en la que dicha planta comprende un cloroplasto transformado de forma estable con un vector universal de integración y de expresión según la reivindicación 1, 2 ó 3.

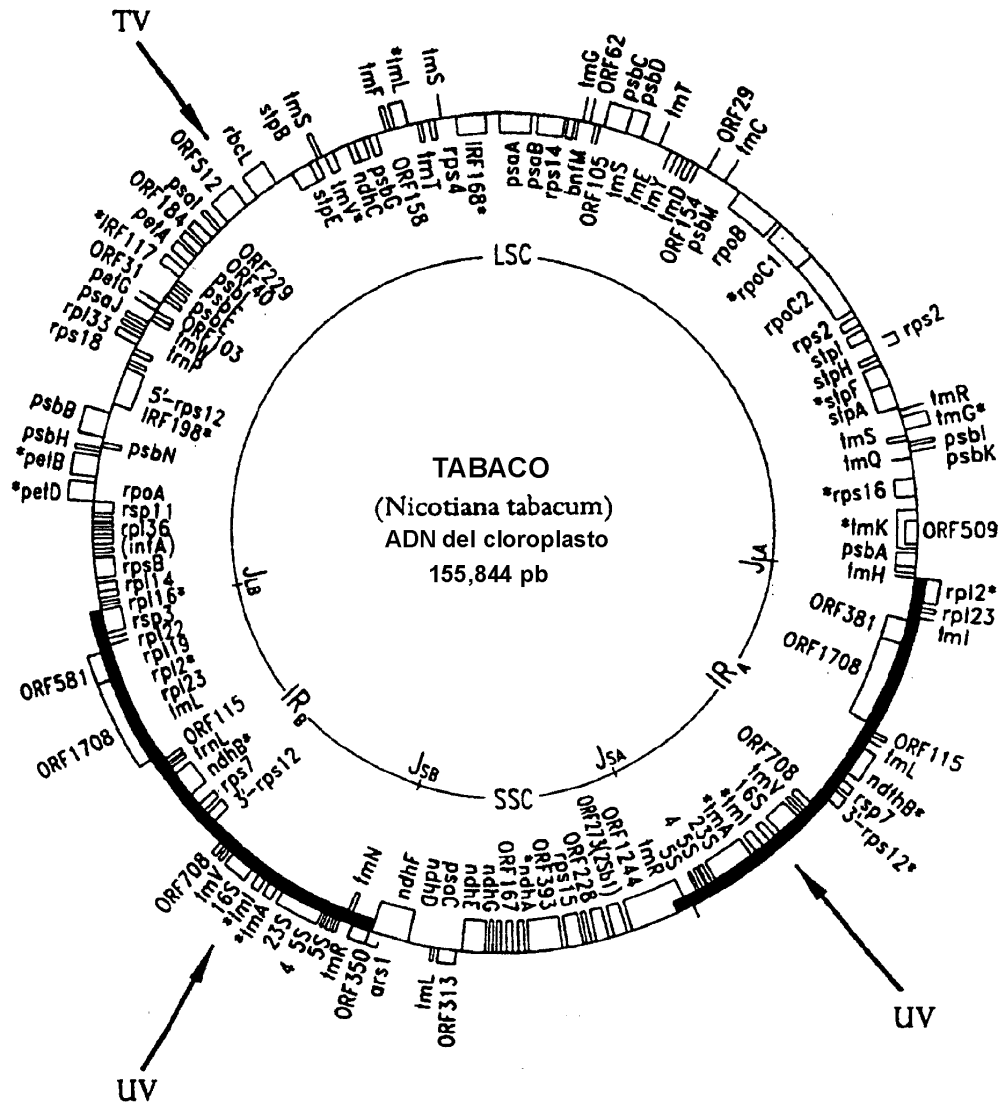


FIG. 1

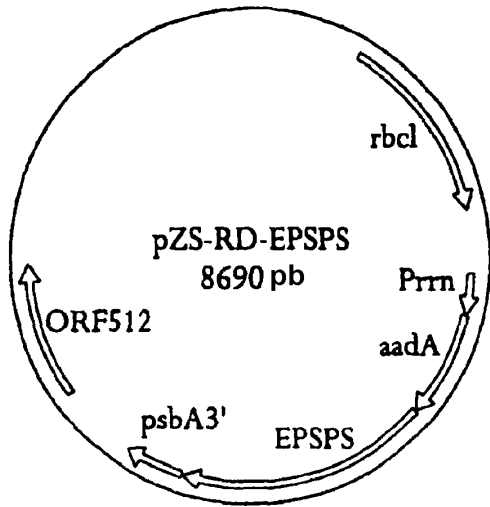


FIG. 2A

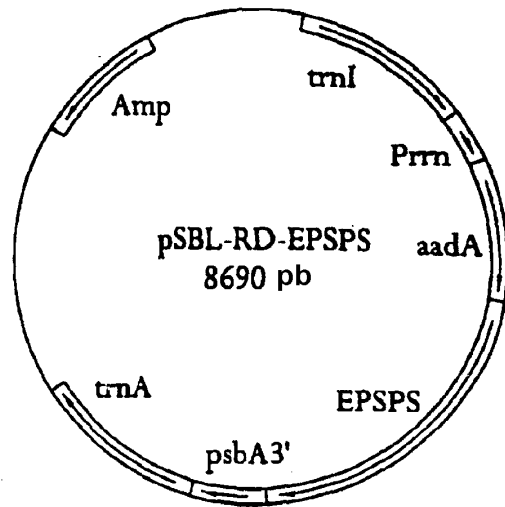


FIG. 2B

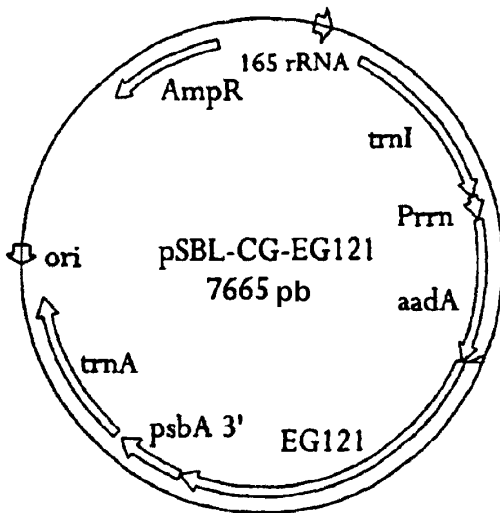


FIG. 3A

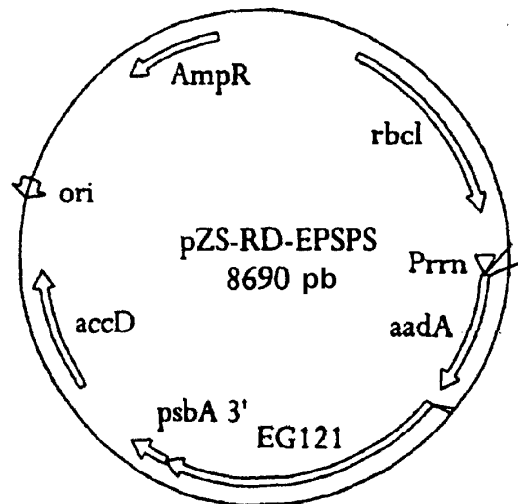


FIG. 3B


```

*****
S TAGGATGGGCAGTGGTCAGATCTAGTATGGATCGTACATGGACGGTAGTGGAGTCGGTGGCTCCTCCTAGGGTTCCTCATTGGGATC-CTGGGGGAAAG
1501 T TAGGATGGGCAGTGGTCAGATCTAGTATGGATCGTACATGGACGGTAGTGGAGTCGGTGGCTCCTCCTAGGGTTCCTCATTGGGATCTGGGGGAAAG
M TAGGATGGGCAGTGGTCAGATCTAGTATGGATCGTACATGGACGGTAGTGGAGTCGGTGGCTCCTCCTAGGGTTCCTCCTAGGGATCCCTGGGGGAAAG

*****
S AGGATCAAGCTGGCCCTGGCAACAGCTTGGATGCACATCTCCCTCAACCCCTTGAGCGAAATGTGGC-----AAAGGAAAAGAAATCCATGGACCCGA
1601 T AGGATCAAGTGGCCCTGGCAACAGCTTGGATGCACATCTCCCTCAACCCCTTGAGCGAAATGTGGC-----AAAGGAAAAGAAATCCATGGACCCGA
M AGGATCAAGTGGCCCTGGCAATAGCTTGGATGCACATCTCCCTCAACCCCTTGAGCGAAATGTGGC-----AAAGGAAAAGAAATCCATGGACCCGA

*****
S CCCCATCGTCTCCACCCGTTAGGACTACGAGATCACCCCAAGGAACCCCTTCGGCATCCAGGGGTCGGGGACCCACCA TAGAACCCGTGTCAAAAAGCG
1701 T CCCCATCATCTCCACCCGTTAGGACTACGAGATCACCCCAAGGAACCCCTTCGGCATCCAGGGGTCAGGGGTCAGCGGACCCCA TAGAACCCGTGTCAATAAGTGG
M CCCCATTCGCTCCACCCGTTAGGACTACGAGATCACCCCAAGGAGTTCGTCCTCAAATGGGGGTCATCGGGACCCCA TAG-ATCCGTGTCAATAAGTGG

*****
S GAACGCATTAGCTATCCGCTCAGGTGGACAGTAAAGGTGGAGAGGGCAATCATTCTTAA-112pbGTTAGAAATGGGATCCCAACTCAGCACCTT---
1801 T GAACGCATTAGCTATCCGCTCAGGTGGGCAGTCAAGGTGGAGAGGGCAATCATTCTTAA-----GTTAGAAATGGGATCCCAACTCAGCACCTTGTGA
M GAACACAATAGCCGTCCTCCGTTGGGCAGTAAAGGTGGAGAGGGCAATCATTCTTAA-103pb-TTAGAAATGGGATCCCAACTCAGCACCTTGTGT

*****
S --TGAGATTTGAGAAAGTTCCTCTTTGGAGACACAGTACGATGAAAGTGTGAGCCTGTGTTCGGGGGGGAGTATGTCTATCGTTGGCCCTCATGGT
1901 T G-TGAGATTTGAGAAAGTTCCTCTTTGGAGACACAGTACGATGAAAGTGTGAGCCTGTGTTCGGGGGGGAGTATGTCTATCGTTGGCCCTCATGGT
M TTTGGGATTTGAGAAAGTTCCTCTTTGGAGAGCACAGTACGATGAAAGTGTGAGCCTGTGTTCGGGGGGGAGTATGTCCCTATCGTTGTCTCTCATGGT

```

FIG. 4D

GUISANTE (89 %) GCTGGCCCAAGGAAAGACTAAAGACGGATTIGACTCCTTCATGCCATGCCAACCTGGCTCGG
 ESPINACA (89 %) ACTGGCCCAAGAATAAGAAATCGAAGAAGCGTCTGACTCCTTCATGCCATGCCA-CTTGGCTCGG

/ \
CGCCAGGGAA

TABACO (-) --- CCGAGCCAAGTGGAGCATGCATGAAGTAGCAGATGCTTCTTCTATTCTTTCCCTGGCCAGC
 CUSCUTA (96 %) CCGAGCCAAGTGGAGCATGCATGAAGTAGCAGATGCTTCTTGGATTCTTTCCCTGGCCAGC

FIG. 4G

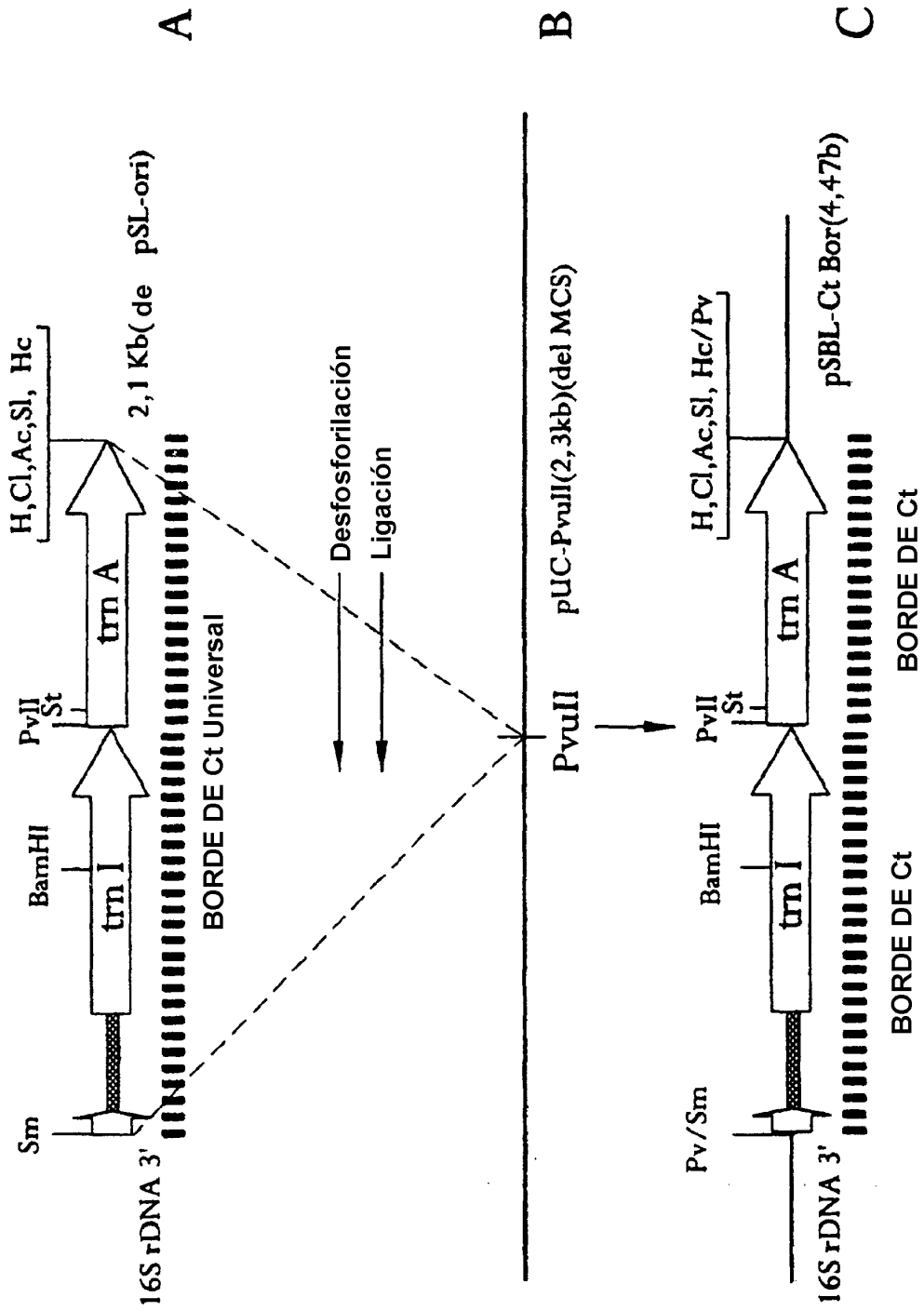


FIG. 5

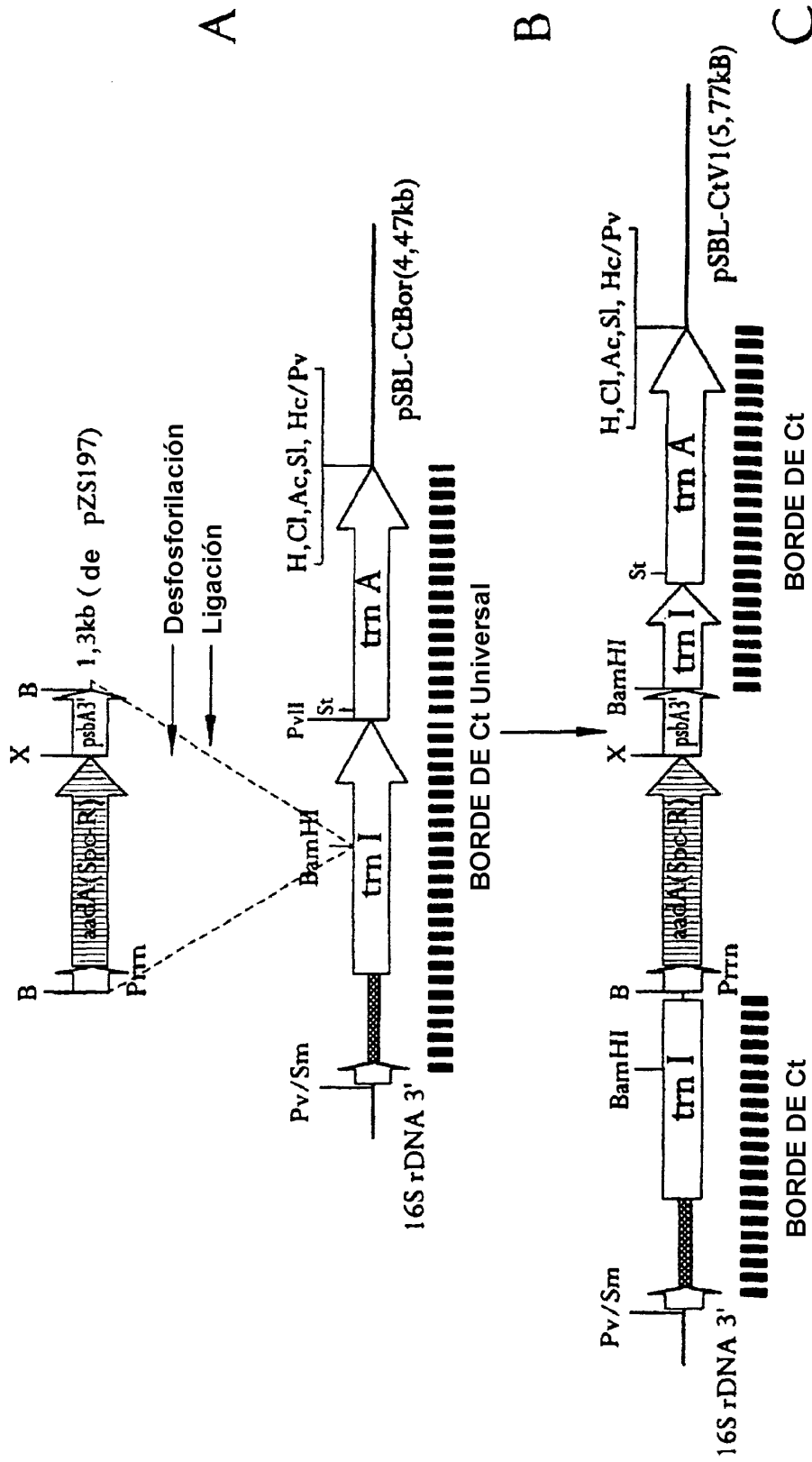


FIG. 6

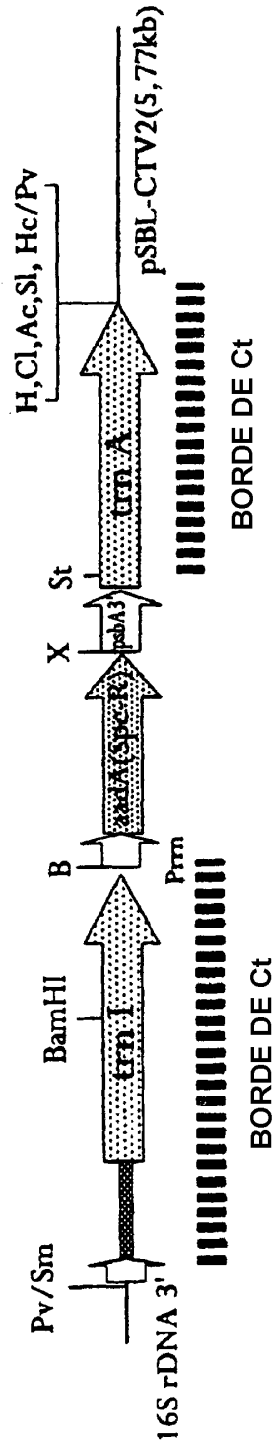


FIG. 7A

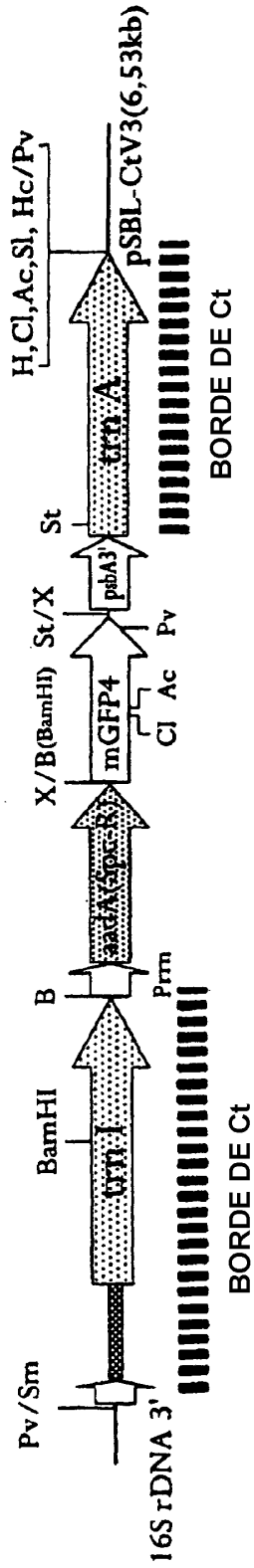


FIG. 7B

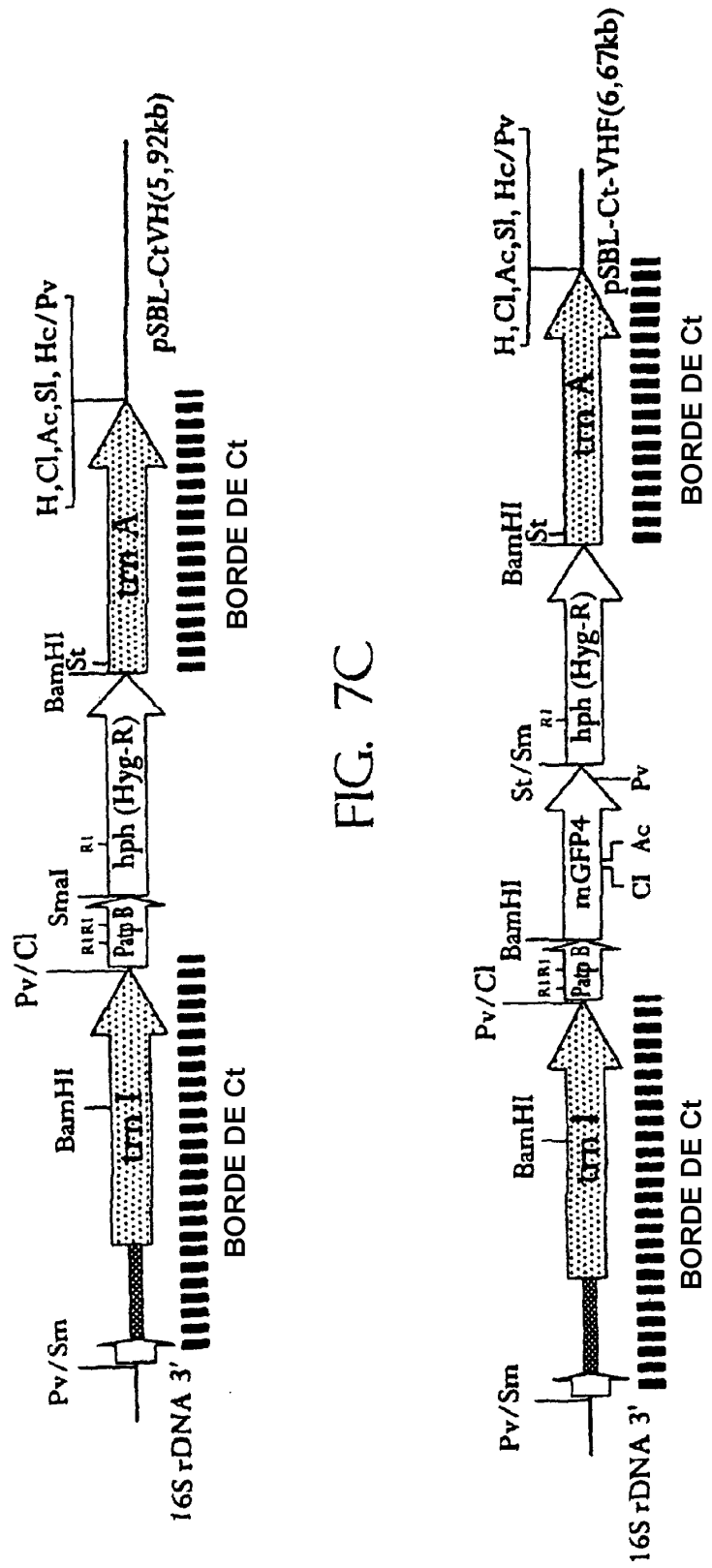


FIG. 7C

FIG. 7D

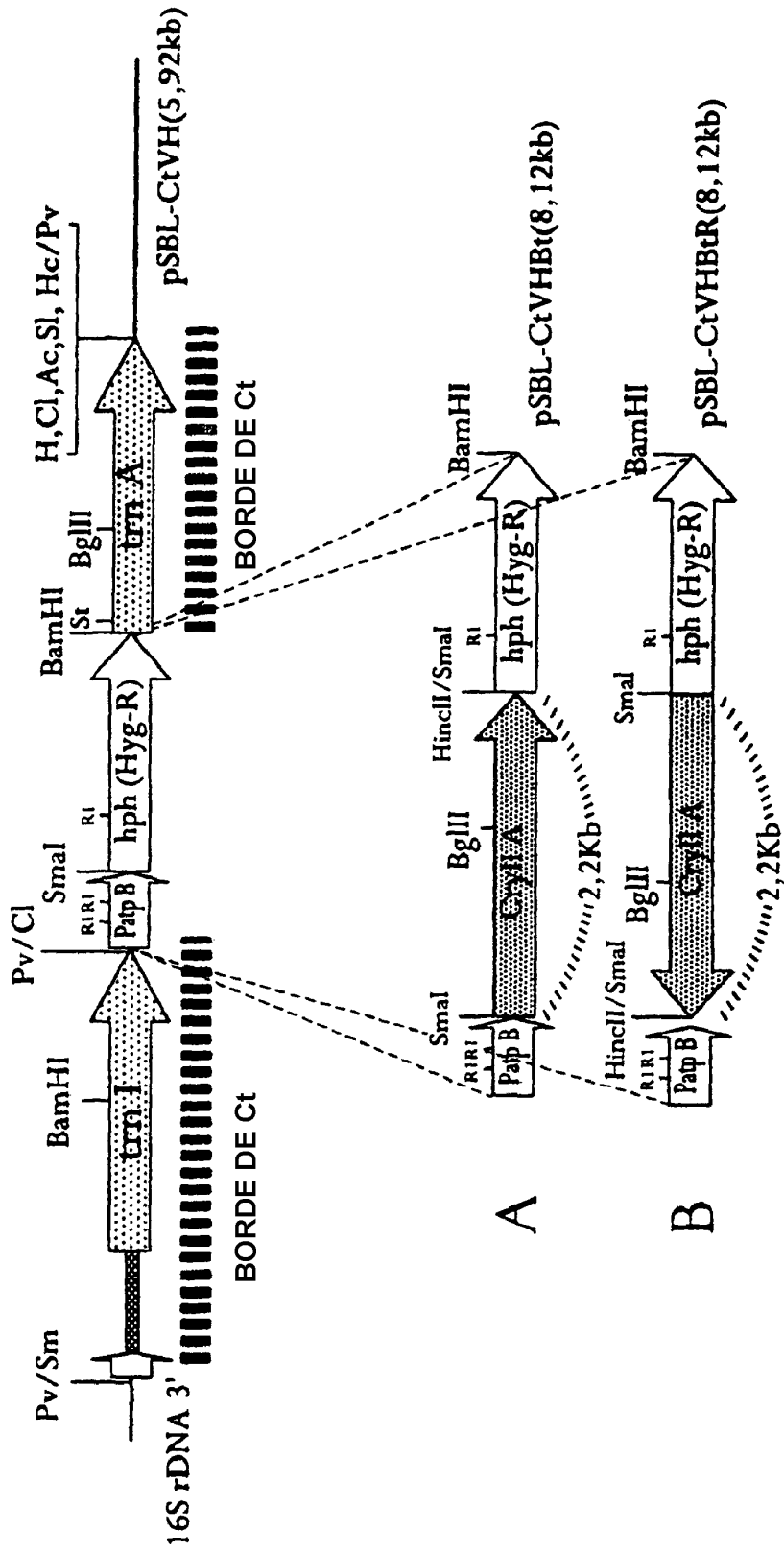


FIG. 8

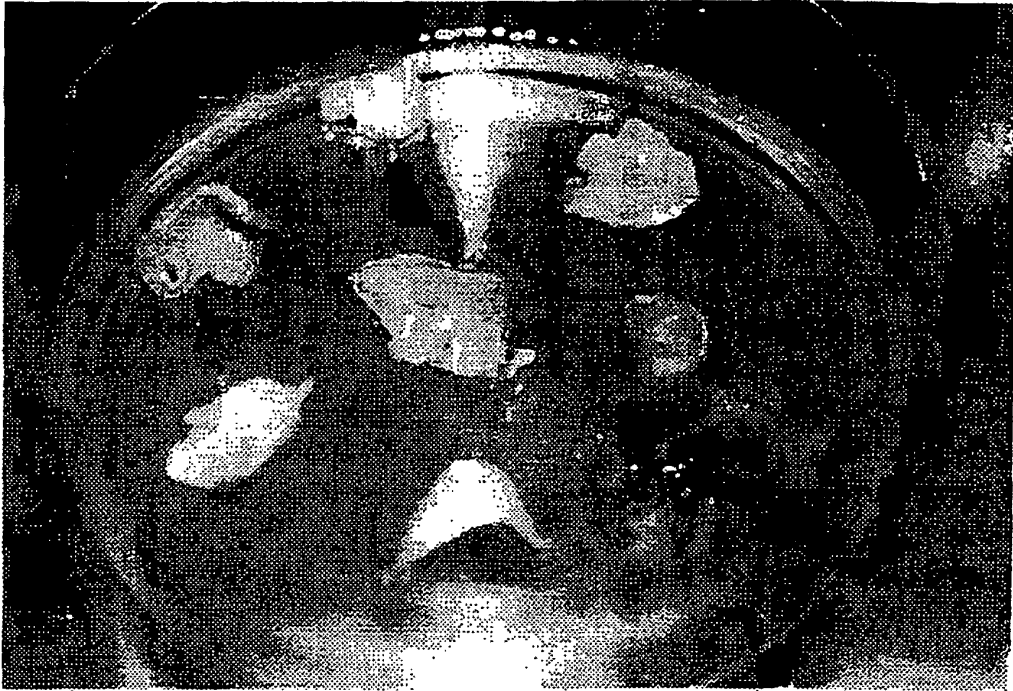


FIG. 9



FIG. 10A

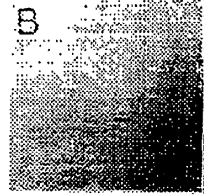


FIG. 10B

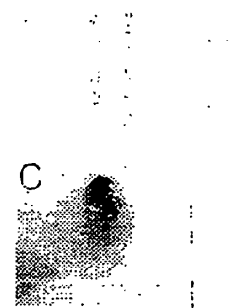


FIG. 10C



FIG. 10D



FIG. 10E

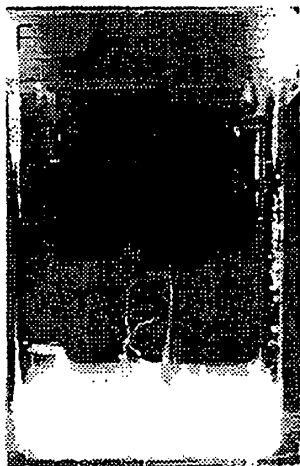


FIG. 10F



FIG. 10G

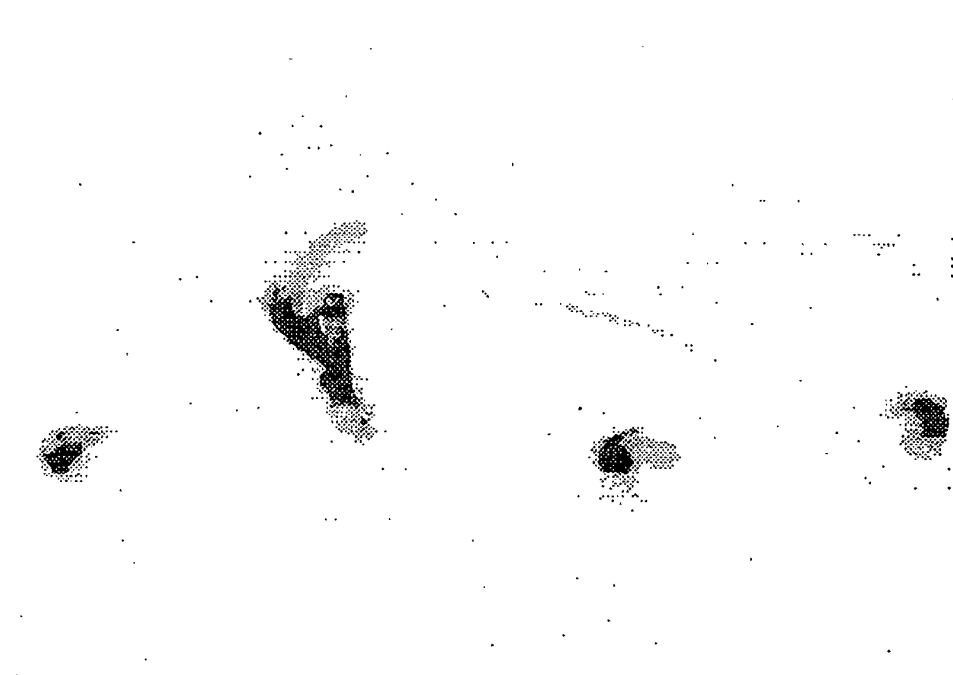


FIG. 11



FIG. 12A



FIG. 12B



FIG. 12C



FIG. 12D

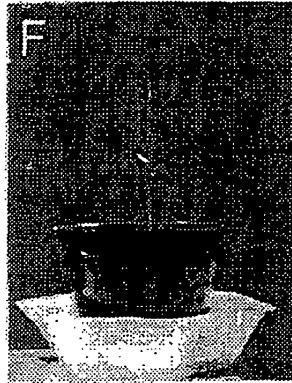


FIG. 12E

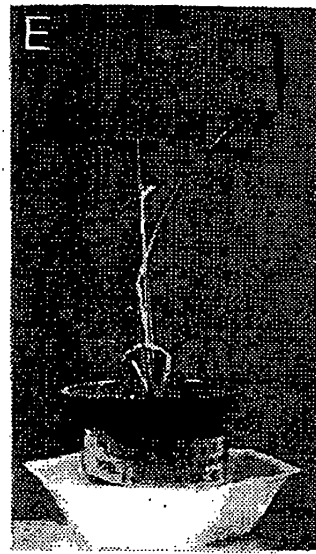


FIG. 12F

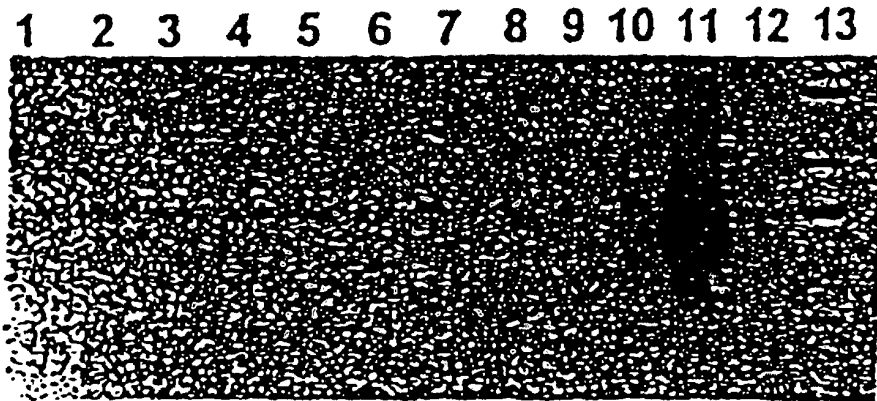


FIG. 13A

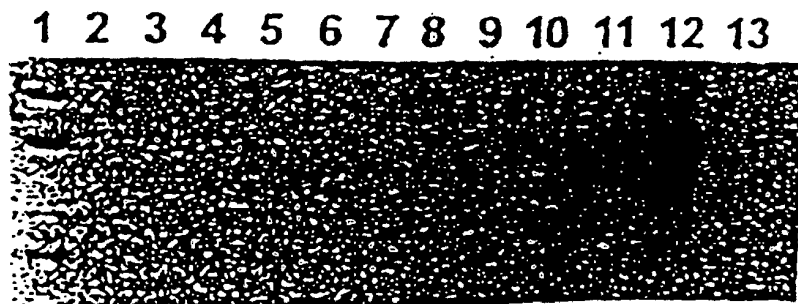


FIG. 13B

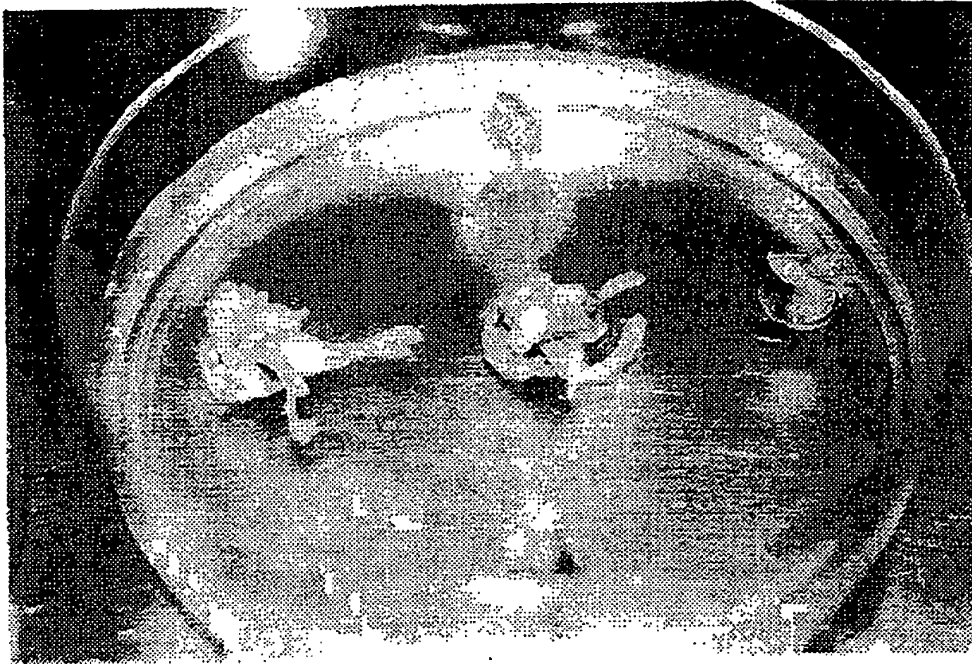


FIG. 14



FIG. 15

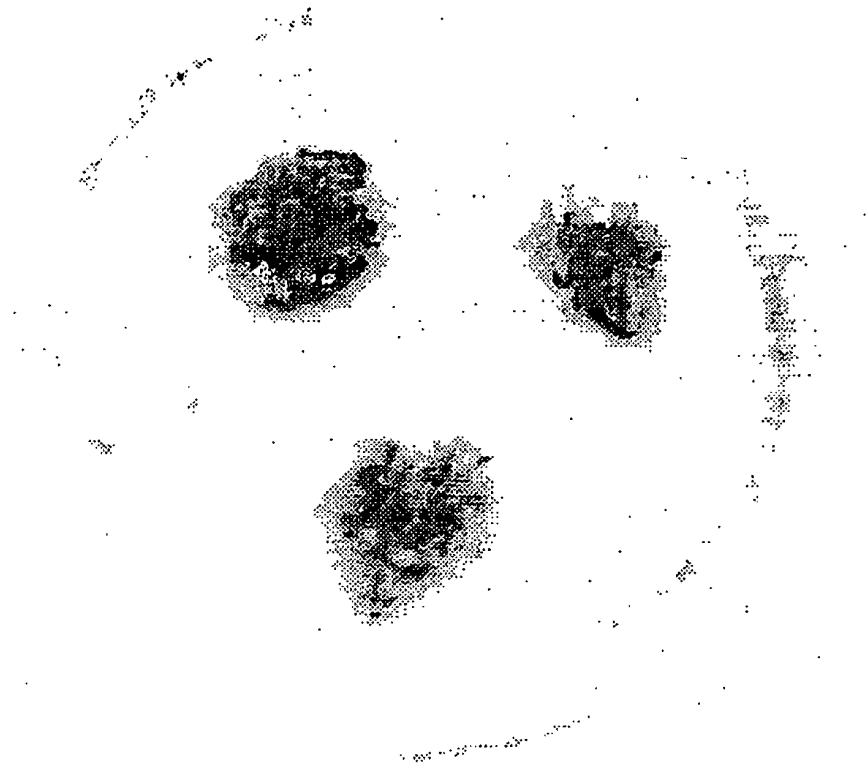


FIG. 16



FIG. 17

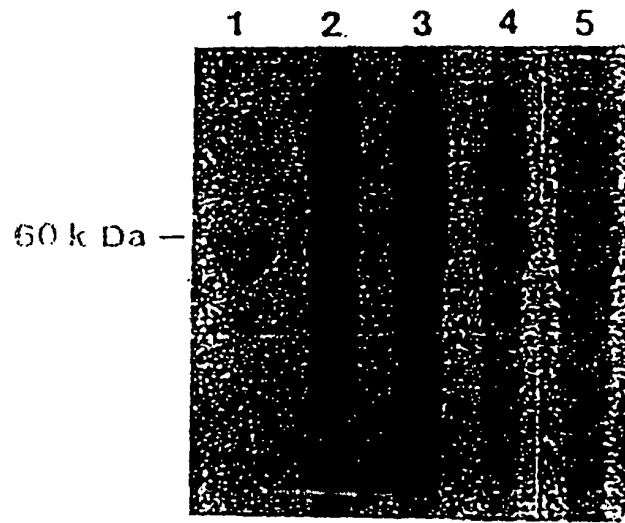


FIG. 18

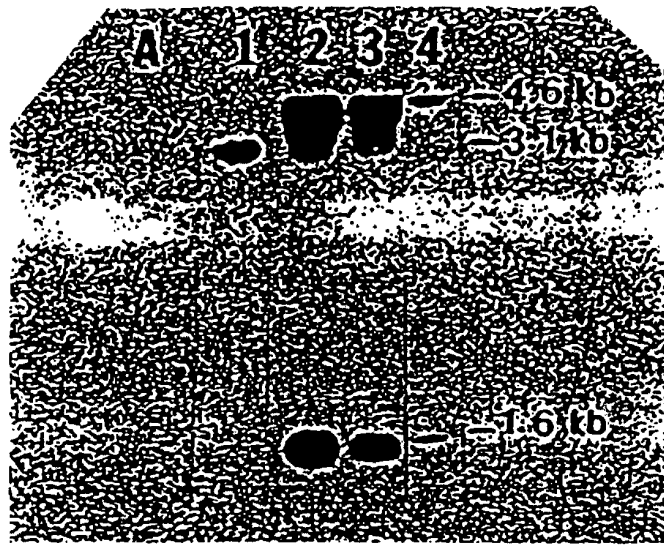


FIG. 19A

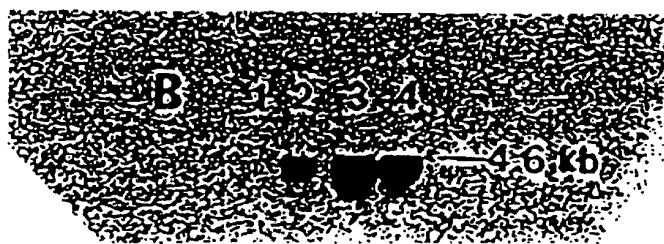


FIG. 19B

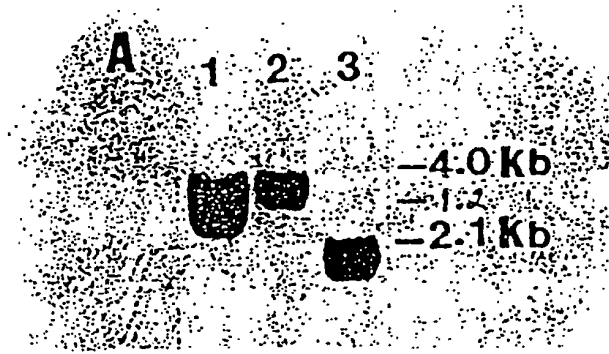


FIG. 20A

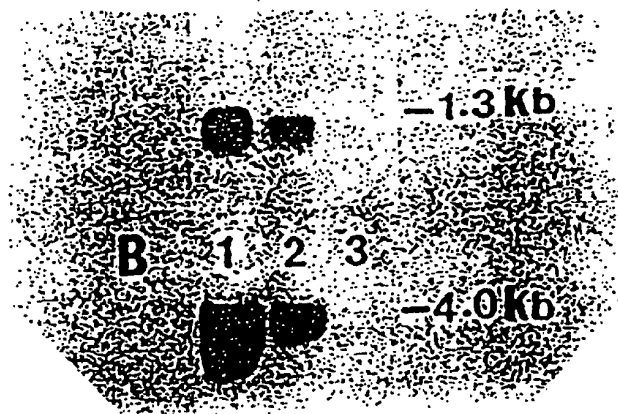


FIG. 20B

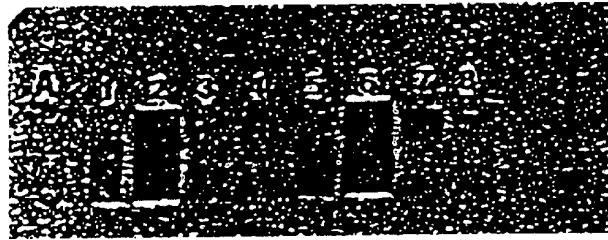


FIG. 21A

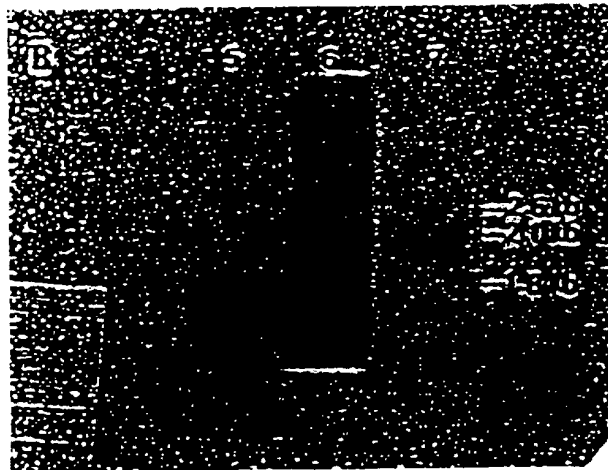


FIG. 21B

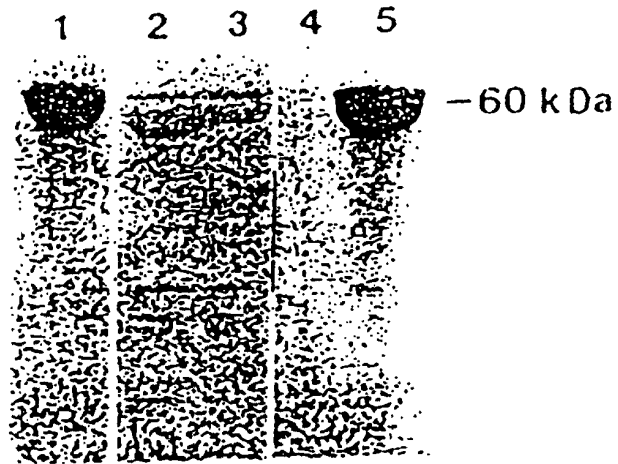


FIG. 22

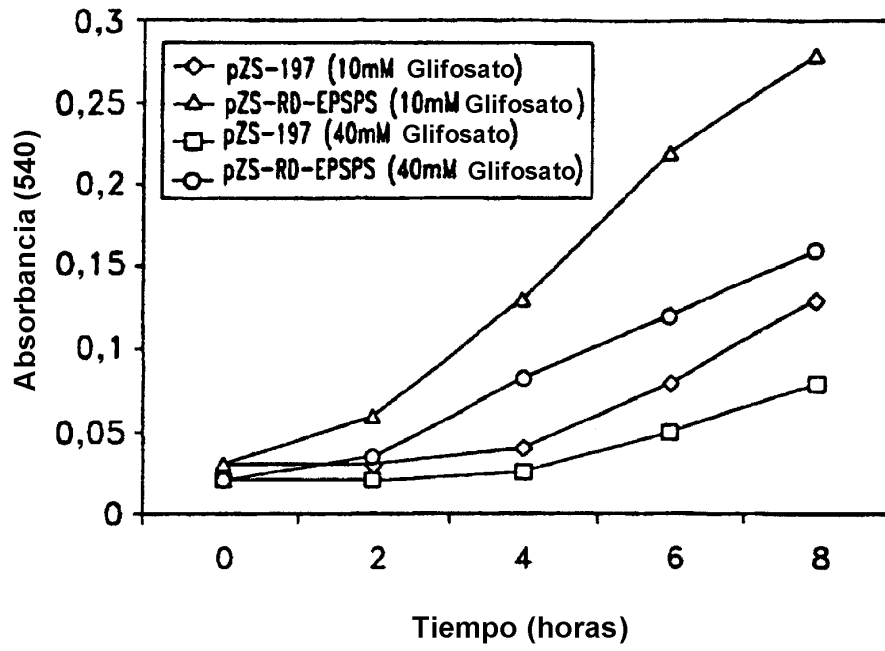


FIG. 23A

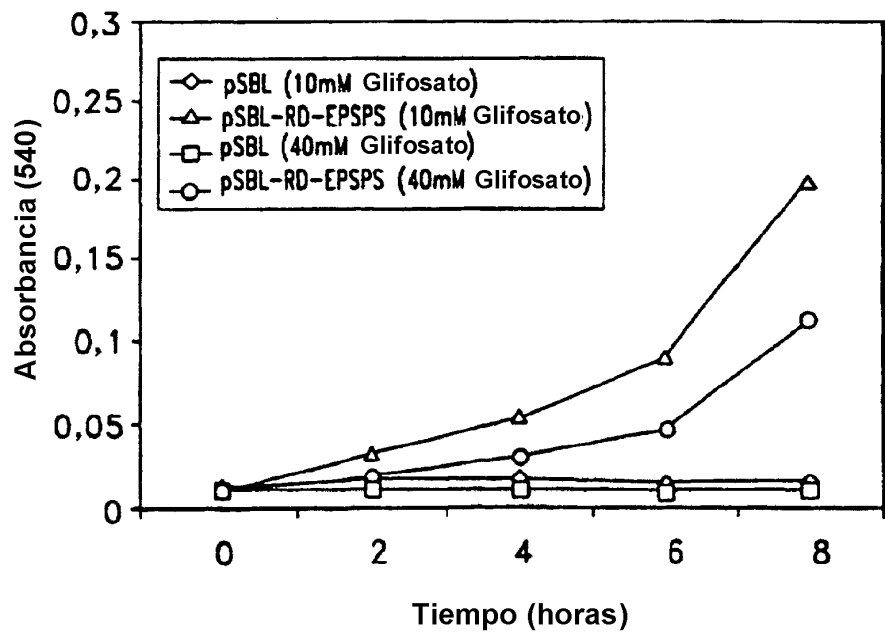


FIG. 23B

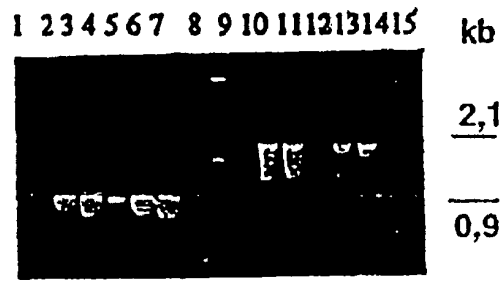


FIG. 24A

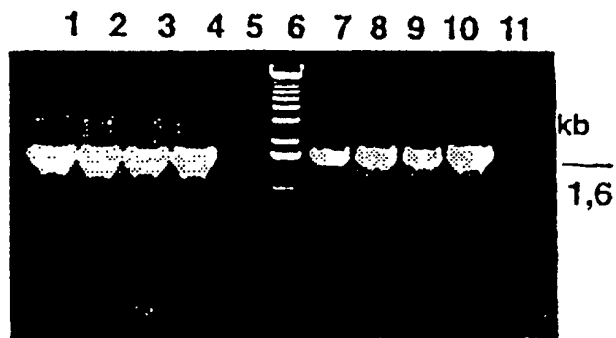


FIG. 24B

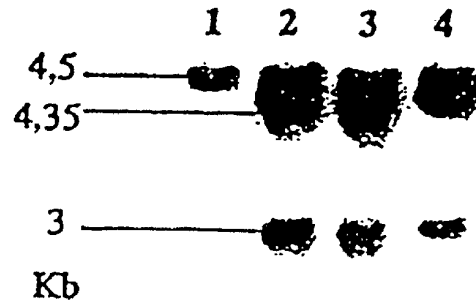


FIG. 25A

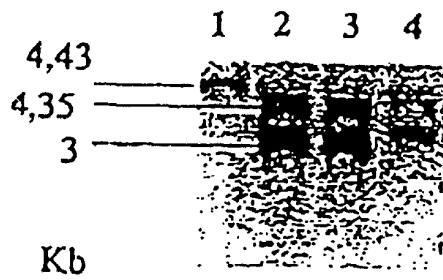


FIG. 25B

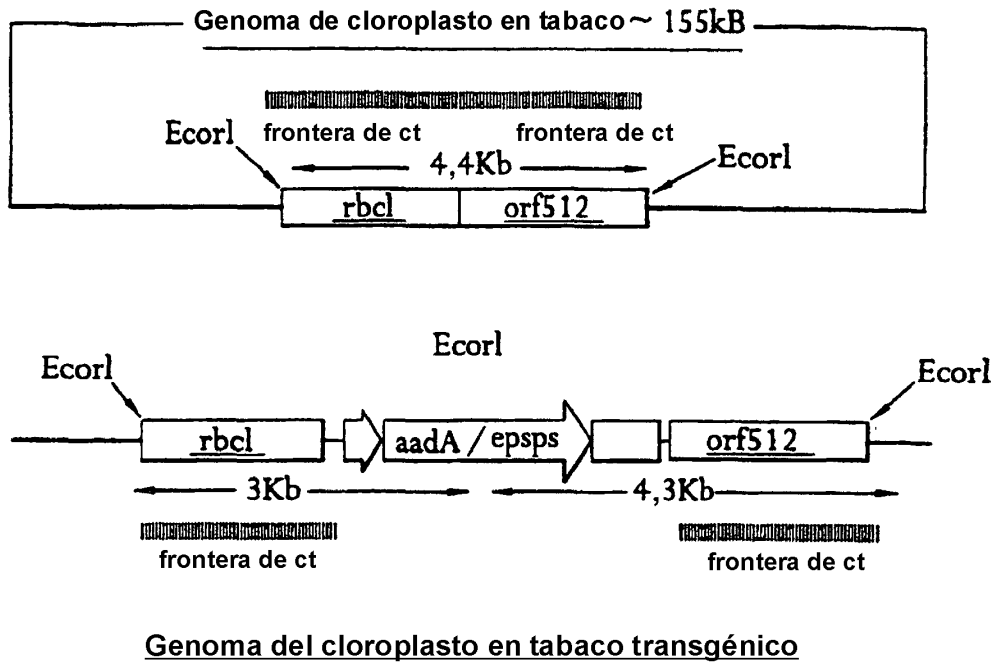


FIG. 25C

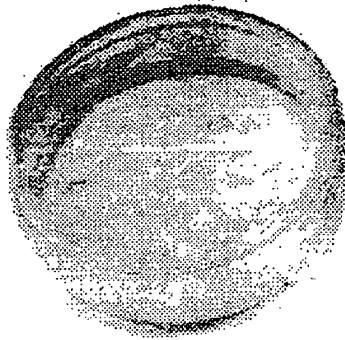


FIG. 26A

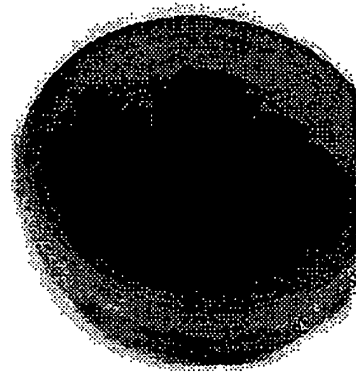


FIG. 26B



FIG. 27A

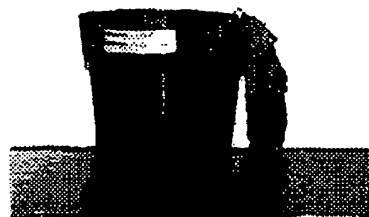


FIG. 27B



FIG. 28A

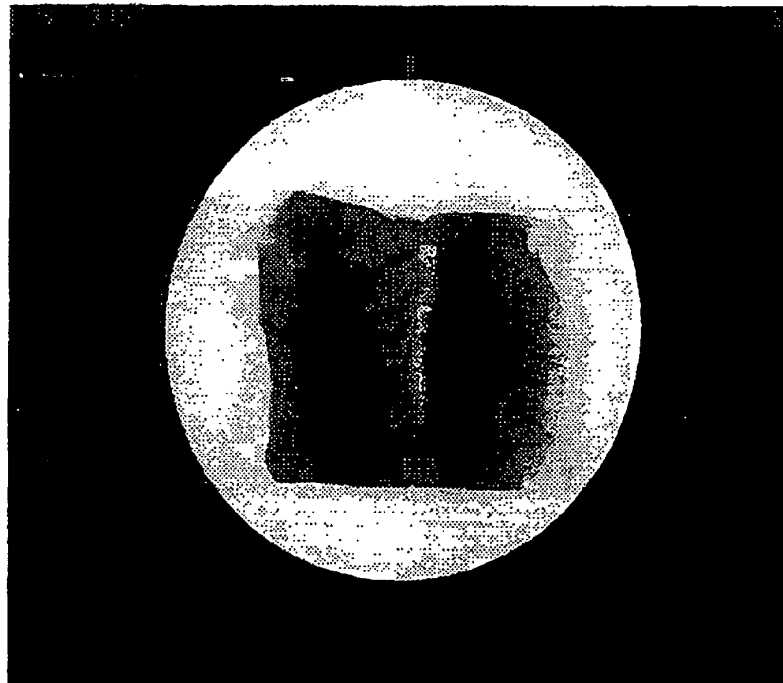


FIG. 28B

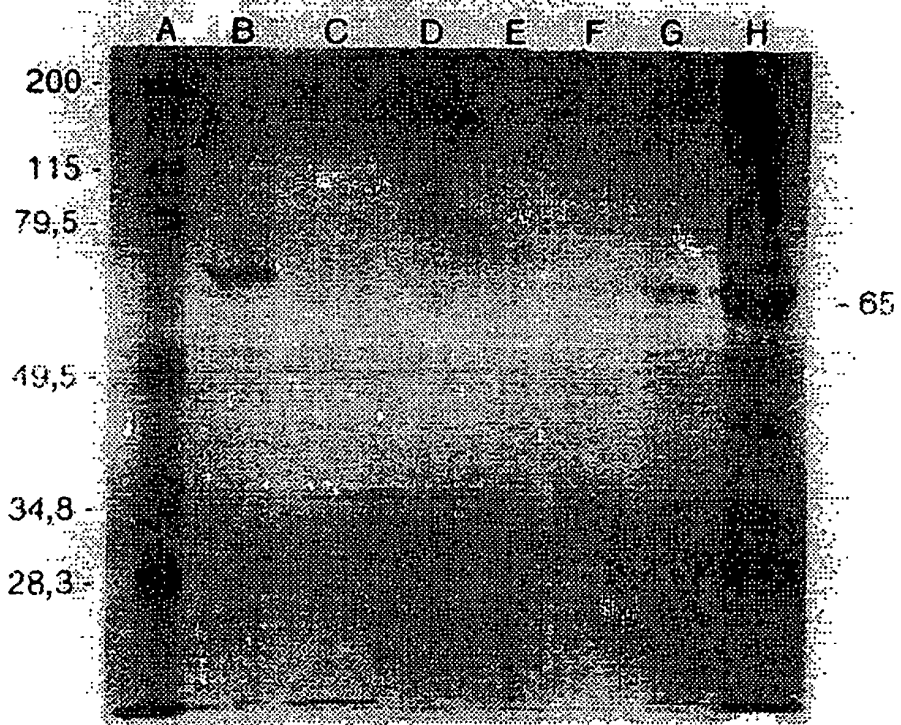


FIG. 29