

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 406 087**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 5/04 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.12.2007 E 07869981 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2013 EP 2118269**

54 Título: **Métodos in vitro para la inducción y el mantenimiento de líneas celulares vegetales como células en suspensión únicas con paredes celulares intactas, y su transformación**

30 Prioridad:

29.12.2006 US 878028 P

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

05.06.2013

73 Titular/es:

**DOW AGROSCIENCES LLC (100.0%)
9330 ZIONSVILLE ROAD
INDIANAPOLIS 46268-1054, US**

72 Inventor/es:

**JAYAKUMAR, PON, SAMUEL;
BERINGER, JEFFREY, R.;
SCHMITZER, PAUL;
BURROUGHS, FRANK;
GARISSON, ROBBI;
AINLEY, WILLIAM, MICHAEL y
SAMBOJU, NARASIMHA, CHARY**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 406 087 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

Métodos *in vitro* para la inducción y el mantenimiento de líneas celulares vegetales como células en suspensión únicas con paredes celulares intactas, y su transformación.

Campo de la invención

La invención pertenece en parte al ámbito de la propagación de líneas celulares vegetales, incluyendo los métodos para la propagación de células vegetales en suspensiones en forma de células únicas

Antecedentes de la invención

Durante las últimas dos décadas, las técnicas de ingeniería genética vegetal han experimentado grandes avances acompañados de grandes mejoras en el desarrollo de los procesos de cultivo de células vegetales a gran escala para la producción de metabolitos secundarios útiles. Desde 1995 (Moffat, 1995; Ma et al., 2003), estos cultivos de células vegetales en suspensión se han utilizado de manera creciente como valiosos sistemas de células hospedadoras para la expresión de proteínas recombinantes.

Las suspensiones o los callos inducidos por auxinas, pese a tener su origen en un único tejido, suelen contener células con diversos fenotipos. Por ese motivo, las líneas transgénicas elaboradas a partir de tales tipos de células acostumbran a ser muy heterogéneas y a presentar niveles de expresión irregulares. Ello ha hecho necesaria la obtención de clones productores de multitud de metabolitos secundarios útiles a partir de un único protoplasto, como por ejemplo un clon celular productor de shikonina en grandes cantidades, preparado a partir de protoplastos de *Lithospermum erythrorhizon* (Maeda et al., 1983).

Hasta ahora era preciso formar protoplastos para disgregar las células, no sólo con el fin de seleccionarlas sino también para posibilitar la transformación por electroporación/PEG de las células vegetales cultivadas. La preparación de los protoplastos ha sido necesaria para el aislamiento de clones celulares individuales a partir de tejidos vegetales. Sin embargo, en general resulta difícil que los protoplastos regeneren sus paredes con normalidad, puesto que los protoplastos aislados suelen permanecer en latencia y no son proclives a dividirse (Hahne and Hoffmann, 1984). En muchos estudios efectuados con protoplastos cultivados, el primer y más importante polisacárido generado es la callosa, compuesto de 1,3-, 8-glucopiranosas (Klein et al., 1981).

Las plantas dañadas o estresadas segregan a menudo grandes cantidades de dicho glucano a los espacios periplásmicos (Currier, 1957). Durante las primeras etapas de la regeneración de la pared, la unión entre la celulosa y el xiloglucano no es tan fuerte como en las plantas intactas (Hayashi et al., 1986). Dado que la organización macromolecular del xiloglucano y de la celulosa en las paredes celulares primarias parece ser la responsable de la resistencia y la extensibilidad (Hayashi and Maclachlan, 1984), la acumulación de xiloglucano y celulosa alrededor de los protoplastos parece ser esencial para su división y potencial de crecimiento. Este prerrequisito frena la división del protoplasto, dilatando el tiempo que éste necesita para regenerarse en una célula normal, dotada de las características celulares de las líneas parentales.

Por lo tanto, uno de los desafíos técnicos en el campo de los cultivos de células vegetales estriba en aislar células viables únicas, susceptibles de ser clonadas a partir de tejidos vegetales cultivados (Bourgin, 1983; Tabata et al., 1976). Los cultivos en suspensión siempre generan agregados heterogéneos de células, constituidos por hasta varios centenares de células. Nada se sabe sobre lo que mantiene unidas a las células agregadas y no existen publicaciones que señalen una única enzima que pueda disociar los agregados y mantenerlos en forma de células únicas con la pared celular intacta en condiciones *in vitro*.

Diversos artículos apuntan a la pectina como parte implicada en las propiedades adhesivas de la célula, pero dicho vínculo se ha propuesto en tiempos relativamente recientes (Bouton et al., 2002). Además, se han descrito fuertes reducciones de las propiedades adhesivas celulares (Sterling et al., 2006).

Los mutantes *qual-1* presentan células radiculares desprendidas y únicas (Bouton et al., 2002). El menor contenido de pectina ha sido corroborado por experimentos de inmunofluorescencia con anticuerpos dirigidos contra epítopos específicos de la pectina. Tales observaciones apuntan a que la enzima codificada puede estar implicada en la síntesis de polisacáridos pécticos e indica claramente que la pectina desempeña un cometido en las propiedades adhesivas de las células vegetales.

Así pues, la alteración de la síntesis de pectina con el fin de eliminar las propiedades adhesivas celulares puede facilitar la separación de las células. En cultivos en suspensión de *Taxus* se ha descrito el aislamiento de células únicas tras un solo tratamiento a base de enzimas degradadoras de pectina aplicado con ese propósito (Naill, 2005). Tales células únicas de *Taxus* fueron seleccionadas para obtener líneas clonales de élite productoras de niveles elevados de taxol. Sin embargo, dicho método no resulta útil para el mantenimiento de células únicas en suspensión con la presencia continua de enzima en el medio. Por su parte, el rendimiento máximo de células únicas obtenido con un tratamiento a base de breves pulsos de enzimas o combinaciones de enzimas fue sólo del 17,1% al 34,4%

(Naill, 2005). El tratamiento continuo de suspensiones de arroz con pectinasa sólo ha dado como fruto pequeños agregados en suspensión a concentraciones del 0,005%, sin que la suspensión pudiera mantenerse en forma de células únicas (Lee et al., 2004). Los tratamientos prolongados con la combinación de enzimas formada por pectinasa y celulasa durante más de 8 horas han acabado provocando la lisis de las células (Naill, 2005).

En cambio, se ha descrito que la separación de las células en cultivos en suspensión de soja mejora con la presencia de colquicina (Umetsu et al., 1975). Para la separación de células, este alcaloide se añade al medio de cultivo en concentraciones más bajas (0,1-1,0 mM) que las empleadas (5-20 mM) para la inducción de la poliploidía cromosómica. Sin embargo, la colquicina inhibe la mitosis tanto en las células vegetales como animales (Lewin, 1980), dado que se une a la tubulina e impide el ensamblaje de los microtúbulos. De ahí que para conseguir la separación de las células, la concentración de colquicina y el tiempo de tratamiento deban ser lo más bajos y breves posible.

Los alcaloides derivados de la colquicina han sido utilizados para la sincronización del crecimiento en cultivos de células animales, finalidad para la que normalmente se añaden en una concentración de 0,5 mM, resultando las células detenidas en pocas horas, antes de la mitosis. Aunque el efecto morfogénico es bastante similar al de las células animales, las células vegetales pueden seguir dividiéndose en presencia de colquicina 0,1 mM (Umetsu et al., 1975). La viabilidad de células de soja disminuyó después de 4 días de cultivo en suspensión con colquicina 1 mM. Además, sólo el 44,8% de las células resultaron viables con tales tratamientos, pero a diferencia de lo que sucede con las células animales, pudieron mantenerse en división.

Se ha investigado la utilización de inhibidores de la despolimerización de tubulina y de las oligosacarinas para el mantenimiento de suspensiones de células únicas en cultivos vegetales *in vitro*. La bibliografía ofrece cierta información que se remonta hasta 1975 referente a la utilización de colquicinas para la separación de células; véase el apartado de Referencias bibliográficas. También se ha investigado la utilización de los inhibidores de la tubulina como herbicidas.

La producción y la recuperación de eventos transgénicos de élite dependen en gran medida del desarrollo de tecnologías factibles. Los métodos actuales para la transformación de agregados de células en suspensión se basan en *Agrobacterium* y fibras. El método basado en *Agrobacterium* presenta una tasa de integración de fragmentos superfluos del vector de hasta el 67-90%, lo que lo convierte en un proceso muy ineficiente, mientras que la transformación con WHISKERS™ no sirve como proceso de alto rendimiento (HTP). El método basado en el uso del PEG se utiliza siempre con protoplastos, pero aunque en el caso de los protoplastos de tabaco se ha demostrado su fácil transformación, no resulta fácil convertirlo en un proceso de transformación de alto rendimiento por los problemas de regeneración de la pared celular.

La técnica parece no pronunciarse en lo referente a protocolos destinados a la transformación de células únicas cultivadas en suspensión. Existen varios informes sobre protocolos con protoplastos, pero a diferencia de las suspensiones de células vegetales única éstos carecen de pared celular, tal y como se expone a continuación.

Breve resumen

La presente invención proporciona métodos sencillos y sistemáticos para romper agregados de células en suspensión y convertirlos en células únicas con sus paredes celulares primarias intactas. La siguiente descripción analiza la separación celular de agregados de células en suspensión inmersos en un medio con enzimas degradadoras de la pectina o compuestos despolimerizantes de la tubulina tales como la colquicina.

La presente invención también se refiere a nuevas utilidades de compuestos con tales fines.

Un aspecto de la presente invención se refiere a la transformación del objeto de interés, esto es, las células únicas. Tales procesos simplifican e integran los procesos de transformación y selección de las células únicas, convirtiéndolos en procesos operativos para la creación de eventos transgénicos y transplastómicos. La presente invención también solventa obstáculos técnicos y genera líneas transgénicas exentas de marcadores que presentan una expresión uniforme con altos rendimientos, útiles para satisfacer diversas necesidades en los ámbitos de la salud animal, la biofarmacéutica y la mejora y protección de cultivos.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Aislamiento de células únicas con la pared celular intacta a partir de células JTNT1 en suspensión sometidas a tratamientos continuos con pectoliasa y subcultivadas en el medio durante 7 días.

A – Suspensión BY2 normal, B – Igual que A, pero con células teñidas con I2KI para mostrar la agregación de células; C y D – Células separadas después de 6 días de tratamiento enzimático continuo; E y F – células únicas separadas con y sin tinción con I2KI. Véase la división celular normal en la FIG. 1, panel F.

Figura 2: Viabilidad de células BY2 tras 6 días de tratamiento continuo con pectoliasa (células tratadas con DAF y YP) y el rendimiento de células únicas.

A: Agregados de células BY2; **B:** BY2 en inóculo de 1 ml con pectoliasa en el medio durante 5 días; **C:** inóculo de 6 ml con enzima en el medio, día 5; **D, E y F:** fotografías de campos microscópicos de C; **G:** agrupaciones control formadas por la variante celular BY2 cultivada con BAP y sacarosa al 12%; **H e I:** células únicas resultantes de 5 días de tratamiento enzimático continuo de G. Células teñidas con DAF e YP. Se observan las células muertas teñidas de rojo por el YP.

Figura 3: Inducción de células únicas en suspensión a partir de agregados en suspensión de células de tabaco BY2 y Xanthi mediante 7 días de tratamiento con colquicina.

A: agregado en suspensión de BY2 normal (tinción con calcoflúor); **B:** Suspensión de células BY2 única en colquicina 1 mM durante 7 días; **C:** Igual que en B, pero aumentado para mostrar células únicas con las paredes intactas; **D:** agregados en suspensión de Xanthi; **E:** agregados en suspensión de Xanthi tratados durante 7 días con colquicina 0,5 mM. Véase la liberación parcial de células únicas con 0,5 mM; y **F:** células separadas de Xanthi en colquicina 1 mM.

Figura 4: Liberación de células únicas con la pared celular intacta tras someter a tratamientos con colquicina diversos agregados en suspensión de tabaco BY2 y Xanthi.

A: agregados en suspensión de BY2 normales **B:** suspensión de células BY2 única obtenidas con colquicina 1 mM durante 7 días; **C y D:** reversión de las células a agregados tras la retirada de la colquicina (4 días después del subcultivo con 1 ciclo de cultivo de tratamiento con colquicina); **E:** agregados en suspensión de Xanthi; **F:** agregados en suspensión de Xanthi tratados durante 7 días con colquicina 1 mM. Se aprecian las células únicas liberadas de los cultivos de BY2 y de Xanthi y la presencia de la pared celular intacta que revela el blanqueador óptico calcoflúor (todas las muestras fueron tratadas con calcoflúor al 0,1% y examinadas con un microscopio de fluorescencia Leica).

Figura 5: Liberación de células únicas viables con paredes celulares intactas mediante tratamientos con colquicina a partir de agregados en suspensión de tabaco de la variedad BY2 (habitadas en medio EP con sacarosa al 12%) y de estramonio.

A: agregados en suspensión de BY2-V normales **B:** visión a más aumentos de los agregados no tratados; **C, D y E:** inducción de la suspensión de células únicas BY2 con colquicina 1 mM durante 7 días (células a 10×, 20× y 40× aumentos); **F:** inducción de células únicas en una suspensión de estramonio con el tratamiento con colquicina 1 mM durante 7 días. Todas las muestras fueron tratadas con DAF e YP y examinadas con un microscopio de fluorescencia Leica. Véase la alta viabilidad de las células que revela la tinción con DAF y el escasísimo número de células teñidas de rojo por el YP.

Figura 6: Efectos sobre el crecimiento de células de tabaco NT1 del DAS-PMTI-1, un derivado del metilindol patentado por Dow AgroSciences (DAS) y un potente herbicida inhibidor de los microtúbulos. Las células se cultivaron con y sin DAS-PMTI-1 25 o 50 nM en medio NT1B con glicerol al 3% como única fuente de carbono. Todos los valores de peso fresco representan las medias \pm 0,18 de muestras duplicadas.

Figura 7: Producción de células únicas y de colonias a partir de líneas en suspensión DAS GAD1762-034.

Figuras 8A, 8B y 8C: Colonias de 2-6 semanas crecidas a partir de células únicas DAS GAD1762-034.

Figura 9: Muestras recogidas a los 7 y 13 días durante más de 4 ciclos de subcultivo y sometidas a análisis de expresión. Los datos de expresión se representan gráficamente.

Figura 10: células únicas BY2 obtenidas con DAS-PMTI-1. Se usó una concentración de 20-50 nM para producir células únicas al cabo de 5 días de subcultivo. Se aprecia que las células son únicas (la pareja tiene los márgenes solapados); la fotografía se tomó con un microscopio de contraste de interferencia diferencial acoplado a un sistema de imagen confocal.

Figura 11: Expresión de YFP (plásmido Ubi10-YFP) después de 72 h de tratamiento con PEG. Una de las pequeñas células hijas (en división) situada en el plano de enfoque muestra expresión de GFP, lo que indica que la expresión puede ser estable.

Figura 12: Izquierda: tejido control sin tratar inhibido por la kanamicina 100 mg/l. Derecha: supuesto aislado transplastómico derivado de célula única creciendo en el medio selectivo.

Figura 13: Producción de líneas clonales a partir de suspensiones de células únicas de zanahoria. Crecimiento en tapiz en medio M sembrado con agregados de suspensión sin tratar (panel A). Crecimiento de colonias discretas en el medio sembrado con las células únicas (panel B).

Figura 14: Tratamiento con colquicina 0,5-1 mM en medio líquido y cultivos analizados 14 días después del inicio del subcultivo (final del segundo ciclo de subcultivo). **A:** células únicas desprendidas de los aglomerados; **B:**

Agregado muy compacto de células coloreado con la tinción vital DAF; **C** y **D**: células únicas teñidas con DAF desprendidas tras el tratamiento con 1 y 0,5 mM respectivamente, después de filtrar la suspensión (filtros con poros de 100 µm de diámetro); **E** y **F**: Imagen a más aumentos de las células únicas de D.

5 **Figura 15:** Curva de crecimiento de células JTNT1 únicas en respuesta a MTI.

Descripción detallada

10 La capacidad para aislar y cultivar células únicas tiene numerosas aplicaciones potenciales. Por ejemplo, los métodos presentados en la presente memoria son útiles para mejorar procesos relacionados con la productividad de cultivos de células vegetales destinados a aplicaciones en salud animal.

15 Así pues, los métodos de la presente invención son útiles para mejorar la eficiencia de procesos relacionados con productos de salud animal y biofarmacia fabricados a partir de células vegetales. Las formas de realización de la presente invención pueden ser de ayuda tanto en la selección de clones de élite de líneas celulares transgénicas, como en la iniciación de cultivos celulares en minisuspensión con el fin de minimizar la variación entre lotes, o desarrollar un Protocolo normalizado de trabajo (PNT) para sistemas de transformación basados en células únicas con el fin de minimizar o eliminar las células no transgénicas de los agregados celulares. En resumen, aspectos de esta invención resultan útiles en la selección de alto rendimiento HTP (proceso de alto rendimiento) en salud animal y en programas de mejora de líneas de células hospedadoras.

20 La presente invención también ejemplifica y posibilita nuevos desarrollos de ensayos basados en células únicas y procesos de clasificación de células para identificar células con expresión estable a partir de la expresión de ARN combinada con sondas fluorescentes celulares con atenuación.

25 Estas células únicas también son útiles para la selección transitoria por recombinación homóloga dirigida, como sustituta del actual sistema transitorio basado en protoplastos. Por ejemplo, las suspensiones de maíz dulce mexicano negro (BMS) y de colza, pueden proporcionar sistemas de células únicas para tales aplicaciones. Así pues, la recombinación homóloga dirigida, por ejemplo, puede ser utilizada en formas de realización de la presente invención. Este tipo de tecnología es el objeto de, por ejemplo, el documento WO 03/080809 A2 y la correspondiente solicitud estadounidense publicada (US 20030232410), referente a la utilización de dedos de cinc para la recombinación dirigida. La utilización de recombinasas (cre-lox y flp-*frt*, por ejemplo) también es conocido en la técnica.

35 Los sistemas de expresión vegetal *in vitro* pueden ser utilizados para producir proteínas recombinantes útiles en farmacia y salud animal. Una ventaja clave de estos sistemas de expresión vegetal es que son de naturaleza eucariota – poseen un sistema de endomembranas y de vías secretoras similar a las de las células de mamífero. Ello hace que, en general, las proteínas complejas se plieguen y ensamblen de forma eficiente, con las modificaciones postraduccionales apropiadas.

40 Otra ventaja de los sistemas de producción vegetal son las posibilidades de ampliación. Es posible obtener cantidades prácticamente ilimitadas de proteínas recombinantes en tejido verde contenido o aumentar la escala de producción hasta niveles industriales utilizando sistemas de fermentación o biorreactores después de seleccionar clones de élite y aumentar tales líneas celulares de expresión homogénea.

45 En la presente memoria se ejemplifican dos estrategias para la producción de células únicas. Ambas consiguieron separar con éxito células viables únicas. No obstante, al menos en dos tipos de células en suspensión se prefiere el método de la colquicina frente al método de degradación enzimática para obtener un gran volumen de suspensión de células únicas con la pared celular intacta. El método enzimático no sólo generó una inhibición del crecimiento celular, sino un mayor grado de mortalidad. Además, la siembra de las células viables en un medio de gel sin eliminar o lavar previamente el medio utilizado ocasionó su muerte, y no se observó ningún crecimiento de colonias. Así pues, la utilización de tales suspensiones de células únicas producidas mediante el método de degradación enzimática es factible, pero necesita ser optimizado.

55 Por su parte, la adición de inhibidores de la tubulina como la colquicina analizada en este estudio parece resultar muy útil para separar células vegetales y seleccionar células únicas. Este método es sencillo puesto que solo implica la adición del volumen apropiado de colquicina al medio líquido durante la fase de subcultivo. Esta será una herramienta fundamental de gran significación para una suspensión dada en procesos como la iniciación de cultivos en minisuspensión con un inóculo uniforme de células altamente viables como células iniciadoras. La técnica puede aumentar la eficiencia de la transformación por electroporación, Whiskers™ o *Agrobacterium*. Tal preparación de células únicas también puede ser utilizada para aislar clones de élite de líneas productoras de proteína recombinante a partir de agregados transgénicos en suspensión.

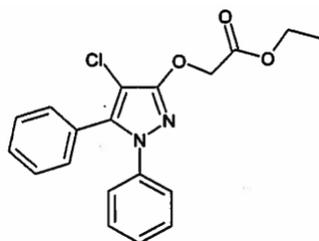
65 Pese a que el método de los protoplastos ha sido utilizado para el aislamiento de células únicas, el método de la colquicina presentado en la presente memoria es más fácil y más eficiente. Las células únicas obtenidas con el método de la colquicina son más estables que los protoplastos gracias a la presencia de las paredes celulares, y no

requiere la regeneración de las mismas. Las células presentan paredes con una red de xiloglucano/celulosa de composición normal (Hayashi and Maclachlan, 1984). No producen calosa durante la expansión celular y la separación, tal y como se aprecia en las observaciones en que células de plántulas de pino, elongadas en presencia de colquicina, no mostraron un engrosamiento anormal de la pared sino un agrandamiento radial (Itoh, 1976). El crecimiento de las células es normal después del subcultivo en un medio sin colquicina, mientras que la mayoría de protoplastos se detienen y tienden a no dividirse. Las células cultivadas con colquicina pueden presentar cierto grado de poliploidía, pero las concentraciones de colquicina utilizadas (0,1-1,0 mM) en este estudio fueron del orden de 10 a 100 veces inferiores a las necesarias (5-20 mM) para inducir la poliploidía. La recuperación de células únicas ha resultado mucho mejor con el método de la colquicina que con los protoplastos. Las células de interés pueden ser analizadas con citometría de flujo para evaluar el nivel de poliploidía y la estabilidad del genoma. Además, los niveles elevados de ploidía pueden suponer una ventaja adicional, al potenciar el nivel de proteína recombinante gracias al mayor número de copias en las células transformadas.

La actividad del galacturonano ha demostrado cumplir funciones biológicas de separación celular en células de soja en suspensión y están descritas como oligosacarinas, porque mostró funciones biológicas en la separación de células (Albersheim and Darvill, 1985). Por consiguiente, el ácido galacturónico también es analizado en estas células en suspensión para lograr la separación de células sin ningún cambio en la ploidía, por si hubiera algún cambio en la ploidía inducido por la colquicina en las suspensiones de células únicas descritas en la presente memoria. Por lo tanto, el uso directo del galacturonano y de otras oligosacarinas similares ha sido evaluado para comparar la eficiencia en la separación de células mediante la alteración de las propiedades adhesivas celulares. La presente invención proporciona métodos sencillos que son reproducibles y homogéneos durante varios pases de células en suspensión, sin que por ello pierdan la estabilidad genómica.

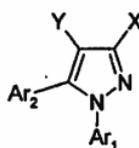
Un compuesto preferido ejemplificado en la presente memoria es el DAS-PMTI-1. Este compuesto parece ser muy potente (~100-1000 veces más que la colquicina sobre el crecimiento de los cultivos). Después de 7 días de tratamiento se producía una considerable muerte celular a una concentración de 0,5 mM, pero cuando estos cultivos se subcultivaron sin DAS-PMTI-1, células PH en suspensión se recuperaron en forma de células únicas con una baja frecuencia al cabo de 2 semanas. Se podría proseguir con la optimización para determinar las mejores concentraciones de este compuesto para cada aplicación (tipo de célula y similares) destinada a la separación de células únicas. Otros inhibidores MTI con funciones similares pueden ser utilizados para las separaciones de células de interés mediante la alteración de la síntesis de pectina. A partir de la presente descripción, se pueden analizar y seleccionar otros inhibidores MTI y análogos de los mismos para determinar su eficiencia al producir y mantener células únicas.

La estructura química del DAS-PMTI-1, también conocido como etiléster del ácido 4-cloro-1,5-difenil-1H-pirazol-3-iloxi)-acético, es la siguiente:



Un género preferido de compuestos para la utilización según la presente invención son los compuestos de tipo DAS-PMTI-1. Tales compuestos pueden ajustarse a la estructura general presentada anteriormente e incluir derivados funcionales (para la utilización según la presente invención) y análogos de los mismos.

A continuación se muestra una fórmula química genérica de algunos inhibidores de microtubulina conocidos para la utilización la presente invención. Si bien el DAS-PMTI-1 es una forma de realización preferida, en otras formas de realización preferidas se utilizan uno o varios miembros del siguiente género de diarilpirazol conjuntamente con colquicina:



en la cual

- X = CO₂R, CH₂CO₂R, CH₂CH₂CO₂R, (CH₂)₃CO₂R, OCH₂CO₂R, OCH(CH₃)CO₂R, OC(CH₃)₂CO₂R, CH₂OCH₂CO₂R, CH₂CH(CO₂CH₂CH₃)CO₂R, OCH(CO₂CH₂CH₃)CO₂R
- Y = CN, Cl, Br, F, NO₂
- Ar1 = fenilo no sustituido, piridina no sustituida, 1-3 fenilo sustituido, 1-3 piridina sustituida, sustituido con halógeno o CN
- Ar2 = fenilo no sustituido, piridina no sustituida, 1-3 fenilo sustituido, 1-3 piridina sustituida, sustituido con halógeno o CN
- R = H o éster lineal o ramificado con 1-5 carbonos

10 Así pues, con inhibidores de microtúbulos se han conseguido producir cultivos en suspensión de células vegetales, que pueden mantenerse en cultivo durante al menos 2 ciclos de subcultivo. Estas suspensiones de células únicas son únicas en el sentido de que poseen la pared celular intacta, pese a lo cual viven separadas entre sí.

15 Una planta, célula vegetal o similar "transgénica" es (a menos que se especifique de otra manera) una planta entera, célula vegetal, cultivo de células vegetales, línea de células vegetales, cultivo de tejido vegetal, planta inferior, cultivo de células de plantas monocotiledóneas, cultivo de células de plantas dicotiledóneas, o progenie de las mismas derivada de una célula vegetal transformada (o protoplasto o similar) que contiene ADN exógeno introducido mediante técnicas de laboratorio y que no estaba originalmente presente en una célula vegetal no transgénica nativa de la misma especie. Los términos "planta transgénica" y "planta transformada" son utilizados a veces en la técnica como términos sinónimos para definir una planta cuyo ADN contiene una molécula exógena de ADN. Una planta transgénica puede ser transformada de forma estable para contener ADN exógeno que funcione dentro y que se incorpore en el ADN genómico de la planta o es una planta transgénica que ha sido transformada mediante vectores virales y que expresa de forma transitoria el ADN exógeno.

25 "Aislado" y "purificado" implican la "mano del hombre" y pueden aplicarse a los polinucleótidos y las proteínas. Un polinucleótido clonado es un polinucleótido aislado, por ejemplo.

30 *Métodos de transformación.* Las células únicas han sido analizadas para averiguar si la transformación nuclear y plasmídica es factible, empleando *Agrobacterium* y el polietilenglicol (PEG) como técnicas de transformación nuclear y el bombardeo biolístico para la transformación plasmídica. En las tentativas de transformación nuclear, se ha demostrado la introducción del ADN plasmídico y la expresión transitoria de la proteína fluorescente amarilla. La recuperación de células sometidas a transformación plasmídica y su análisis con PCR han permitido demostrar su transformación estable. Los aislados de callos transplastómicos se agruparon y están siendo analizados para detectar el marcador seleccionable, la expresión del gen nptII mediante ELISA.

35 La metodología de transformación descrita en la presente memoria se puede aplicar a procesos de salud animal. No obstante, la transformación de células únicas mediante métodos novedosos como las nanopartículas también puede proporcionar abordajes únicos para transformar plantas agrícolas, combinados con la multitud de tipos celulares disponibles para la producción de proteínas recombinantes.

40 El desarrollo de la transformación de células únicas de interés mediante los métodos del PEG y/o la electroporación convierte a las células únicas con pared intacta en algo tan flexible como los sistemas de células bacterianas/de mamífero, resultando también útiles en los sistemas de transformación de alto rendimiento para tales tipos celulares.

45 La capacidad de transformar células únicas tiene numerosas aplicaciones potenciales. Por ejemplo, los métodos presentados en la presente memoria resultan útiles para mejorar procesos relacionados con la productividad de los cultivos de células vegetales destinados a aplicaciones en salud animal. De nuevo, los procesos de la presente invención son útiles para mejorar la eficiencia de procesos relacionados con productos de salud animal y biofarmacia fabricados a partir de células vegetales. Los procesos de interés también pueden ser de ayuda en la selección de clones de élite de líneas celulares transgénicas. Tales aplicaciones pueden ser utilizadas para la iniciación de cultivos celulares en minisuspensión con el fin de minimizar la variación de la expresión entre lotes, y desarrollar un PNT con el fin de minimizar o eliminar las células no transgénicas o la presencia de múltiples eventos en agregados.

55 Tal y como se expone en el apartado de Antecedentes, los métodos basados en *Agrobacterium* son muy ineficientes, y la transformación con WHISKERS™ no sirve como proceso de alto rendimiento. El método basado en el PEG se utiliza con los protoplastos, y aunque los protoplastos de tabaco son fáciles de transformar, no pueden convertirse fácilmente en un proceso de transformación de alto rendimiento debido a los problemas con la regeneración de la pared celular.

60 En cambio, el método de interés proporciona una célula vegetal con una pared celular intacta. El proceso con PEG es el primer informe de una célula única con su pared celular intacta. Los métodos de interés también son altamente eficientes. Asimismo, este proceso elimina la integración de fragmentos superfluos del vector puesto que utiliza plásmidos purificados de fragmentos para la transfección. Un protocolo de transformación rápida con células vegetales única basado en procesos como la separación de células activadas por fluorescencia (FACS) sería ideal para la miniaturización y la automatización de los procesos destinados a seleccionar eventos adecuados con un coste menor, menos recursos y en un tiempo más breve. Ello podría mejorar drásticamente el actual proceso de

selección de agregados en suspensión o de callos gracias a la selección de las células transformadas por medio de citómetros y a la determinación de los eventos de élite con una expresión homogénea, lo que supondría un avance en su aplicabilidad a escala industrial y en su incorporación en procesos de producción.

5 Así pues, los presentes procesos proporcionan bases fundamentales para la investigación y el desarrollo de nuevos bioprocesos, para la selección HTP en el campo de la salud animal y de las mejoras en las líneas de células hospedadoras, por ejemplo.

10 La presente invención permite el desarrollo de ensayos basados en células únicas y procesos de clasificación de células destinados a identificar las células con expresión estable a partir de la expresión de ARN combinada con sondas fluorescentes celulares con atenuación.

15 Estas células únicas también resultan de utilidad en la selección de la expresión transitoria y/o estable del Gen de Interés (GOI) en plataformas de mejora y protección de cultivos.

A menos que se indique específicamente o resulte implícito, los términos “un/una” y “el/la” significan “al menos uno/una” tal y como se utilizan en la presente memoria.

20 Ejemplo 1 – Materiales y métodos

De la empresa Japan Tobacco se obtuvieron células BY2 en suspensión que se mantuvieron en medio LSBY2 durante un ciclo de 7 días. Por su parte, se iniciaron una suspensión de estramonio y suspensiones de tabaco Petite Havana a partir de callos iniciados en DAS y se adquirieron suspensiones de Xanthi en forma de muestra facilitada por el profesor Jack Widholm, de la UIUC, Il.. Las células JT-NT1 en suspensión, adquiridas de la Washington University y mantenidas en medio NT1B en un ciclo de 7 días, se utilizaron únicamente para el estudio de degradación enzimática de la pectina para separar las células en células individuales. Las células se cultivaron en frascos de agitación a 25-28°C y a oscuras en agitadores orbitales a 150 rpm. La colquicina se adquirió a Fluka, el DAS-PMTI-1 (Martin et. al, 2001; Smith et al., 2001) de DAS CRS, y las enzimas degradadoras de pectina (pectoliasa Y y pectinasa) se adquirieron en Sigma. Las soluciones madre de los dos inhibidores de la polimerización de la tubulina utilizados en esta investigación se disolvieron con DMSO para preparar una solución madre 0,5 M. Las concentraciones utilizadas de las enzimas pectinasa y pectoliasa se situaban entre 0,0005% y 0,005%. Las líneas celulares en suspensión de tabaco NT-1 y BY-2, por ejemplo, son adecuadas para la puesta en práctica de la presente invención. Las células BY-2 pueden adquirirse comercialmente y es posible disponer de ellas siguiendo las indicaciones de Nagata et al, por ejemplo (Nagata, T., Nemoto, Y., and Hasezawa, S. [1992], Tobacco BY-2 cell line as the “HeLa” cell in the cell biology of higher plants. *Int. Rev. Cytol.* 132: 1-30). Las células NT-1 se desarrollaron originalmente a partir de *Nicotiana tabacum* L. cv. bright yellow 2. La línea celular NT-1 se utiliza comúnmente y es muy accesible; pero cualquier línea de células en suspensión de tabaco es válida para la puesta en práctica de la invención. Cabe destacar que los orígenes de la línea celular NT-1 no están claros. Es más, esta línea celular parece ser variable y proclive a cambiar como respuesta a las condiciones de cultivo. Las células NT-1 adecuadas para la utilización que se indican en los ejemplos siguientes están disponibles en la American Type Culture Collection con el número de acceso ATCC Núm. 74840. Véase también la Patente US nº 6.140.075.

45 Ejemplo 2 – Observaciones microscópicas

La expansión y la separación de las células fueron observadas con un microscopio óptico (ópticas de Nomarski y campo oscuro). Las células esféricas y las células únicas se contaron con un hemocitómetro para determinar el grado de expansión y de separación celular, respectivamente. El número de células de los agregados se determinó tratándolos con trióxido de cromo al 5% (p/v) durante 16 horas y recontando las células (Henshaw et. al, 1966). La viabilidad celular se determinó tiñendo las células con diacetato de fluoresceína (DAF) y yoduro de propidio (YP) con un microscopio de fluorescencia (Zeiss Photomicroscope). Con el fin de determinar la presencia de la pared celular en estos cultivos de células únicas se utilizó un blanqueador óptico. El calcoflúor, adquirido a Sigma, es un colorante fluorescente específico para la celulosa utilizado en este estudio, y el complejo formado por el mismo con la celulosa se observó con microscopía de fluorescencia (Zeiss Photomicroscope). El calcoflúor (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) se preparó en forma de solución al 0,1% (p/v) con tampón PBS, conservándose a oscuras y temperatura ambiente. Antes de usarla, la tinción de calcoflúor se centrifugó a 15.000 g durante 2 min para eliminar los precipitados. A las células separadas se les añadieron una o dos gotas de la solución de calcoflúor. Al cabo de 2 ó 3 minutos a temperatura ambiente, la suspensión de células se lavó con agua y se sometió a tinción de contraste con azul de Evans al 0,1% (Sigma; E-2129) en TBS (pH 7,2) durante 1 minuto a temperatura ambiente, y se observó después con un microscopio de luz UV a una longitud de onda de 395 a 415 nm (luz de observación 455 nm). La pared celular apareció en forma de halos ovalados de tonalidad blanquiazulada o turquesa.

60 Ejemplo 3 – Resultados de los tratamientos continuos con pectinasa y pectoliasa en el medio

Se investigó el efecto de enzimas degradadoras de pectina, a saber, pectinasa y pectoliasa, a diferentes concentraciones en suspensiones de tabaco Petite Havana, BY2 y NT1. Las suspensiones de JT-NT1 respondieron mejor a los tratamientos con pectinasa y la suspensión de BY2 respondió mejor a los tratamientos con la enzima

pectoliasa que con la otra enzima. No obstante, se produjo mortalidad celular tal y como revelan las tinciones vitales y la inhibición del crecimiento de los tipos celulares. El aumento hasta en 12 veces del volumen del inóculo de células en el estadio de subcultivo permitió obtener un rendimiento razonable de células únicas. Las células PH y BY2 pudieron cultivarse durante al menos 7 días en presencia de pectoliasa. El cultivo continuo de estas células con bajas concentraciones de la enzima pectoliasa (3 unidades activas) parece tener efectos perjudiciales. Las células en el sexto día de cultivo ofrecieron altos recuentos de células únicas cuando el volumen del inóculo fue de 6 ml (volumen de inóculo iniciador en fase estacionaria) y se cultivaron en 50 ml de medio fresco junto con la enzima. El análisis de estas células con DAF e YP al cabo de 6 días de cultivo reveló un mayor grado de células únicas viables (**Figuras 1 y 2**). El crecimiento del cultivo en suspensión resultó drásticamente afectado por los tratamientos enzimáticos y el subcultivo de las células en el mismo medio con enzima pareció tener un efecto perjudicial. Así pues, es aconsejable que las células sean tratadas como máximo durante 7 días y que después sean transferidas a un medio sin enzima para reanudar el crecimiento. En el mejor de los casos, este método puede ser utilizado para seleccionar clones transgénicos de élite en los agregados heterogéneos o para iniciar cultivos en suspensión de alto rendimiento con un volumen de células uniforme.

Figura 1: Aislamiento de células únicas a partir de células JTNT1 en suspensión con la pared celular intacta a base de tratamientos continuos con pectoliasa y subcultivo en el medio durante 7 días.

A: Suspensión de BY2 normal; **B:** Igual que **A**, pero las células están teñidas con I2KI para mostrar la agregación de células; **C y D:** Células separadas después de 6 días de tratamiento enzimático continuo; **E y F:** células únicas separadas con y sin tinción con I2KI. Obsérvese la división normal de las células (**F**).

Figura 2: Viabilidad de las células BY2 tras 6 días de de tratamiento continuo con pectoliasa (células tratadas con DAF e YP) y el rendimiento de células únicas.

A: Agregados de células BY2; **B:** BY2 en inóculo de 1 ml expuestas a un medio con pectoliasa durante 5 días; **C:** inóculo de 6 ml con enzima en el medio durante 5 días; **D, E y F:** fotografías de campos microscópicos de **C**; **G:** agrupaciones control de la variante celular BY2 cultivada con BAP y sacarosa al 12%; **H e I:** células únicas tras el tratamiento enzimático continuo durante 5 días de **G**. Células teñidas con DAF e YP. Obsérvese las células muertas teñidas de rojo por el YP.

Ejemplo 4 – Efectos de las colquicinas sobre el crecimiento de suspensiones de células BY2, NT1, Petite Havana (PH) y Xanthi (Xan), y estramonio (JM)

Tras 7 días de cultivo, el número de células BY2, Xan y JM respondió a una concentración de 0,5 mM y 1 mM de colquicinas (**Figuras 3, 4 y 5**). No obstante, se observó un alto grado de células únicas en suspensión con 1 mM en las células BY2 y JM. Resulta destacable que el crecimiento de las células JM resultara drásticamente afectado incluso por la concentración de 0,5 mM de colquicina y que el crecimiento no pudiera recuperarse ni siquiera después de permanecer otra semana más en el mismo medio. Ello indica que la división celular de las células JM es inhibida por la colquicina y que es necesario probar con concentraciones inferiores para optimizar la separación de las células sin reducir la densidad o el crecimiento del cultivo. Es interesante que tal inhibición del crecimiento no se observara en las células BY2 en suspensión, las cuales pudieron crecer continuamente durante al menos 14 días en presencia de colquicina 1 mM. Las células BY2 comenzaron a aumentar de tamaño el tercer día y adquirieron forma esférica a medida que proseguía el cultivo en suspensión. Dado que las células esféricas se fueron desprendiendo gradualmente de los agregados, es de suponer que la separación celular es acompañada por la expansión de las células. Al cabo de 7 días, el medio con colquicina 1 mM contenía aproximadamente la misma cantidad de células BY2 que los cultivos de control. Cuando las células se cultivaron durante 7 días con colquicina 1 mM y después se subcultivaron en un medio sin colquicina, no recuperaron completamente la capacidad para crecer en forma de agregados y aproximadamente 90% de las células en suspensión permanecieron como células únicas intactas. En los agregados de células en suspensión de las demás suspensiones celulares expuestas a colquicina 0,5 mM también se produjo una expansión y separación parcial de las células. En las suspensiones de células JT-NT1 y JM se observó inhibición del crecimiento celular. Las células NT1 en suspensión registraron una reducción del crecimiento de casi el 50% con colquicina 1 mM.

En estas células se observaron grandes células separadas similares a las células epidérmicas radiculares separadas descritas en los mutantes de pectina qual-1 (Bouton, 2002). En todos los tipos de suspensiones celulares expuestos al DAS-PMTI-1 se observó una segregación parcial similar de las células, con una forma generalmente esférica. No obstante, en la suspensión tratada con una concentración de DAS-PMTI-1 de 0,5 mM el crecimiento celular resultó afectado de manera muy significativa. Se pueden llevar a cabo nuevos experimentos para optimizar las condiciones de separación celular con dicho compuesto y minimizar la inhibición del crecimiento celular. Tal y como demuestran las pruebas de tinción con DAF e YP, las suspensiones de células BY2 y JM analizadas presentan un alto grado de viabilidad celular. Las células estaban muy redondeadas y muchas lucían una proyección en forma de pico indicativa de la extensión de la pared celular en las células activas, posiblemente antes de la división celular. Las células separadas eran grandes, expandidas y presentaban una forma esférica que es típica de protoplasto. Se usó la tinción con calcofluor para determinar la presencia o ausencia de las paredes celulares intactas. **Figura 4.** Se observa con claridad la presencia de la pared celular alrededor de estas células redondas. La observación de estas

células bajo el condensador de campo oscuro del microscopio revela una gruesa pared celular que circunda la célula (**Figura 3**, panel C). Estas células únicas demostraron su resiliencia en los cultivos en agitación, ya que no se observaron células muertas debido a la ausencia de la pectina y la prueba de tinción vital demostró la presencia de células grandes (**Figura 5**). En este panel se observó un porcentaje muy elevado de células vivas y sanas. Por tanto, es posible utilizar estas células en cultivos en agitación con placas de micropocillos sembrando un número preciso de células en ellos.

Figura 3: Inducción de suspensiones de células únicas mediante tratamientos de 7 días con colquicina en el medio a partir de suspensiones de agregados celulares de tabaco BY2 y Xanthi.

A: Agregado en suspensión de BY2 normal (teñido con calcoflúor); **B:** Suspensión de células BY2 única tratadas con colquicina 1 mM durante 7 días; **C:** Igual que **B**, pero agrandado para mostrar células únicas con las paredes intactas; **D:** Agregados en suspensión de Xanthi; **E:** Agregados en suspensión de Xanthi tratados durante 7 días con colquicina 0,5 mM. Obsérvese la liberación parcial de células únicas con 0,5 mM; y **F:** células de Xanthi única separadas con colquicina 1 mM.

Figura 4: Liberación de células únicas con las paredes celulares intactas a partir de agregados en suspensión de células de tabaco BY2 y Xanthi sometidos a tratamientos con colquicina.

A: Agregados en suspensión de BY2 normales **B:** Suspensión de células BY2 única con colquicina 1 mM durante 7 días; **C y D:** Reversión de las células en agregados tras la retirada de la colquicina (4 días después del subcultivo con 1 ciclo de cultivo de tratamiento con colquicina); **E:** Agregados en suspensión de Xanthi; **F:** Agregados en suspensión de Xanthi tratados durante 7 días con colquicina 1 mM. Obsérvese las células únicas liberadas en los cultivos de BY2 y Xanthi y la presencia de la pared celular intacta como revela el blanqueante óptico calcoflúor. (Todas las muestras fueron tratadas con calcoflúor al 0,1% y se examinaron con un microscopio de fluorescencia Leica).

Figura 5: Liberación de células únicas viables con las paredes celulares intactas a partir de agregados en suspensión de células de tabaco BY2 (habituadas en medio EP con sacarosa al 12%) y estramonio sometidos a tratamientos con colquicina.

A: Agregados en suspensión de BY2-V normales **B:** vista aumentada de los agregados sin tratar; **C, D y E:** Inducción de suspensión de células BY2 única con colquicina 1 mM durante 7 días (células a 10×, 20× y 40× aumentos); **F:** Inducción de células únicas en una suspensión de estramonio con un tratamiento con colquicina 1 mM durante 7 días. Todas las muestras fueron tratadas con DAF e YP y se examinaron con un microscopio de fluorescencia Leica. Obsérvese la elevada viabilidad de las células que revela la tinción con DAF y el escasísimo número de células teñidas de rojo por el YP.

Ejemplo 5 – Producción de células únicas e influencia del DAS-PMTI-1 en medio con glicerol como única fuente de carbono

El ejemplo proporciona otra discusión acerca del medio de crecimiento con glicerol y el efecto de la baja concentración de DAS-PMTI-1, así como de las características del crecimiento. Los resultados son muy significativos, puesto que comentarios previos recogidos en la bibliografía afirmaban que el glicerol mitiga los efectos de la colquicina, consistentes en alterar los microtúbulos de la soja, razón por la que los expertos rechazaran el uso del glicerol en los medios destinados a las aplicaciones de interés. Véase por ejemplo Hayashi and Yoshida, 85 PNAS 2618-22 (1988). Asimismo, los datos sobre el glicerol presentados en la presente memoria son inéditos en las células vegetales, no habiéndose descrito tales resultados con anterioridad. Durante varios meses se han podido cultivar con éxito tres genotipos distintos de tabaco de cultivo rápido utilizando glicerol al 3% como única fuente de carbono.

Este ejemplo también aporta una gráfica con la curva de crecimiento que refleja el comportamiento del cultivo con dos concentraciones distintas de DAS-PMTI-1 en comparación con el tratamiento nulo.

Varias clases de compuestos que alteran los microtúbulos producen células únicas. Tales compuestos incluyen disruptores o inhibidores de los microtúbulos (compuestos que se unen a la α - y la β -tubulina) clasificados como (i) dinitroanilinas (orizalina, trifluaralina, cloralina) y (ii) N-fenilcarbamatos como la benzamida, pronamida, la amida fosfórica, amiprofosmetil (Akashi et al., 1988), así como los fungicidas benzamida zarilamida, (iii) los fármacos contra el cáncer paclitaxel, vincristina y vinblastina, y (iv) otros compuestos que alteran los microtúbulos y/o las propiedades de la pared tales como inhibidores de la síntesis de celulosa y los inhibidores del citoesqueleto como aluminio y cumarina, también se probaron para determinar su capacidad para producir células únicas con una escasa o nula formación de micronúcleos. Los microtúbulos corticales y los microtúbulos mitóticos tienen sensibilidades diferentes y la combinación de compuestos pertenecientes a diferentes clases entre las mencionadas anteriormente o a una de ellas que alteren selectivamente los túbulos de modo que la división celular no resulte afectada pero sí las propiedades adhesivas de la célula en el grado suficiente para alcanzar y mantener las células en el estado de célula única con una escasa o nula inestabilidad genómica.

Se examinaron los efectos de inhibidores de microtúbulos (MTI) sobre el crecimiento de células de tabaco cultivadas en suspensión. El séptimo día células en fase estacionaria (1 ml) se transfirieron a un medio (50 ml) contenido en frascos de agitación de 250 ml que alojaban diferentes concentraciones (25 a 1000 nM) de MTI y fueron cultivadas durante 7 días a oscuras y a 25°C. Tanto los frascos control como los que contenían MTI alojaban DMSO en una concentración final de 0,5-0,1% (v/v). El crecimiento con estas sustancias químicas se evaluó en medio EP12 con células BY2 y en medio NT1B con células BTI-NT1 en los que la fuente de carbono se sustituyó por glicerol al 3%. La respuesta de estas células se comparó con la observada en un medio de igual composición pero con sacarosa al 3% como fuente de carbono. Se usó el medio con glicerol porque es conocido que éste es un estabilizador de los microtúbulos y que las células de tabaco habituadas al glicerol 3% no presentan compuestos fenólicos en condiciones de estrés.

A intervalos de un día se centrifugaron brevemente muestras de células por triplicado (0,5 ml) para sedimentarlas en tubos de microcentrífuga tarados con el fin de determinar el peso fresco. Los resultados presentados en la figura 6 muestran que después de una fase de latencia de 2 días, las células de control crecieron rápidamente durante el día 4 y entraron en fase estacionaria en el día 6. Las células de tabaco cultivadas con DAS-PMTI-1 25 nM mostraron una cinética de crecimiento similar a las del cultivo control. Con todo, los pesos frescos de estos cultivos fueron ligeramente mayores que los de los controles durante la fase estacionaria, lo cual apunta a que el DAS-PMTI-1 50 nM fomenta el crecimiento. Las células cultivadas con DAS-PMTI-1 0,5-1,0 mM exhibieron una inhibición completa y muerte celular en los 3 días posteriores al inicio del cultivo cuando se examinaron células tratadas con DAF y yoduro de propidio bajo el microscopio de fluorescencia. Los datos demuestran que el crecimiento de las células de tabaco resultó inhibido próximo al umbral de 50 nM, pero que las concentraciones superiores a 100 nM inhibieron la mitosis y causaron muerte celular.

A diferencia de la colquicina en la producción de células únicas, donde la concentración de 0,25-0,5 mM es eficaz, el DAS-PMTI-1 resulta muy eficaz a concentraciones sumamente bajas del orden de 5-25 nM, incluso en presencia de glicerol como única fuente de carbono, tanto en células NT1 como BY2. El intervalo de concentración de 25 nM no sólo resulta eficaz para liberar células únicas, sino que también es muy eficiente porque no reduce el ritmo de crecimiento de las células a lo largo de un periodo de 10 días (Figura. 6). De hecho, se observa un ligero aumento de la biomasa en la fase estacionaria del crecimiento debido a la expansión de estas células únicas. No obstante, las observaciones microscópicas no revelaron la presencia de micronúcleos en ellas.

Figura 6: Efectos del DAS-PMTI-1 sobre el crecimiento de células de tabaco NT1. Las células se cultivaron con y sin DAS-PMTI-1 25 ó 50 nM en medio NT1B con glicerol al 3% como única fuente de carbono. Todos los valores de peso fresco representan las medias \pm 0,18 obtenidas de muestras duplicadas.

El estado de células únicas de las células expuestas al DAS-PMTI-1 se analizó con un microscopio confocal, y quedó claramente confirmado puesto que no se hallaron células adheridas.

Ejemplo 6 – Disgregación de líneas transgénicas en suspensión y producción de líneas clonales

Las suspensiones de tabaco suelen contener células en agregados o pequeños grupos que son muy heterogéneos. Las células del cultivo pueden ser genéticamente idénticas (población homogénea) o pueden mostrar cierta variación genética (población heterogénea). Una población homogénea de células descendiente de una única célula progenitora se denomina clon. Por consiguiente, todas las células de una población clonal son genéticamente idénticas y muy homogéneas en términos de las características celulares. Las suspensiones de células de tabaco BY2 y NT1 se utilizan habitualmente como sistemas modelo en numerosos laboratorios.

Estas células son transformadas con facilidad cuando se les extrae la pared celular, bien directamente mediante el bombardeo con partículas, bien por cocultivo con *Agrobacterium tumefaciens*. Pero a pesar de que la transformación de BY-2 con *A. tumefaciens* es una técnica habitual en muchos laboratorios, la eficiencia en la obtención de callos transgénicos varía de un experimento a otro y depende principalmente de la calidad del cultivo de células BY-2. La sincronización es esencial: las células BY-2 en fase M y en fase G1 temprana son 10 veces más susceptibles de consumir la transformación estable con *A. tumefaciens* que las células que permanecen en G2. Además, la cepa de *Agrobacterium* LBA4404 que expresa constitutivamente el gen virG es entre 2 y 5 veces más eficaz en la generación de callos transgénicos. Normalmente, se pueden obtener aproximadamente 500 callos transgénicos a partir de 4 ml de células BY-2 cocultivadas con esta cepa de *Agrobacterium*, lo cual permite la realización de programas de cribado fenotípico. No obstante, los grupos o agregados de las líneas transformadas en suspensión parecen contener múltiples eventos transgénicos heterogonos. En consecuencia, los distintos lotes de cultivo presentan una expresión irregular. El método de células únicas se emplea para disgregar la mezcla quimérica de células del grupo y separarla en células individuales para identificar eventos clonales. A partir de líneas en suspensión de tabaco NT1 quiméricas y transgénicas (GAD1762-034) transformadas con el gen marcador seleccionable PAT (**Figuras 7 y 8**) se produjeron células únicas.

Figura 7: Producción de células únicas y de colonias a partir de líneas en suspensión de GAD1762-034 de DAS.

Figuras 8A, 8B y 8C: colonias de 2-6 semanas de crecimiento surgidas a partir de células únicas GAD1762-034 de DAS.

5 Se recogieron al azar unas 20 colonias discretas y se agruparon en un medio de selección fresco. A partir de dichas colonias se produjeron líneas en suspensión y se obtuvieron líneas de rápido crecimiento mediante 6 ciclos de subcultivo de 7 días cada uno. La producción de biomasa de dichas colonias resultó bastante uniforme en todas las líneas y proporcionó 19 líneas para el posterior análisis de proteínas.

10 Se recogieron muestras a los 7 y 13 días durante más de 4 ciclos de subcultivo y se efectuaron análisis de expresión. Los datos de expresión obtenidos se representaron gráficamente (**Figura 9**).

15 El análisis de los datos no deja lugar a dudas de que había varias líneas clonales con expresión coherente que podían obtenerse durante varios ciclos de subcultivo en comparación con la línea de agregados en suspensión núm. 34 empleada como control. Además, la sublínea 17 superó a la línea control en los niveles de expresión, lo cual indica que este proceso comprendería la línea de élite clonal en la población y una nueva disgregación reformada ayudaría a obtener líneas de élite dotadas de una expresión uniforme.

Ejemplo 7 - Transformaciones de cultivos en suspensión de células únicas

20 Material y métodos

Preparación del material de células vegetales: Tres o cuatro días antes de la transformación, se subcultiva un cultivo en suspensión de 1 semana en medio fresco transfiriendo 2 ml de cultivo de NT1 o BY2 a 40 ml de medio NT1B o LSBY2 en un matraz de 250 ml. Los inhibidores de microtúbulos (MTI) se añadieron en las concentraciones indicadas anteriormente para producir células únicas. Las células únicas se recogieron a los 4 o a los 7 días después del tratamiento con MTI.

30 **Figura 10:** Célula única de células BY2 aisladas con DAS-PMTI-1, un derivado metilindólico patentado por Dow AgroScience y un potente herbicida inhibidor de microtúbulos. Se usó una concentración de 20-50 nM para producir células únicas después de 5 días de subcultivo. Obsérvese que las células son células únicas (la pareja tiene los márgenes solapados); la fotografía se tomó con un microscopio de contraste con interferencia diferencial acoplado a un sistema de imagen confocal.

35 Las células BY2 única se procesaron con un citómetro de flujo Beckman Flow, que ofreció un valor de 658 250 células viables/ml de medio, con un diámetro medio de 10,43 μm y un volumen de 593,8 μm^3 .

40 **Preparación de *Agrobacterium*:** La cepa de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 portadora del gen YFP (pDAB4613) se conserva en glicerol al 50% a -80°C . Una alícuota de 20-500 μl del cultivo madre, portador del vector de expresión se utiliza para iniciar directamente un cultivo líquido añadiendo 20-500 μl a 30 ml de medio líquido YEP, el cual contiene extracto de levadura 10 g/l, peptona 10 g/l, NaCl 5 g/l, sacarosa 10 g/l y espectinomicina 50 mg/l. Después se incuba durante 18-20 h en la oscuridad a 28°C y se centrifuga a 150-200 rpm hasta que el cultivo alcanza una densidad que ofrece una lectura a DO600 de 1,5 aproximadamente.

45 **Cocultivo de células únicas para la transformación nuclear:** en el momento de la transformación, se añade 1,0 ml de suspensión de *Agrobacterium* a un frasco que contiene 40 ml de suspensión de células únicas de tabaco de 4 o 7 días (prelavada en el medio para eliminar el MTI) y se mezcla pipeteando arriba y abajo 5 veces con una pipeta de punta ancha de 10 ml. La suspensión uniformizada se transfiere después en alícuotas de 250 μl a placas de 24 pocillos envueltas con parafilm que se cultivan en oscuridad a 25°C sin agitación durante 3 días. Se analiza una alícuota de unos 50 μl de suspensión colocándola en un portaobjetos y buscando la expresión transitoria de la proteína fluorescente amarilla (YFP).

55 Tratamiento con PEG/ADN para la transformación nuclear de células únicas: suspensiones de agregados de células JT-NT1 fueron tratadas con una concentración final de colquicina de 1 mM (Fluka) en medio NT1B al iniciar el subcultivo y se cultivaron durante 7 días en un agitador orbital a 125 rpm. Las suspensiones se cultivaron a 25°C . Al final del séptimo día se recogió 1 ml (DO600 0,6) de células únicas del frasco y se depositó en un tubo estéril de 14 ml. Se añaden 10 ml de medio MaMg (ver composición en la Tabla 1) y se centrifuga 5 min a ~ 1000 rpm.

TABLA 1. Composición del medio MaMg (transformación mediada por PEG)			
Medio MaMg			
Volumen total de medio	Conc. madre	100	ml
MES		0,1	g
Manitol		7,3	g
MgCl ₂	15 mM	1,5	ml
PH 5,5			

El líquido se decanta y las células se resuspenden en 300 µl de MaMg y se añaden ~50 µg de ADN plasmídico. A esta mezcla de células únicas y ADN se le añaden lentamente 300 µl de PEG 3350 (PEG 3350 40% p/v, manitol 0,4 M, Ca(NO₃)₂ 0,1 M, pH final 5-6) y se mezcla con suavidad. La mezcla de células únicas, ADN y PEG se incubaba a temperatura ambiente durante 20 minutos y después se añaden 10 ml de W5 (medio de lavado) y se centrifuga 5 min a ~1000 rpm. El líquido se decanta, se añaden 2 ml de medio líquido base (NT1B) y la suspensión de células se transfiere a una placa de múltiples pocillos. De este modo se pueden transferir varias réplicas a los pocillos de placas de 24 pocillos. Al cabo de 20-24 horas, se analizan para detectar la expresión transitoria de la YFP depositando un volumen de 50 µl de suspensión celular en un portaobjetos para examinarlo con un microscopio de fluorescencia dotado de un filtro apropiado (Excitación 500/20 nm, diacrómico, emisión 535/30 nm).

Bombardeo biolístico de células únicas para la transformación plastidial: Las células BY2 fueron tratadas con DAS-PMTI-1 20-50 nM en medio EP12% para aumentar el número de plastidios, y bien sin 2,4-D o bien con BAP para aumentar el tamaño de los mismos durante 7 días. Al final del séptimo día las células únicas se recogieron y se transfirieron 2 ml de suspensión a un papel de filtro. Las células se mantuvieron en medio gelificado LS BY2 durante 2 horas para desecarlas. Se sometieron al bombardeo cinco placas de líneas de células únicas deficientes en 2,4-D y otras cinco de líneas celulares tratadas con BAP. Estas células fueron tratadas con DAS-PMTI-1 50 nM durante dos semanas y la tercera semana con DAS-PMTI-1 20 nm. Las células estaban bien y relativamente sanas.

Las células fueron bombardeadas con pDAB3969 incorporado en partículas de oro de 0,6 µm siguiendo el protocolo estándar con una pistola biolística (BioRad). Se transfirieron a un medio selectivo constituido por LS-BY2 con sacarosa al 12% + kanamicina 100 mg/l después de 2 días de recuperación en medio sin el agente de selección.

Resultados y discusión

Intentos de transformación nuclear: los intentos de transformación con PEG (**Figura 11**) y con *Agrobacterium* (**Figura 3**) evidencian con claridad la similar frecuencia de expresión obtenida con ambos métodos. En una alícuota de 50 µl de células se observaron 2-3 células que expresaban la YFP. Ello equivale a una célula transformada en un lote de 10.970 células únicas, lo cual indica que el proceso podría no ser muy eficiente. Es probable que las células no se desprendieran totalmente de la coluicina residual y, en un experimento paralelo, las células se reconstituyeron en colonias con más rapidez y con mejor estado de salud, logrando una frecuencia superior de colonias. Esto indica que una etapa de lavado aumenta la frecuencia de transformación en los experimentos de optimización. Si sólo se recogiera un evento de una célula única, habría al menos 50-60 células transformadas por ml de células únicas en una placa de micropocillos con ambos métodos de transformación. No obstante, las condiciones de transformación se pueden optimizar aún más, siendo posible aislar más colonias transformadas de manera estable.

Figura 11: expresión de la YFP (plásmido Ubi10-YFP) después de 72 horas de tratamiento con PEG. Una de las pequeñas células hija (divididas) situada en el plano de enfoque expresa la GFP, lo cual indica que la expresión puede ser estable.

Transformación plastidial: Después de 6 semanas de cultivo, en el medio de selección se identificaron 5 colonias en crecimiento activo. Por su parte, las células control sin tratar murieron por efecto de la kanamicina 100 mg/l (**Figura 12**). De las colonias en crecimiento activo se extrajeron muestras que fueron analizadas con PCR para determinar la integración de los plásmidos. Dos de las 5 colonias mostraron claramente un producto de PCR, lo que indicaba que el transgén estaba integrado en los plastidios.

Figura 12: Izquierda: tejido control sin tratar inhibido por kanamicina 100 mg/l. Derecha: supuesto aislado transplastómico derivado de célula única creciendo en el medio selectivo.

Se están llevando a cabo más experimentos de transformación para desarrollar protocolos de transformación nuclear y plastídica de alto rendimiento.

Se están llevando a cabo otros experimentos de transformación para optimizar el protocolo con el fin de desarrollar un protocolo de transformación HTP y exento de fragmentos superfluos del vector (mediante plásmidos purificados de fragmentos) para nuevas labores de investigación y desarrollo de bioprocesos.

Ejemplo 8 – Habitación de cultivos en suspensión en medio con glicerol

Material y métodos.

Acondicionamiento de los cultivos para su sincronización. Para mejorar la sincronización, todos los cultivos se siguieron cultivando durante 2 semanas sin subcultivarlos, y después se diluyó 1 ml del cultivo viejo con 50 ml de medio fresco. Dos días después de este subcultivo se contaron células indiferenciadas y en división (se observó un índice amitótico de hasta el 40%), y después de 10 días de cultivo se observaron células diferenciadas que no estaban dividiéndose. Para los procedimientos con especímenes enteros se utilizaron muestras de 0,5 ml de suspensión.

Cultivos celulares.

5 Los cultivos fueron los siguientes: Cultivo prolongado de células Bright Yellow-2 (BY-2) en medio LSGS-BY2 (Anexo 1), cultivo de células NT1 y cultivo en suspensión de células jóvenes de tabaco Petite Havana (PHL) en medio LSG-BY-2 (Anexo II) o en medio G-NT1 (Anexo III). Todos los medios contenían glicerol como fuente de carbono en sustitución de la sacarosa, salvo en el caso de los cultivos regulares de BY2 en los que el medio contenía sacarosa al 1% además de glicerol. Los cultivos en suspensión se diluyeron a intervalos semanales (1 ml de cultivo viejo con 10 50 ml de medio fresco) en matraces Erlenmeyer de 250 ml. La suspensión de células se agitó en un agitador giratorio a 100 rpm y se mantuvo a 25 °C en la oscuridad. Vos et al., "Microtubules become more dynamic but not shorter during preprophase band formation: a possible 'Search-and-Capture' mechanism for microtubule translocation," *Cell Motil Cytoskeleton* 57:246-258, 2004).

Características de los cultivos celulares cultivados en medio con glicerol.

15 En general, el crecimiento de los cultivos fue menor en comparación con los cultivos control que disponían del azúcar. Con todo, se obtuvieron velocidades de crecimiento normales cuando se sembraron inóculos iniciales elevados. Las células estaban sanas y se pudieron seguir cultivando hasta 2 semanas sin el característico amarronamiento observado en las células de los cultivos de control con azúcar. Las células cultivadas con glicerol presentaban una mayor agregación de células en las unidades en suspensión que las cultivadas con azúcar. Estas células se usaron en los experimentos para analizar los compuestos MTI que alteran las propiedades adhesivas de las células de las subunidades agregadas, ya que el glicerol reduce la estabilidad de las membranas.

Anexo I.

25 El medio LSGS-BY2 consiste en sales de macro y micronutrientes de Murashige y Skoog, complementadas con 30 ml de glicerol (v/v) y 10 g de sacarosa (p/v), mioinositol 100 mg/l, KH₂PO₄ 200 mg/l, tiamina 1 mg/l y ácido 2,4-diclorofenoxiacético 0,2 µg/l. El medio se ajusta a pH 5,8 antes de introducirlo en el autoclave.

Anexo II.

30 El medio LSGS-BY2 consiste en sales de macro y micronutrientes de Murashige y Skoog (Murashige and Skoog 1962), complementadas con 30 ml de glicerol (v/v), mioinositol 100 mg/l, KH₂PO₄ 200 mg/l, tiamina 1 mg/l y ácido 2,4-diclorofenoxiacético 0,2 µg/l. El medio se ajusta a pH 5,8 antes de introducirlo en el autoclave.

Anexo III.

35 El medio G-NT1 consiste en sales de macro y micronutrientes de Murashige y Skoog (Murashige and Skoog 1962), complementadas con 30 ml de glicerol (v/v), mioinositol 100 mg/l, KH₂PO₄ 180 mg/l, tiamina 1 mg/l y ácido 2,4-diclorofenoxiacético 2 mg/l. El medio se ajusta a pH 5,8 antes de introducirlo en el autoclave.

Ejemplo 9 – Producción de células únicas a partir de cultivos en suspensión de dicotiledóneas [Tabaco (BY2, NT1, Petite Havana y Xanthi), y zanahoria (*Daucus carota* L. ssp. *sativus* cv Sativa)]**Cultivos en suspensión de zanahoria.**

45 Los cultivos de callos de zanahoria se iniciaron a partir de plantas de *Daucus carota* L. ssp. *sativus* cv Sativa mantenidas *in vitro*. Unos explantes de peciolo foliar aislados se cultivaron en medio semisólido. Los cultivos en suspensión se iniciaron a partir del callo transfiriendo 50 mg de callo friable a 1,5 ml de medio LSHY2 (Anexo I) en una placa de 24 micropocillos. Las suspensiones que crecían más rápido se transfirieron a frascos, a razón de 1 ml de suspensión y 35 ml de medio líquido LSHY2. Los cultivos se mantuvieron bajo luz difusa en un ciclo de subcultivo de 7 días. Estos cultivos resultaron regenerables y las unidades de suspensión eran grandes, con células compactadas. Tratadas con colquicina 0,5 mM a 1 mM o con DAS-PMTI-1 (etiléster del ácido 4-cloro-1,5-difenil-1H-pirazol-3-iloxi)-acético) 25 nM a 0,5 mM en el estadio de iniciación de la suspensión del subcultivo, las células de las unidades se separaron y se liberaron al medio durante el tercer día posterior al inicio del cultivo. Los cultivos celulares tratados con colquicina manifestaron una producción homogénea de células únicas, pero los tratados con DAS-PMTI-1 produjeron células únicas con una morfología diversa en lugar de redonda. La tinción con calcofluor y la observación con un microscopio de fluorescencia revelaron que las células conservaban las paredes celulares intactas.

Producción de una línea clonal a partir de suspensiones de células únicas de zanahoria.

60 La suspensión de células únicas en fase estacionaria de crecimiento, siete días después del inicio del cultivo con tratamientos de colquicina 0,5 M, se diluyó con medio fresco LSHY2 hasta alcanzar una DO660 de 0,6. Unos alícuotas de 1,5 ml del cultivo de células únicas diluidos con medio M (Anexo II) se sembraron en placas de Petri 15×100 y se extendieron con un asa de siembra. De forma paralela, agregados en suspensión de zanahoria sin

tratar también se diluyeron hasta la misma densidad y se sembraron de manera similar para comparar las respuestas de crecimiento de ambos cultivos. Después de 4 semanas de crecimiento a oscuras, las placas con las células únicas produjeron varias colonias discretas, lo cual indica que era posible obtener líneas clonales de estas células. Sin embargo, la suspensión sin tratar mostró un crecimiento en tapiz del callo sobre la superficie de la placa (Figura 13). Así pues, es posible demostrar que las células aisladas de zanahoria pueden producir colonias descendientes de una sola célula para producir líneas clonales.

Figura 13: Producción de líneas clonales a partir de suspensiones de células únicas de zanahoria. Crecimiento en tapiz en medio M sembrado con agregados en suspensión sin tratar (Panel A). Crecimiento de colonias discretas sobre el medio sembrado con las células únicas (Panel B).

Ejemplo 10 – Producción de células únicas a partir de cultivos en suspensión de monocotiledóneas [maíz, arroz (T309), dactilo, trigo (Anza)]

Cultivos de células de maíz clorofílicas totipotentes.

Los cultivos fotoautótrofos de maíz se iniciaron y se mantuvieron en ciclos de cultivo de 7 días. Los cultivos se trataron en el momento del subcultivo con DAS-PMTI-1 (etiléster del ácido (4-cloro-1,5 difenil-1H-pirazol-3 iloxi)-acético) 25 nM a 0,5 mM o con trifluralina 10 nM a 0,5 mM para separar células únicas de los agregados. La colquicina solamente fue activa en concentraciones superiores a 0,5 mM hasta el intervalo de 1 mM y liberó células únicas (Figura 14). Las unidades en suspensión de maíz aparecen fuertemente compactadas en agregados celulares duros cuando se comparan con las células de dicotiledóneas analizadas. No obstante, la suspensión de células de maíz verde presentó las unidades de suspensión más duras y los tratamientos lograron una liberación de hasta el 50% de células únicas viables en 7 días, que pudieron ser separadas mediante breves centrifugaciones a 100 rpm o haciéndolas pasar a través de filtros con poros de 75-100 µm de diámetro.

Figura 14: Tratamiento con colquicina 0,5-1 mM en medio líquido y cultivos analizados 14 días después del inicio del subcultivo (final del segundo ciclo de subcultivo). **A:** Las células únicas se liberan de los grupos; **B:** agregado celular muy compacto coloreado con la tinción vital DAF; **C y D:** células únicas teñidas con DAF liberadas tras el tratamiento con 1 y 0,5 mM respectivamente, después de filtrar la suspensión (filtros con poros de 100 µm de diámetro); **E y F:** visión a más aumentos de las células únicas de **D**.

Cultivo en suspensión de dactilo y arroz (T309).

Callos de dactilo y de T309 se iniciaron a partir de semillas maduras (colección de semillas de DAS) en medio semisólido. Los cultivos en suspensión se iniciaron a partir de estos callos derivados de semillas. Los cultivos de células en suspensión se mantuvieron en un ciclo de subcultivo de 7 días en frascos en agitación a 150 rpm y a oscuras. Se utilizaron compuestos MTI parecidos a los descritos en el caso del maíz (anteriormente) y en concentraciones similares. Las células únicas de dactilo y de arroz se desprendieron 3-5 días después del inicio del cultivo.

Cultivo en suspensión de trigo (cv. Anza).

Los callos de trigo Anza se iniciaron con medio semisólido MS2-D para trigo (Anexo III) a partir de tejido del escutelo. Dichos tejidos se obtuvieron de tejidos esterilizados y empapados y el callo inducido a partir de diferentes tejidos se transfirió a medio líquido MS-2D para trigo (Anexo III). Se aisló una línea de células en suspensión que crecía rápidamente y después se subcultivó durante 7 años en un ciclo de subcultivo de 7 días con medio líquido MS2D y mantenida a largo plazo (7 años). Para la producción de células únicas, los cultivos se habituaron primero en medio líquido NB con dicamba (Anexo IV). Los cultivos de trigo Anza pueden acondicionarse en este medio para producir suspensiones finas con unidades de agregados celulares de tamaño uniforme. Los inóculos fueron expuestos desde el inicio del subcultivo a colquicina, trifluralina o DAS-PMTI-1 en concentraciones comprendidas entre 25 nM y 1 mM. La suspensión liberó células únicas al medio a partir del tercer día del inicio del cultivo. Las células únicas eran pequeñas y uniformes.

Anexo I.

El medio LSBY2 consiste en sales de macro y micronutrientes de Murashige y Skoog, complementadas con 30 g de sacarosa (p/v), mioinositol 100 mg/l, KH₂PO₄ 200 mg/l, tiamina 1 mg/l y ácido 2,4-diclorofenoxiacético 0,2 µg/l. El medio se ajusta a pH 5,8 antes de introducirlo en el autoclave a 120°C. Para iniciar los cultivos se empleó el volumen de suspensión del séptimo día de cultivo, en fase estacionaria. Se transfieren volúmenes de 1 ml de inóculo en suspensión de zanahoria a 50 ml de medio LSBY2 y después los cultivos se colocan en agitadores a 150 rpm, a oscuras y 28°C. Los compuestos MTI usados se añaden junto con el medio fresco en el ciclo de iniciación del cultivo.

Anexo II.

5 El medio M consiste en sales basales LS y vitamina B5, 30 g de glucosa, 1 μ M de 2,4-D y otro tanto de cinetina, y el pH del medio se ajusta a 5,8 antes de añadirle agar de Noble 8 g/l. A continuación el medio se esteriliza en el autoclave y después se vierte en placas de Petri 15×100.

Anexo III.

10 El medio MS2D consiste en sales MS (Murashige y Skoog) y en vitaminas de Eriksson, complementadas con 2 mg de 2,4-D, 0,5 mg de tiamina, 30 g de sacarosa, 400 mg de mioinositol y 400 mg de hidrolizado de caseína (ECH). Los cultivos se esterilizaron en autoclave después de ajustar el pH del medio a 5,8. Los cultivos en suspensión se subcultivaron a intervalos de 7 días (inóculos iniciales de 6 ml de la suspensión en 54 ml de medio fresco) y se mantuvieron en agitación a 150 rpm, a oscuras y 28°C. En estas condiciones, las poblaciones de células
15 mantuvieron siempre un crecimiento exponencial entre el segundo y el sexto día posterior a la siembra. Por lo que respecta al medio gelificado para inducir el callo a partir del escutelo de semillas maduras, el medio MS2D contenía un componente adicional, Gelrite 2,5 g/l, añadido tras ajustar el pH.

Anexo IV.

20 El medio NB con dicamba consiste en sales basales NB, sacarosa 30 g/l, mioinositol 100 mg/l, hidrolizado de caseína ECH (ECH) 300 mg/l, L-prolina (2,5 M) 1,7 ml/l, L-glutamina 500 mg/l y dicamba 6,6 mg/l. El pH del medio se ajusta a 5,8 antes de proceder a su esterilización por filtración.

25 **Ejemplo 11 – Producción de células únicas de zanahoria y transformación genética mediante fibras de carburo de silicio de cultivos en suspensión de células únicas de zanahoria**

Iniciación de las suspensiones de células únicas de zanahoria.

30 Una línea regenerable de zanahoria criopreservada (D2-40-018) se descongeló y se cultivó con medio de Linsmeier-Skoog (LS) (Nagata, T., Nemoto, Y., and Hasezawa, S. (1992) Int. Rev. Cyto 132, 1-30). Las sales del medio se adquirieron a PhytoTechnology Laboratories, núm. de catálogo L689. En una semana se estableció una línea en suspensión que crecía activamente, y la línea de mantenimiento se subcultivó transfiriendo 2 ml de concentrado celular (PCV) a 58 ml de medio de suspensión LS BY2 a 28°C en un agitador orbital (Innova-3300) a 125 rpm con
35 luz difusa en un ciclo de cultivo de 7 días. Para la producción de las células únicas, se introdujo 1 ml de PCV de la suspensión de zanahoria en fase estacionaria en 30 ml de medio de suspensión LS con colquicina 1 mM (Sigma, núm. de catálogo C3915) y se cultivó durante 7 días. Las células únicas aparecieron a partir de 3-7 días de cultivo y quedaron listas para los experimentos de transformación. Las células únicas de zanahoria pueden mantenerse en fase estacionaria hasta 28 días diluyendo los cultivos a los 14 días con 60 ml de medio líquido LS BY2 nuevo.

40

Transformación genética de células únicas de zanahoria mediante WHISKERS™.

45 En medio LSBY2 tratado con colquicina 1 mM aparecieron células únicas a los 4 y a los 11 días después de iniciar el cultivo. Las células únicas eran muy activas y viables a juzgar por los resultados de la tinción con diacetato de fluoresceína. Entre 10 y 25 días después de la selección en placas con glufosinato amónico, en colonias derivadas de las células únicas se observaron eventos de callos que expresaban la proteína fluorescente amarilla.

Transformación genética de células únicas de zanahoria.

50 Para el experimento de transformación se utilizó un protocolo de transformación con WHISKERS™ modificado [Petolino, Welter and Cai (2003) Molecular Methods of Plant Analysis, Vol. 23, 147-158, Chapter 9, Genetic Transformation of Plants, ISBN 3540002928]. Los experimentos se iniciaron transfiriendo 25 ml de suspensión de células únicas de zanahoria 4 y 11 días después del tratamiento para obtener células únicas y del inicio del cultivo a frascos de centrifuga IEC estériles de 250 ml (Fisher Scientific, núm. de catálogo 05-433B). Las transformaciones se
55 llevaron a cabo añadiendo 8,1 ml de una suspensión recién preparada de fibras al 5% (Silar SC-9, Advanced Composit Materials Corp, Greer, SC) y 170 μ g de pDAB3831 portador del promotor AtUbi10 que regulaba el gen PAT y del promotor CSVMS que controlaba el gen YFP. Cada transformación se llevó a cabo en un frasco colocado en un mezclador de pintura modificado (Red Devil Equipment Co, Minneapolis, MN) y agitado a alta velocidad durante 10 segundos; después las células se devolvieron a un frasco de recuperación de 500 ml al que se añadieron
60 100 ml de medio líquido fresco LSBY2. Las células se dejaron recuperar durante 1 hora en un agitador giratorio a 125 rpm y 28°C.

Finalizado el periodo de recuperación, se esparcieron uniformemente alícuotas de 3 ml de la suspensión celular sobre discos estériles de papel de filtro núm. 44 de 55 mm (Whatman International Ltd.) colocados en un embudo Buchner y se aspiró el medio líquido. Los papeles de filtro con las células se colocaron en placas de Petri de 60×20 mm que contenían medio semisólido LSBY2-B15 con glufosinato amónico 15 mg/l y agar TC al 0,8% como

65

gelificante. Las placas se incubaron a 28°C a oscuras. Al cabo de 10 días, los eventos que expresaban la GFP se sacaron del papel de filtro y se depositaron en placas individuales con LSBY2-B15 semisólido. Los filtros y las células restantes se transfirieron a medio fresco semisólido LSBY2-B15 y se incubaron a oscuras a 28°C.

5 Análisis de los eventos de colonias surgidas a partir de células únicas.

Los supuestos eventos transgénicos que mostraban una fluorescencia uniforme en un microscopio de fluorescencia invertido Leica 25 días después del inicio de los experimentos de transformación fueron analizados para detectar la proteína marcadora seleccionable PAT con un ensayo ELISA sensible por medio del kit “EnviroLogix LibertyLink® PAT/pat Plate Kit.” Este kit es un ensayo de enzimoimmunoabsorción en “sándwich” (ELISA). El tejido de callo se colocó en un tubo de microcentrífuga y se añadieron 250 µl de tampón de extracción. El tampón de extracción era PBS (Fisher, núm. de catálogo BP665-1) y Tween-20 0,05% (Sigma-Aldrich, núm. de catálogo P1379). El tejido se trituró con una pequeña mano de mortero en el mismo tubo de la microcentrífuga. El extracto de la muestra se centrifugó a 11.000 rcf durante un minuto, y el sobrenadante se analizó con el ELISA a las siguientes diluciones 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 y 1:64. Los ELISA se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones del kit Envirologix, número de catálogo AP014. En la prueba, los extractos de muestras se añaden a los pocillos problema tapizados con anticuerpos frente a la PAT del gen *pat*. Cualquier resto presente en el extracto de muestra permanece unido a los anticuerpos y es detectado después por la adición de anticuerpo contra PAT/pat marcado con enzima (peroxidasa de rábano). Tras una sola etapa de lavado, los resultados de la prueba se visualizan por colorimetría; el color desarrollado es proporcional a la concentración de PAT/pat presente en el extracto de muestra.

El resultado demostró que el tejido de control negativo, a una proporción de muestra de 143 mg/250 µl de tampón de extracción, no producía un valor en el ELISA de PAT. El evento 001B, a una proporción de muestra de 63 mg/250 µl, arrojó un valor de ELISA de 83 ng/ml, lo que equivale a 330 pg de PAT por mg de callo e indica un evento fluorescente que está transformado tanto con la PhiYFP fluorescente en el rango esperado como con el gen marcador seleccionable PAT.

Ejemplo 12 – Clase química de inhibidores de microtúbulos y producción de células únicas vegetales

El paralelismo entre los microtúbulos y las microfibrillas representa una respuesta correlacionada con un principio polarizador desconocido antes que una relación causal (Emons et al., 1992). Este punto de vista está respaldado por varios ejemplos en los que la mayoría de las células situadas en la zona de maduración de la raíz de maíz estresada por agua (*Zea mays*) presentaban microtúbulos organizados en hélices dextrógiras y, en cambio, microfibrillas dispuestas en hélices levógiras (Baskin et al., 1999). De modo similar, el mutante de *Arabidopsis thaliana* (*microtubule organization 1* (*mor1*)), presenta estructuras aberrantes de microtúbulos pero aparentemente una alineación inalterada de las microfibrillas (Himmelspach et al., 2003; Sugimoto et al., 2003). En los experimentos, la suspensión de células únicas presentaba una respuesta de crecimiento similar a la del control, en el cual los incrementos de peso seco a lo largo del ciclo de subcultivo indican que las células se dividen en presencia de concentraciones bajas de inhibidores de la microtubulina (MTI), pese a que presenta células en crecimiento isotrópico con expansión radial. Asimismo, alterando la composición del medio es posible ver la placa celular en tales células únicas con crecimiento isotrópico, lo que respalda el hecho de que puedan estar dividiéndose en presencia de bajas concentraciones de MTI. Por consiguiente, las células vegetales tratadas con bajas concentraciones de un inhibidor de microtúbulos y mantenidas en niveles óptimos en el medio pueden conservar una cantidad sustancial de microtúbulos corticales inalterados. Esto permitiría a las células únicas llevar a cabo el proceso normal de construcción de la pared celular, incluida la construcción del fragmoplasto, que es un importante prerrequisito para la división celular.

Con el propósito de inhibir parcialmente la función de los microtúbulos y seleccionar compuestos que sean selectivos en cuanto a la alteración de los mismos con bajas concentraciones, se estudiaron distintas clases de compuestos. La interacción de los MTI con la tubulina vegetal ha sido bien caracterizada (Hugdahl and Morejohn, 1993). No obstante, tal y como sucede con cualquier inhibidor, existen efectos inespecíficos (Vaughn and Lehn, 1991). Por tanto, en este ejemplo se hizo una comparación con inhibidores de microtúbulos de diversa composición química para averiguar qué compuestos podrían mantener el crecimiento de las células únicas sin causar efectos inespecíficos. Existen compuestos como el clorprofam que inhiben la elongación a concentraciones más bajas de las necesarias para estimular la expansión radial, puesto que afectan más a los microtúbulos mitóticos que a los corticales (Hoffman and Vaughn, 1994). Así pues, un objetivo de este trabajo consistió en seleccionar compuestos que con una baja concentración óptima conservaran los suficientes microtúbulos corticales para asegurar las funciones normales de la célula manteniendo el crecimiento isotrópico, pero al mismo tiempo sin causar un efecto inhibitorio inespecífico apreciable.

La colquicina es un derivado de la tropolona, cuyos estructura estereoquímica y mecanismo de acción son bien conocidos (Keats and Mason, 1981; Margolis and Wilson, 1977; Raugh and Wilson, 1980), Murgulis, 1974), que impide la formación de microtúbulos a partir de los dímeros de tubulina. La propizamida y las otras benzamidas actúan sobre el huso nuclear en las células vegetales (Akashi et al., 1988; Bartels P G and Hilton J L., 1973; Carlson et al., 1975) y fueron desarrolladas como eficaces herbicidas en preemergencia contra hierbas anuales y malezas de hoja ancha (Aya et al., 1975). Las utilidades de las amidas fosfóricas son similares a las de los

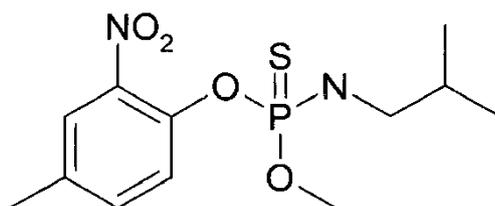
herbicidas dinitroanilínicos tales como la orizalina (Surflan) y la trifluralina (Treflan) (Ashton and Crafts, 1981). La trifluralina es uno de los representantes más conocidos de la familia de herbicidas de las dinitroanilinas; destruye los microtúbulos vegetales pero es ineficaz en células animales (Hess and Bayer, 1974; Hess and Bayer, 1977). Las piridinas poseen un anillo bencénico en el que uno de los carbonos está sustituido por un átomo de nitrógeno. Varias piridinas sustituidas son empleadas como herbicidas. En este grupo se encuentran ditiopir (Dimension®) y thiazopyr (Visor®). El ditiopir es un herbicida selectivo en pre- y postemergencia, que se aplica exclusivamente al césped para controlar una amplia variedad de gramíneas indeseadas; a menudo se formula con otros herbicidas y también en fertilizantes. El thiazopyr es un compuesto selectivo en preemergencia que funciona bien con la práctica totalidad de las gramíneas arvenses y en un amplia variedad de cultivos, tales como cítricos, algodón, maíz, cacahuetes, soja o patatas. En definitiva, las piridinas parecen actuar como inhibidores del ensamblaje de los microtúbulos.

Materiales y métodos

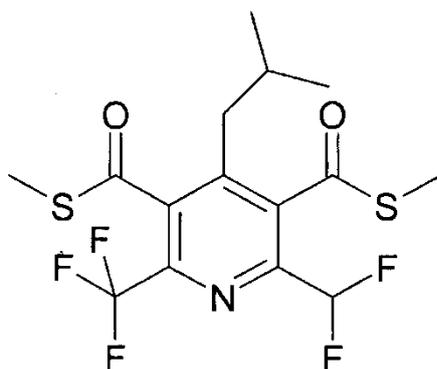
Cultivos en suspensión de tabaco JTNT1. Los cultivos en suspensión de células de tabaco JTNT1 se mantuvieron subcultivando 1 ml de concentrado celular (PCV) en 20 ml de medio de tabaco (sales MS, mioinositol, tiamina HCl (1 mg/ml), fosfato de potasio dibásico (anhidro), MES, 2,4-D (10 mg/ml) y glicerol al 3% (medio NT1B). La línea celular se subcultivó cada 7 días y se agrupó si fue necesario para los análisis. La sacarosa 1 M inhibió tanto la velocidad como la magnitud de la polimerización de la tubulina vegetal inducida por el taxol (Bokros et al., 1993). El análisis de la polimerización de la tubulina vegetal en presencia de sacarosa 1 M (con APM, amiprofosmetil, y con orizalina) ha constatado una reducción de la longitud de los microtúbulos vegetales dependiente de la concentración (Morejohn and Fosket, 1984; Morejohn et al., 1987). Además, la sacarosa estabiliza los microtúbulos preformados, lo cual impide examinar los efectos de los MTI sobre tales microtúbulos. La sacarosa también aumenta sustancialmente la viscosidad de la solución, y la polimerización de la tubulina resulta alterada al menos en parte por la menor velocidad de difusión de los dímeros y los polímeros. Por todo ello, era importante que el medio destinado a la producción de células únicas contuviera la menor cantidad de sacarosa, o mejor ninguna. Con ese fin, para este estudio se desarrolló una nueva línea JTNT1 habituada al glicerol.

Las líneas en suspensión a tratar se prepararon con 1 ml de PCV en 20 ml de medio, agitando con frecuencia para asegurar una buena distribución de las células (los agregados en suspensión tienden a precipitar) y después se transfirieron a placas de microtitulación de 24 pocillos, a razón de 1 ml de suspensión de JTNT1 en cada uno de los 24 pocillos. Las placas se mantuvieron en un agitador Innova 4900 Multi Environmental Shaker con pinzas y arneses especiales para poder apilarlas hasta una altura de seis placas. Se aplicó una velocidad de giro de 130 rpm, a 25°C y a oscuras.

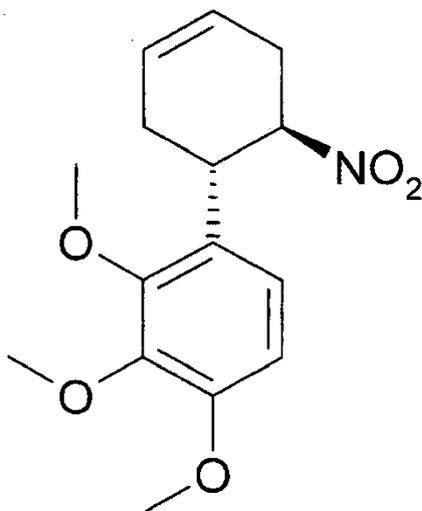
Producción de células únicas. Cada compuesto se disolvió con dimetilsulfóxido (DMSO) para disponer de soluciones madre de una concentración 0,5 M. A cada pocillo de las placas de 24 pocillos se le añadió un mililitro de suspensión de JTNT1 (1 ml de PCV/20 ml de medio para tabaco). A continuación, se añadió un solo producto químico a cada uno de los pocillos hasta alcanzar las concentraciones deseadas (1 µM, 3 µM y 10 µM). Los cultivos se dejaron crecer durante 7 días en el agitador Innova. Cada día se midió la turbidez de cada pocillo con un aparato SpectraMax M2^o de Molecular Devices (ajustado a una absorbancia de 600, con 5 lecturas por pocillo). El día 7, las células se examinaron con un microscopio confocal invertido Leica 5000 para determinar la formación de células únicas y la viabilidad celular.



Amiprofosmetil (APM)



Ditiopir



(±)-4S,5R-4-nitro-5-(2,3,4-trimetoxifenil)-ciclohexeno (trimetoxifenilciclohexeno)

Producción de evento de callo clonal mediante el cultivo de células BY2 única en medio LSBY2 con glicerol.

Células de tabaco BY-2 (Nagata et al., 1992) fueron transformadas con pDAB1590 mediante un protocolo modificado descrito por Shaul et. al., 1996 y fueron seleccionadas con medio LSBY15 después de 4 días de cocultivo. Se recuperó el evento de callo que expresaba la proteína fluorescente verde y el callo se mantuvo en medio LSBY2 B15. En un mes, un evento de callo creció hasta adquirir varios centímetros de diámetro, y un pedazo pequeño (~2 a 5 mm²) pero muy fluorescente se transfirió a un medio sólido fresco para suministrar a las células nutrientes y un agente de selección fresco que seleccionaría a los callos que expresasen homogéneamente la GFP. Un pedazo de 500 mg del callo se transfirió a 50 ml de LSBY2-Gly-B15, un medio líquido LSBY2 modificado con glicerol al 3% y sacarosa al 1% como fuentes de carbono en un matraz de agitación de 250 ml (130 rpm a 25°C en la oscuridad). Cada semana se inició un cultivo en suspensión con un volumen concentrado de células (PCV) de 0,5 ml. De ese modo, los callos y los agregados en suspensión que expresaban la proteína fluorescente verde (GFP) se mantuvieron en un ciclo mensual y de 7 días, respectivamente.

Producción de células únicas que expresan la GFP. Las células únicas se produjeron añadiendo el compuesto DDP (difencilpirazol) hasta alcanzar una concentración de 1 µM durante el inicio del ciclo de cultivo de 7 días en medio LSBY2-Gly-B15 junto con 0,5 ml de concentrado celular (PCV) de agregados en suspensión que expresaban la GFP en la fase estacionaria. Alternativamente, se transfirieron 25 ml de agregados en suspensión a 25 ml de medio de suspensión fresco LSBY2-Gly-B15 añadiendo 50 µl de solución madre de difencilpirazol 1 M disuelta con DMSO hasta obtener una concentración final de 1 µM en la suspensión. De ese modo se pueden producir células únicas con un ciclo mucho más breve de sólo 3,5 días. El medio LSBY215 siempre contiene glufosinato amónico 15 mg/l para la selección.

La GFP se expresó como una proteína quimérica en células únicas a lo largo de los ciclos de cultivo de 3,5 o 7 días y estaba presente en localizaciones subcelulares puesto que la expresión de la GFP de los constructos quiméricos se observó en células vivas con epifluorescencia convencional con un microscopio Leica y también con un microscopio confocal láser de barrido Zeiss Axiovision. La expresión se observó en muchos compartimientos celulares, entre ellos el núcleo y las fibras citoplasmáticas.

Resultados y discusión.

Las células presentes en el medio de cultivo de tabaco dotado de glicerol presentaban un aspecto muy sano y las agrupaciones de células eran muy evidentes. Las células manifestaron un buen incremento de la biomasa durante un período de 7 días, aunque hubo una reducción ~50% en la biomasa en comparación con el control cultivado con azúcar. Los cultivos de control también contenían DMSO al 0,1% para asegurarse de que no existía ningún efecto inducido por el DMSO. La adición del etiléster del ácido 4-clor-1,5-difenil-1H-pirazol-3-iloxi)-acético (difencilpirazol) 1 µM tanto al medio de sacarosa como al de glicerol no redujo significativamente la biomasa de las células respecto a los controles correspondientes, lo cual indica que en presencia del difencilpirazol existe un crecimiento activo de células únicas similar al del control. La curva de crecimiento fue similar cuando los cultivos se hicieron pasar por 2 subciclos o 3,5 días. La producción de células únicas en medio con glicerol también muestra un alto número de células viables en comparación con el control.

Otros compuestos como trifluralina, orizalina y compuestos pertenecientes a la clase de los estabilizadores de microtubulina como el taxol, han sido estudiados para determinar su eficacia en la producción de células únicas a partir de cultivos en suspensión de tabaco JTNT1 con medio NT1B y glicerol al 3% como única fuente de carbono.

Dichos compuestos fueron: colquicina, N-(1,1-dimetilpropinil)3-clorobenzamida, propizamida y trifluralina. En estos estudios, los compuestos difirieron en su capacidad para producir células únicas y en la inclinación de la curva dosis-respuesta. La orizalina, como los demás compuestos analizados, cuadruplicó como mínimo el diámetro de las células únicas y presentó una concentración de saturación en torno a 10 veces el valor umbral. La colquicina quintuplicó el diámetro y presentó una curva dosis-respuesta más inclinada, lo que indica que estos dos compuestos podrían ser preferidos para trabajar con dosis altas.

Las concentraciones necesarias para producir células únicas se situaron en el intervalo de 50 μM y 2 mM en el caso de la colquicina, y entre 10 nM y 100 μM en el de la propizamida, N-(1,1-dimetilpropinil)3-clorobenzamida. En cambio, las concentraciones de orizalina y trifluralina para la producción óptima de células únicas oscilaron entre 100 nM y 1 mM. No obstante, en altas concentraciones estos compuestos aumentaron la síntesis de proteínas y produjeron la división de los plastidios y las mitocondrias en las células tratadas, lo que llevó a la formación de células gigantes de hasta 300 μm de diámetro con poliploidía nuclear, como se observa en células de zanahoria cultivadas durante 21 días. Esto resultados sugieren que la inhibición de la mitosis es el efecto fundamental de estos compuestos en las altas concentraciones estudiadas. Así pues, no sólo parece importante mantener la concentración óptima de MTI, sino también la química del compuesto (que tendrá una función muy selectiva sobre los túbulos y no la función no selectiva similar a la función en la división celular). En línea con un objetivo, se describen a continuación otros compuestos aparte del difenilpirazol descrito anteriormente.

Se observaron agregados en suspensión de BY2: en medio LSBY2 con azúcar; células únicas BY2 en división producidas en difenilpirazol 1 μM muestran la placa celular en un medio LSBY2 modificado; células BY2 transgénicas para la GFP disgregadas y evento colonial clonal suelto en el medio gelificado LSBY2-15.

Resumen de la producción de células únicas de tabaco BY2 con medio LSBY2 con glicerol. Las células únicas producidas con difenilpirazol 1 μM a partir de una suspensión de agregados muestran un solo núcleo con uno o dos nucleolos en el 90% de las células tras 3,5 días de cultivo. Estas células pueden sembrarse en una placa con gel LSBY2 con agar TC al 0,8% y glufosinato amónico 15 mg/l como agente de selección ya que el plásmido pDAB1590 utilizado para transformar la suspensión de agregados contaba con PAT como marcador seleccionable. Las células se diluyeron con el medio líquido en una dilución 1:4 y se sembraron en el medio gelificado, seleccionando el evento clonal 21 días después de la siembra.

Por lo que respecta al amiprofosmetil (APM) cuando se añadió a las suspensiones JTNT1, se formaron células únicas con las concentraciones de 1-10 μM ; a concentraciones más altas se produce una notable reducción del crecimiento e inhibición de la división celular. En las fotografías correspondientes a APM 1 μM y 3 μM se pueden observar células separadas redondas en comparación con el control, que sólo contaba con DMSO. Las células de tabaco JTNT1 presentaban un saludable color amarillo y crecieron bien en presencia de APM 1 μM y 3 μM . La viabilidad celular, valorada con las tinciones de diacetato de fluoresceína y yoduro de propidio, resultó de hasta el 70%.

De nuevo se observó la producción de células únicas inducida por APM a partir de células de tabaco JTNT1 cultivadas en un medio con glicerol. El agregado en suspensión de JTNT1 empleado como control se cultivaba en un medio con glicerol y DMSO al 0,1%; se observaron células JTNT1 única en los medios NT1B con glicerol que contenían APM a 1, 3 y 10 μM .

El ditiopir pertenece a la clase de herbicidas de las piridinas sustituidas, que alteran los microtúbulos. Su adición a las suspensiones de JTNT1 en concentraciones de 1 μM , 3 μM y 10 μM , propició la formación de células únicas con las dos primeras concentraciones (fotografías E y F), pero la concentración de 10 μM tenía células únicas (y la concentración de células era baja). Las células de tabaco estaban sanas, crecían y presentaban un color amarillo con todas las concentraciones de ditiopir probadas. La viabilidad celular después del tratamiento con ditiopir 1 μM y 3 μM se situó entre 70-80%, una viabilidad elevada.

Un mimético de la colquicina (Evans et al., 2003), el (\pm)-4S,5R-4-nitro-5-(2,3,4-trimetoxifenil)-ciclohexeno (trimetoxifenilciclohexeno), se analizó en cultivos de tabaco JTNT1 para determinar su eficiencia en la producción de células únicas. A pesar de la leve decoloración de las células (presentaban un amarillo ligeramente más pálido), estas crecieron muy bien en la placa. Dicha sustancia química promovió la formación de células únicas a 1 μM , 3 μM y 10 μM . Las células eran redondas y la viabilidad celular osciló en todas las concentraciones entre 80-90%. La inhibición del crecimiento celular resultó bastante similar con todas las concentraciones analizadas y las células estaban sanas con una alta viabilidad y menos citotoxicidad.

Así pues, la concentración de 10 μM de trimetoxifenilciclohexeno indujo la producción de células únicas en células de tabaco JTNT1 cultivadas en un medio con glicerol.

Supercélulas únicas. Los agregados en suspensión de zanahoria pueden ser cultivados con colquicina 1 mM en 60 ml de medio líquido LSBY2 y mantenidos en el mismo medio hasta 28 días. El crecimiento después del segundo subcultivo declina al cabo de 14 días, pero las células siguen creciendo hasta formar supercélulas única que están vivas y sanas (pero que muestran grandes núcleos lobulados, lo cual indica la existencia de poliploidía nuclear). Las

supercélulas única de zanahoria multinucleadas se observaron en células de 21 días de edad tratadas de forma continua con colquicina 1 mM en medio LSBY2.

Conclusión. El crecimiento celular en las concentraciones analizadas se determinó por observación visual, peso seco (registrado únicamente el día 7) y turbidez. La Figura 15 muestra los valores de turbidez tomados en un período de 7 días. Los valores de turbidez son relativos respecto a las placas que sólo contenían el medio (con glicerol al 3%) y el inhibidor de microtúbulos en concentraciones 1 μ M, 3 μ M y 10 μ M. Si bien los controles presentaron los mejores patrones de crecimiento, tal y como era previsible, ninguna de las sustancias químicas analizadas provocó la muerte de las líneas celulares en las concentraciones de 1 μ M y 3 μ M. Todas las células, independientemente del tratamiento al que fueron expuestas, experimentaron un aumento del ritmo de crecimiento aproximadamente en el mismo momento (día 3), y el volumen de células seguía aumentando todavía el día 7. Esto demuestra que las células tratadas con los productos químicos seguían siendo viables al menos al cabo de 7 días.

Ejemplo 12 Referencias:

- 1. Akashi et. al., (1988). *Plant Cell Physiol* 29(6) :1053-1062
- 2. Aya, et. al., (1975). Fifth Asian-Pacific Weed Science Society Conference, pp 138-141
- 3. Bartels P G and Hilton J L (1973). *Pestic Biochem Physiol* 3 : 462-472
- 4. Carlson et. al., (1975). *Weed Sci* 23 : 155-161
- 5. Emons et. al., (1992) *Physiol Plant* 84: 486-493
- 6. Evans et. al., (2003). *Tetrahedron*, 59, 2223-2229),
- 7. Hess F D and Bayer D E (1974). *Acala* 4-42". *J Cell Sci* 15 :429-441
- 8. Hess F D and Bayer D E (1977). *J Cell Sci* 24 : 351-360
- 9. Himmelspach et. al., (2003). *Plant J* 36: 565-575
- 10. Hoffman J C, Vaughn K C (1994). *Protoplasma* 179: 16-25
- 11. Hugdahl J D, Morejohn L C (1993) *Plant Physiol* 102: 725-740
- 12. Keates R A B and Mason G B (1981). *Can J Biochem* 59 :361-370
- 13. Margolis R L and Wilson L (1977). *Proc Natl Acad Sci USA* 74 : 3466-3470
- 14. Murthy, J., et al., (1994). *Plant Physiology* 105, 309-320).
- 15. Margulis T N (1974). *J Am Chem Soc* 96 : 899-901
- 16. Nagata, T., Nemoto, Y. & Hasezawa, S. (1992) *Int. Rev. Cytol.* 132, 1-30.
- 17. Rauch C T and Wilson L (1980). *Biochemistry* 19 : 5550-5557
- 18. Shaul O, Mironov V, Bursens S, Van Montagu M, Inzé D (1996). *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 4868-4872
- 19. Sugimoto K, et. al., (2003) *Plant Cell* 15: 1414-1429
- 20. Vaughn, K., (2006). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, vol 84 (2), 63-71)
- 21. Vaughn K C, Lehnen L P Jr (1991). *Weed Sci* 39: 450-457

Ejemplo 13 – Estudio comparativo sobre la estructura subcelular, la citogénesis y evaluación de la inestabilidad genómica molecular en células únicas producidas con MTI

La estabilidad del genoma en plantas derivadas de cultivos de tejidos ha sido estudiada a nivel citogenético en varias especies de vegetales (Shoyama et. al. 1995; Zorinians et. al. 2003). En lo que respecta a la estabilidad de plantas derivadas de embriones somáticos, los estudios citogenéticos han revelado observaciones contradictorias. Otake et. al. (1993) describieron la duplicación de los cromosomas (de diploide a tetraploide) en el 66,7% y 100% de las plántulas somáticas de *Asparagus officinalis* L. obtenidas en medio solidificado de goma Gellan y medio líquido, respectivamente. En cambio, Mamiya et. al. (2001) no describieron cambios en la ploidía durante la embriogénesis somática en *A. officinalis*. Las auxinas sintéticas como el 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) y el NAA (ácido naftalenacético), utilizadas en los medios de cultivo, han sido consideradas como asociadas a la variación somaclonal (Karp 1989; Phillips et. al. 1994). Asimismo, se ha descrito una reducción de la ploidía en sistemas de embriogénesis somática en zanahoria (Ronchi et. al. 1992) y álamo (Rugh et. al. 1993) en los que se utilizó el 2,4-D. Los inhibidores de la microtubulina (MTI) también aumentaron la ploidía en células vegetales. No obstante, la concentración y la clase de compuesto MTI determinan la naturaleza de la ploidía o la ausencia de la misma. Por ejemplo, la orizalina induce poliploidía nuclear en células TBY2, pero no la propazamida en concentraciones similares (Ehsan et. al., 1999). A semejanza, la exposición prolongada de células de zanahoria en suspensión a la colquicina en concentraciones elevadas induce la poliploidía nuclear. Las células en suspensión de zanahoria manifestaron poliploidía nuclear en cultivos de células únicas tras 14-21 días de tratamientos continuos con colquicinas 1 mM. Con todo, la frecuencia de tales grados de ploidía es mucho menor en los cultivos hasta los 14 días e inferior al 1%, lo que resulta similar al control cuando este se trata de suspensiones cultivadas con auxina (Karp 1989; Phillips et. al. 1994). No obstante, entre los compuestos analizados en este estudio, el etiléster del ácido 4-clor-1,5-difenil-1H-pirazol-3-iloxi)-acético y el 4S,5R-4-nitro-5-(2,3,4-trimetoxifenil) ciclohexeno demostraron su eficiencia en la producción de células únicas con un bajo o nulo porcentaje de ploidía en 14 días de tratamientos continuos.

En cualquier caso, en los procesos de inducción de células únicas a partir de agregados celulares con esos MTI de baja citotoxicidad no se puede descartar la alteración de los patrones de expresión génica de las células únicas con el resultado de un perfil de expresión distinto. Es sabido que la metilación del ADN acarrea consecuencias

indeseables que ocasionan variación somaclonal *in vitro*. Además, los MTI inducen cambios que pueden causar variación molecular o inestabilidades. En tetraploides de *Eragrostis curvula* generados por la duplicación cromosómica inducida por la colquicina, se describió un porcentaje de polimórficos de 1,09% (Mecchia et. al. 2007). La concentración de colquicina con la que se trató a las semillas de *E. curvula* era del 0,05%. Un objetivo del presente estudio fue evaluar la estabilidad genómica en células únicas JTNT1 producidas en presencia del etiléster del ácido 4-clor-1,5-difenil-1H-pirazol-3-iloxi)-acético 1 μ M.

Diversas técnicas de genética molecular como AFLP, RAPD (amplificación rápida de ADN polimórfico) o RFLP (polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción) han sido utilizadas con el fin de identificar y medir el nivel de variación somaclonal en plantas derivadas de cultivos de tejido (Devarumath et. al. 2002; Martins et. al. 2004; Sanchez-Teyer et. al. 2003; Hale and Miller 2005). Pero todas ellas, no importa cuán prolíficas sean (en términos del número de locus que pueden muestrear), sólo permiten analizar un porcentaje muy pequeño del genoma, muy inferior al 1%. Entre las diversas técnicas disponibles, el análisis de AFLP constituye la técnica más versátil, ya que suele permitir analizar 50-100 locus con cada pareja de cebadores. Se cree que estos locus están dispersos más o menos al azar por el genoma y que, por tanto, los AFLP ofrecen la mejor posibilidad de detectar los cambios inducidos por el cultivo. Además, el análisis de AFLP es una de las técnicas moleculares más robustas que existen para la identificación de cultivares y el análisis de la variabilidad (Hale and Miller 2005). Por tales razones, se escogió dicho método de evaluación para este estudio.

Material y métodos.

Iniciación de células únicas de tabaco JTNT1 y recogida de muestras. Las células únicas de tabaco JTNT1 se iniciaron en dos medios distintos, NT1B con sacarosa al 3% (NT1B-Suc) y NT1B con glicerol al 3% (NT1B-Gly) en un ciclo de cultivo de 3,5 días. Los cultivos se iniciaron añadiendo 12,5 ml de cultivos de agregados en suspensión en fase estacionaria mantenidos con los respectivos medios de cultivo y transfiriéndolos a 12,5 ml de medio de cultivo fresco en frascos de agitación de 125 ml que contenían etiléster del ácido 4-clor-1,5-difenil-1H-pirazol-3-iloxi)-acético (difenilpirazol) 1 μ M. Los frascos se cerraron con un tapón de espuma y se cultivaron en un agitador orbital a 130 rpm en oscuridad y a 25-28°C. Los cultivos se subcultivaron cada 3,5 días hasta un periodo de 14 días. Cuatro muestras de los cultivos (células crecidas con Sac/Gli y los cultivos control en medios de Sac/Gli con DMSO al 0,2%) se recogieron cada 3,5 días centrifugando la suspensión a 3000 rpm durante 5 minutos. Las muestras fueron liofilizadas inmediatamente para evitar la oxidación celular con el fin de minimizar cualquier efecto nocivo sobre las muestras después de la recolección. Las células únicas se tiñeron con colorante nuclear Hoechst durante una hora y se observaron al microscopio para detectar eventuales anomalías nucleares hasta el segundo ciclo de cultivo.

Caracterización citológica de células únicas.

Viabilidad celular y pared celular. Las células únicas JTNT1 establecidas se tiñeron con FUN1 (F-7030, Molecular Probes, Invitrogen Inc.), un compuesto utilizado en pruebas de viabilidad de levaduras y que contiene dos sondas fluorescentes. El tercero, Calcofluor White M2R, que tiñe la pared celular, se usó para teñir las células. A las células únicas JTNT1 se les añadieron 20 μ M de FUN1 y el cultivo se incubó a temperatura ambiente durante 20 min añadiendo 1 ml de medio de cultivo fresco para eliminar el exceso de colorante; después se centrifugaron a 3000 rpm y se descartó el sobrenadante. Las células se examinaron y fotografiaron con un microscopio Zeiss ApoTome.

Membrana plasmática. Las células JTNT1 se incubaron con FM4-64 5 μ M (colorante esterílico) durante 5 minutos y se lavaron con medio fresco. El cultivo se centrifugó a 3000 rpm y se le añadió medio fresco. Las células se visualizaron con un microscopio Zeiss ApoTome.

Núcleo. Las células únicas se tiñeron con colorante nuclear Hoechst durante una hora y se observaron con un microscopio Zeiss ApoTome para detectar eventuales anomalías nucleares hasta el segundo ciclo de cultivo. Se utilizó cristal violeta como tinción vital del núcleo para observar la estructura nuclear y caracterizar la ploidía.

Citoesqueleto. Las falotoxinas se unen a los filamentos de actina. Para teñir las células únicas se usó faloidina con Alexa Fluor 488 (A12379 Invitrogen Inc.). Se añadieron 6,6 μ M de Alexa Fluor a las células únicas y tras una incubación de 30 minutos se observaron con el microscopio.

Evaluación molecular de la inestabilidad genómica.

Extracción de ADN. Se extrajo ADN genómico de muestras representativas a los 3,5, 7, 10,5 y 14 días. El ADN se extrajo de los cultivos de Sac y Gli y de los controles (10 muestras) con el protocolo CTAB (véase Anexo-Ejemplo 12) y se cuantificó con el colorante PicoGreen® de Molecular Probes, Inc. (Eugene, Oregon). Todos los pocillos de la placa de microtitulación contenían 90 μ l de dilución 200x de PicoGreen® junto con 10 μ l del ADN que se debe analizar en una dilución 40x o patrones de ADN de Lambda (0, 2,5, 5 y 10 ng/ μ l). Las placas se agitaron brevemente con un agitador de placas convencional, y se leyó la fluorescencia (excitación ~480 nm, emisión ~520 nm) con un fluorómetro Spectra Max GeminiXS de Molecular Devices (Sunnyvale, California). Todas las muestras se cuantificaron por triplicado y la media de los tres resultados se usó en las diluciones posteriores. Las

concentraciones de ADN que se deben analizar se diluyeron hasta la concentración de trabajo de 91 ng/μl con agua estéril.

Análisis de AFLP. Los ensayos de polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP) se llevaron a cabo siguiendo una modificación del protocolo de Vos et. al. (1995), descrita por Bryan et al. (2002). La enzima de restricción EcoRI, que reconoce una diana de 6 pb, se usó conjuntamente con la enzima de restricción MseI, que reconoce una diana de 4 pb. Los cebadores para AFLP de EcoRI con marcado fluorescente y los cebadores para AFLP sin marcar de MseI se pidieron a Applied Biosystems (Foster City, California). El análisis de AFLP se llevó a cabo utilizando el Protocolo de mapeo vegetal por AFLP de Applied Biosystems mediante la reacción de amplificación selectiva con una modificación. Dicha modificación consistía en que las reacciones de digestión/ligamiento se incubaron a 37°C hasta el día siguiente. Los productos amplificados selectivamente se diluyeron 2x con agua desionizada esterilizada. Se combinaron 0,5 μl del producto diluido con 5 μl de tampón de carga (5 μl del patrón de tamaño GeneScan de 500 bp LIZ mezclados con 500 μl de formamida HiDi de ABI). Las muestras se analizaron con un secuenciador AB3730XL DNA Analyzer dotado de una matriz espectral G5-RCT en condiciones estándar. A continuación, los datos se importaron a GeneMapper® versión 4.0 (Applied Biosystems, 2005). A los alelos se les asignó un valor numérico de acuerdo con el tamaño del fragmento de PCR.

Resultados y discusión.

20 Citología y otra evaluación subcelular de células únicas.

Pared celular y división celular. Durante el cultivo de las células se observó crecimiento y diferenciación, y la forma y la estructura de las mismas dependió de la pared celular. Las células únicas manifestaron crecimiento isotrópico con un aumento de tamaño de 3-10 veces y la típica forma circular. Para discernir la estructura de la pared celular se empleó calcoflúor, un blanqueante con afinidad por las celulosas. En las células únicas se observó una pared claramente circular. La pared celular es una estructura dinámica que cumple un importante cometido en la determinación de la morfología de la célula y que interacciona con factores ambientales. A pesar de que la mayoría de las células únicas observadas presentaban una forma esférica, se vieron algunas células en división con placa celular. El aumento del peso seco es otra indicación de división celular en estas células únicas. Al cabo de 14 días de cultivo con MTI, si las células únicas se transfieren a medio sin MTI, vuelven a formar agregados en suspensión, lo cual demuestra la reversibilidad del crecimiento anisotrópico.

Membrana plasmática. La membrana plasmática es uno de los principales componentes de la célula, pues envuelve todo el contenido celular. Delimita la pared celular y constituye el último filtro entre el interior de la célula y el entorno. Los colorantes de estirilo FM anfífilicos son útiles para estudiar la organización de los orgánulos y el tránsito de vesículas en las células eucariotas vivas (Bolte et. al., 2004). Inicialmente, los colorantes FM se ubican en la membrana plasmática (MP), pero después sufren una endocitosis en vacuolas y viajan hasta los endosomas en vesículas. El FM4-64 (un colorante fluorescente selectivo de membrana) tiñe la membrana plasmática pero después se internaliza y alcanza otros orgánulos de la célula (Ueda et. al., 2001). A los 5 minutos de la tinción, se observó fluorescencia en la membrana plasmática de las células únicas, sin que se evidenciara defectos estructurales. En muestras aisladas donde se usó isoxabén 100 nM para eliminar la red de celulosa, el FM4-64 reveló un gran número de vesículas en la superficie. La membrana presentó endocitosis activa al cabo de 5 minutos.

Núcleo. La organización nuclear en la célula vegetal tratada con MTI se considera compleja y se ha demostrado que la poliploidía nuclear es un fenómeno común con las concentraciones elevadas. Se examinaron muestras que habían permanecido expuestas hasta 7 días a concentraciones 1 μM de difenilpirazol y trimetoxifenilciclohexeno. La estructura de los orgánulos nucleares fue analizada con diversas tinciones (Hoechst 3325). Las células JTNT1 única contenían un solo núcleo con un núcleo o dos nucleolos con concentraciones de difenilpirazol y trimetoxifenilciclohexeno de 1 μM en cultivos de 3,5 días. No obstante, las concentraciones elevadas de ambos compuestos condujeron a la formación de células gigantes de hasta 150-300 μM de diámetro que presentaban poliploidía, como se había observado en células de zanahoria cultivadas durante 21 días. Estos resultados apuntan a que la inhibición de la mitosis es el efecto fundamental de dichos compuestos en las altas concentraciones estudiadas. Por ello, no sólo es importante mantener la concentración óptima de MTI, sino también la química del compuesto, que tendrá una función muy selectiva en los túbulos y no la función no selectiva similar a la función de división celular.

Citoesqueleto. El citoesqueleto consta de varias proteínas estructurales como las actinas F y las tubulinas que están implicadas en la integridad estructural de la estructura celular. La dinámica *in vivo* del citoesqueleto se estudió con el conjugado verde fluorescente de actina y Alexa Fluor 488 (A12373), que es más brillante y depende menos del pH. Los microtúbulos y los filamentos de actina son estructuras esenciales para el mantenimiento de la estructura del citoesqueleto en las células vegetales, pues posibilitan su crecimiento y diferenciación y su supervivencia (Kost et. al., 2002). Las células únicas teñidas con faloidina revelaron el citoesqueleto de filamentos de actina, y no se apreció una disposición defectuosa de los filamentos puesto que la estructura celular era normal.

Análisis molecular. El análisis de los AFLP se efectuó con 10 combinaciones de cebadores y EcoRI, una enzima de restricción insensible a la metilación. Dos de las parejas de cebadores no consiguieron amplificar (p6 y p10) y otras

dos parejas no manifestaron diferencias en ninguno de los fragmentos (3p y 8p). El número de fragmentos claramente separados por las parejas de cebadores 1p, 2p, 3p, 4p, 5p, 7p, 8p y 9p alcanzó los 47, 39, 31, 42, 47, 32, 7 y 46, respectivamente. No se detectó ningún polimorfismo de AFLP en ninguna de las muestras tratadas con las combinaciones de cebadores insensibles a la metilación (EcoRI-MseI) excepto en las muestras de JTNT1 cultivadas con glicerol durante 14 días (4º ciclo de subcultivo). En cambio, no se identificaron fragmentos polimórficos en ninguna de las otras muestras cultivadas con glicerol. Las muestras tratadas con sacarosa no evidenciaron polimorfismos para ninguno de los fragmentos con ninguna de las combinaciones de cebadores empleadas. Como cabía esperar, no hubo diferencias en las muestras de células únicas durante al menos 3 ciclos de subcultivo. Pero en el 4º ciclo de subcultivo, el polimorfismo observado en los cultivos con glicerol pudo deberse a la presencia continua del compuesto además de al estrés impuesto por la falta de sacarosa (que aparentemente desencadenó la inestabilidad). La diferencia en el cultivo de células únicas JTNT1 que no mostraba polimorfismo apunta a que la única fuente de carbono disponible, el glicerol, aunque es sabido que estabiliza los microtúbulos, no sería capaz de sostener demasiado la función celular, sobre todo con la presencia prolongada de un inhibidor de microtubulina (MTI). En cualquier caso, los tratamientos de células únicas con difenilpirazol pueden culminar con éxito en el intervalo de concentración estudiado durante al menos 4 ciclos de subcultivo, sin causar problemas de inestabilidad genómica.

Se detectaron 2 polimorfismos con el cebador 5p. El subcultivo 4 presentó una inserción de un fragmento de 130 pb y una delección de un fragmento de 131 pb.

Se determinaron los perfiles de AFLP derivados de la utilización de las enzimas insensibles a la metilación EcoRI y MseI con combinaciones de parejas de cebadores. Todas las muestras recogidas en el cuarto ciclo de subcultivo resultaron monomórficas, mientras que el perfil del glicerol en ese mismo ciclo de subcultivo resultó polimórfico en varios loci.

Tabla 2: Contiene datos de las combinaciones de cebadores empleadas para el análisis de AFLP y los correspondientes números de bandas observados. Sac-X, células únicas en medio NT1B-Sacarosa; Gli-X, células únicas en medio NT1B-Glicerol; Cont-Sac, agregados en suspensión de JTNT1 con sacarosa empleados como control; Cont-Gli, agregados en suspensión de JTNT1 con glicerol empleados como control.

Comb. cebador	Secuencia del cebador (5' a 3')	Cont-Sac	Cont - Gli	Número de bandas polimórficas							
				3,5 d Sac	3,5 d Gli	7 d Sac	7 d Gli	10,5 d Sac	10,5 d Gli	14 d Sac	14 d Gli
<i>Combinación de EcoRI/MseI</i>											
1p	AC/CAG	n/a	n/a	0	0	0	0	0	0	0	5
2p	AGC/CAG	n/a	n/a	0	0	0	0	0	0	0	10
3p	AGC/CTG	n/a	n/a	0	0	0	0	0	0	0	0
4p	ACT/CTT	n/a	n/a	0	0	0	0	0	0	0	5
5p	ACT/CAG	n/a	n/a	0	0	0	0	0	0	0	3
6p	ACT/CTG	n/a	n/a								
7p	ACC/CAG	n/a	n/a	0	0	0	0	0	0	0	4
8p	ACC/CTG	n/a	n/a	0	0	0	0	0	0	0	0
9p	ACA/CAG	n/a	n/a	0	0	0	0	0	0	0	7
10p	ACA/CTG	n/a	n/a								
Total											34

d = días

Evaluación genética molecular de la uniformidad. En este estudio se observaron polimorfismos AFLP (en el 4º ciclo de subcultivo de la suspensión de células únicas cultivadas con glicerol en 9 de las 10 combinaciones de cebadores utilizadas). Toda la variabilidad observada corresponde a los fragmentos generados con EcoRI/MseI. Anteriormente se había descrito un aumento del estado de metilación durante el cultivo de callos de tomate, en comparación con hojas (Smulders et. al. 1995) y plantas de guisante regeneradas en cultivo (Cecchini et. al. 1992). En definitiva, para evaluar la variación generada por la metilación, se puede llevar a cabo una evaluación con la combinación sensible a la metilación PstI/MseI.

Anexo – Ejemplo 13

Extracción de ADN de callos/células en suspensión de tabaco con CTAB

1. Pesar ~25 mg de tejido liofilizado en un tubo Eppendorf de 2 ml.
2. Introducir perlas de acero inoxidable en el tubo que contiene el tejido y pulverizar en un homogeneizador o en un mezclador de pintura durante aprox. 1 minuto (ajustar el homogeneizador a 500 impactos/min). Sacar las perlas y golpear el tubo suavemente para desapelmazar el tejido.

3. Añadir 1 ml de tampón de extracción y golpear con suavidad el tubo para desapelmazar el tejido y que se empape con el tampón, incubar en agitación suave en posición horizontal durante 2 horas a 65 °C. Enfriar a temperatura ambiente (~10 minutos).

Tampón de extracción (250 ml)

Tris-HCl 25 ml
NaCl 29,2 g
Na EDTA 12,5 ml
CTAB 6,25 g
PVP 3,75 g

Agua (enrasar hasta un volumen final de 250 ml)

4. Añadir 0,75 ml de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico 25:24:1 y pH 8 al tampón de extracción y balancear suavemente con la mano durante 5 min. Centrifugar durante 5 minutos a 10.000 rpm para separar las fases. Transferir con cuidado la fase acuosa a un tubo nuevo.
5. Repetir la etapa 4 utilizando cloroformo/octanol 24:1 en lugar de la mezcla de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico.
6. Añadir isopropanol al sobrenadante en un volumen igual y dejar reposar durante 1 hora a temperatura ambiente.
7. Centrifugar los tubos durante 10 minutos a 10.000 rpm y desechar el sobrenadante con cuidado para no verter el sedimento del fondo del tubo.
8. Añadir 0,5 ml de mezcla de etanol al 70% y ARNasa para lavar el sedimento de ADN y centrifugar 1 min a 10.000 rpm. (1:1000 ARNasa/etanol).
9. Decantar con cuidado el sobrenadante y repetir el lavado, esta vez solamente con etanol al 70%. Secar totalmente el sedimento dejando las muestras a temperatura ambiente 3 horas o bien introduciéndolas en un rotavapor durante ~5 minutos.
10. Una vez eliminado todo el alcohol, disolver el sedimento en 0,2 ml de tampón Tris EDTA 1× precalentado a 65°C. Dejar reposar las muestras hasta el día siguiente a temperatura ambiente antes de resuspenderlas completamente.
11. A la mañana siguiente, agitar suavemente los tubos para mezclar su contenido. Procesar las muestras en gel de agarosa para comprobar la degradación y la presencia de ARN y cuantificarlo.

Ejemplo 13 Referencias:

1. Mecchia, M. A., A. Ochogavia, J. P. Selva, N. Laspina, S. Felitti, L. G. Martelotto, G. Spangenberg, V. Echenique, S. C. Pessino, (2007). Genome polymorphisms and gene differential expression in a 'back-and-forth' ploidy-altered series of weeping lovegrass (*Eragrostis curvula*), J. Plant Physiol., 164: 1051-1061.
2. Bryan G J, McLean K, Bradshaw J E, Phillips M, Castelli L, De Jongi W S, Waugh R (2002) Mapping QTL for resistance to the cyst nematode *Globodera pallida* derived from the wild potato species *Solanum vernei*. Theor Appl Genet 105:68-77.
3. Devarumath R M, Nandy S, Rani V, Marimuthu S, Muraleedharan N, Raina S N (2002) RAPD, ISSR and RFLP fingerprints as useful markers to evaluate genetic integrity of micropropagated plants of three diploid and triploid elite tea clones representing *Camellia sinensis* (China type) and *C. assamica* ssp. *assamica* (Assami-India type). Plant Cell Rep 21:166-173.
4. Ehsan, H., Luc Roefa, Erwin Wittersa, Jean-Philippe Reichheldb, Dirk Van Bockstaelec, Dirk Inzéb and Harry Van Onckelena (1999). Indomethacin-induced G1/S phase arrest of the plant cell cycle. FEBS Letters, Volume 458, Issue 3, Pages 349-353.
5. Hale A L, Miller J C (2005) Suitability of AFLP and microsatellite marker analysis for discriminating intracloonal variants of the potato cultivar Russet Norkotah. J Am Soc Hortic Sci 130:624-630
6. Karp A (1989) Can genetic instability be controlled in plant tissue cultures? Int Assoc Plant Tiss Cult News 58:2-11.
7. Mamiya K, Sakamoto Y, Ohnishi N, Hirosawa T (2001) Synthetic seeds of *Asparagus officinalis* L. In: Bhojwani S S, Soh W-Y (eds) Current trends in the embryology of angiosperms. Kluwer, Dordrecht, pp 337-352.
8. Martins M, Sarmiento D, Oliveira M M (2004) Genetic stability of micropropagated almond plantlets, as assessed by RAPD and ISSR markers. Plant Cell Rep 23:492-496.
9. Otake Y, Udagawa A, Saga H, Mii M (1993) Somatic embryogenesis of tetraploid plants from internodal segments of a diploid cultivar of *Asparagus officinalis* L. grown in liquid culture. Plant Sci 94:173-177.

10. Payne R W, Lane P W, Digby P G N, Harding S A, Leech P K, Morgan G W, Todd A D, Thompson R, Tunnicliffe Wilson G, Welham S J, White R P (1993) Genstat 5 Release 3: reference manual. Oxford University Press, Oxford.
- 5 11. hillips R L, Kaeppler S M, Olhoft P (1994) Genetic instability of plant tissue cultures—breakdown of normal controls. Proc Natl Acad Sci USA 91:5222-5226.
12. Ronchi V N, Giorgetti L, Tonelli M, Martini G (1992) Ploidy reduction and genome segregation in cultured carrot cell lines. 1. Prophase chromosome reduction. Plant Cell Tiss Org 30:107-114.
- 10 13. Rugh C L, Parrott W A, Merkle S A (1993) Ploidy variation in embryogenic yellow poplar. In: Proceedings of 22nd Southern Forest Tree Improvement Conference, pp 493.
14. Sanchez-Teyer L F, Quiroz-Figueroa F, Loyola-Vargas V, Infante D (2003) Culture induced variation in plants of *Coffea arabica* cv. Caturra rojo, regenerated by direct and indirect somatic embryogenesis. Mol Biotechnol 23:107-115.
- 15 15. Shoyama Y, Matsushita H, Zhu X X, Kishira H (1995) Somatic embryogenesis in ginseng (*Panax* species). In: Bajaj Y P S (ed) Biotechnology in agriculture and forestry. Springer, Berlin, pp 344-356.
- 20 16. Smulders M J M, Rus-Kortekaas W, Vosman B (1995) Tissue culture induced DNA methylation polymorphisms in repetitive DNA of tomato calli and regenerated plants. Theor Appl Genet 91:1257-1264.
17. Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Vandeleer T, Homes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995) AFLP—a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res 23:4407-4414.
- 25 18. Zorinants S E, Nosov A V, Monforte-Gonzalez M, Mendes-Zeel M, Loyola-Vargas V M (2003) Variation of nuclear DNA content during somatic embryogenesis and plant regeneration of *Coffea arabica* L. using cytophotometry. Plant Sci 164:141-146.
- 30

Ejemplo 14 – Transformación plastidial en células únicas de tabaco BY2

Iniciación de células únicas como preparativo para la transformación plastidial.

35 Se añadieron 4 ml de suspensión de tabaco BY2 (en fase de crecimiento estacionario mantenidas en un ciclo de 7 días) a 26 ml de medio fresco compuesto bien por Medio A [sales LS (PhytoTechnology Laboratories, L689), sacarosa 120 g/l, ácido nicotínico 1 mg/l, piridoxina HCl 1 mg/l, tiamina HCl 10 mg/l y difenilpirazol (DPP) 20 nM] bien por Medio B [sales LS, sacarosa 120 g/l, ácido nicotínico 1 mg/l, piridoxina HCl 1 mg/l, tiamina HCl 10 mg/l, bencilaminopurina (BAP) 2,5 mg/l y DPP 20 nM] en frascos de agitación de 125 ml con tapón de espuma. Los

40 frascos se depositaron durante 7 días en un agitador giratorio a 125 rpm, a oscuras y una temperatura de 28°C.

Experimento de transformación.

45 Los experimentos de transformación se iniciaron diluyendo el cultivo en suspensión de BY2 (cultivado del modo descrito anteriormente) con medio fresco hasta obtener una DO⁶⁵⁰ de 1,0. Para cada diana de transformación se pipetearon 1,5 ml de suspensión diluida en un papel de filtro estéril colocado sobre un aparato de filtración por vacío. Las células en suspensión se esparcieron uniformemente sobre la superficie del papel de filtro. El papel de filtro con las células se transfirió al medio de bombardeo [sales basales MS, vitamina B5, manitol 18,2 g/l, sorbitol 18,2 g/l,

50 sacarosa 30 g/l, BAP 1 mg/l, ácido 1-naftalenacético (NAA) 0,1 mg/l, agar TC 8 g/l (PhytoTechnology Laboratories, A175).

Constructo plasmídico para la transformación plastidial de células únicas.

55 El constructo de ADN utilizado en este ejemplo se designó pDAB3969. Los elementos del constructo resultaron flanqueados por las secuencias trnI y trnA de la unidad 16S del genoma del cloroplasto de tabaco. Dos genes, aphA-6 y nptII, se usaron como marcadores seleccionables regulados por los promotores Prmn más el gen 10 del T7, y PpsbA, respectivamente. El gen 10 del T7 también controla el gen de interés, TurboGFP.

Bombardeo biolístico de células BY2 únicas.

Las células permanecieron en el medio de bombardeo durante 4 horas antes del mismo. Las dianas preparadas fueron bombardeadas con un sistema de suministro Bio-Rad PDS-1000/He. Se prepararon partículas de oro (0,4 µm, Inbio Gold Melbourne, Australia), y el ADN se hizo precipitar sobre su superficie con métodos estándares.

Las placas diana fueron bombardeadas a 1.100 psi, junto con un vacío de 28 pulgadas de mercurio, y una distancia de 9 cm hasta la pantalla de parada. A continuación, las placas se apartaron para un periodo de recuperación de un día. Los papeles de filtro con el tejido se transfirieron entonces a un medio C [sales LS, sacarosa 120 g/l, fosfato potásico monobásico y anhidro 170 mg/l, tiamina-HCl 0,6 mg/l, 2,4-D 0,2 mg/l, agar TC 8 g/l y kanamicina 100 mg/l] y se dejaron en la placa original de selección hasta que aparecieron colonias resistentes. Cuando las colonias resistentes crecieron hasta 4-5 mm de diámetro, se aislaron en placas individuales con medio C gelificado y se agruparon hasta que fueron lo suficientemente grandes para obtener muestras para el análisis por PCR.

Resultados y discusión.

Líneas de BY2 en suspensión se cultivaron en medio A y medio B durante 7 días. Se prepararon cinco placas diana a partir de las células cultivadas en medio A y otras cinco placas de las cultivadas en medio B. Estos dos medios se diseñaron para producir amiloplastos agrandados aumentando el contenido de sacarosa, eliminando la auxina ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), y, en el medio B, añadiendo la citocinina BAP (1, 2). Los amiloplastos agrandados sirvieron como dianas más grandes para la transformación biolística. Ambos medios, que contenían DPP 20 nM, produjeron células únicas. Las placas bombardeadas produjeron 3 colonias resistentes a la kanamicina a partir de las células tratadas con medio A y 2 colonias resistentes a partir de las células tratadas con medio B.

Se extrajeron muestras de cada colonia para los análisis moleculares. El ADN se extrajo con un protocolo DNasey y las alícuotas se analizaron con PCR utilizando los siguientes juegos de cebadores.

Nombre del cebador	Secuencia del cebador	
MAS394	TATGCTGCGTTCGGGAAGGATGAA	juego 2
MAS395	GATTAAAAGAATAAACATCCGATG	
MAS396	TTGCCTAAGAGAGGATGCATCGGA	juego 3
MAS397	TTGTCTGTTGTGCCCCAGTCATAGC	
MAS398	TGATATTGCTGAAGAGCTTGCCGG	juego 4
MAS399	TTGGTGTAGCCCGCCTTGTGATG	
MAS400	TGGAGTACCAGCACGCCTTCAAGC	juego 5
MAS401	GGCTATGCCATCCTAAGGTGCTGC	

Los cebadores amplificaron segmentos del constructo de transformación. El cebador MAS401 apareció insertado en el ADN plastidial del tabaco nativo 83 pares de bases más allá del final del flanco del trnA, lo que demuestra la integración en el genoma plastidial.

Las reacciones de PCR con los juegos de cebadores 2, 3, 4 y 5 produjeron reacciones positivas con las cinco muestras. El ADN de las células en suspensión BY2 de tipo salvaje (sin transformar) y del control de plantas de tabaco no produjo ninguna banda. En suma, los resultados de la PCR indican la presencia de los tres transgenes y su integración en el genoma plastidial.

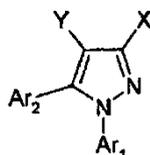
Referencias bibliográficas

- Moffat, Anne (1995) Science Vol. 268, p 658-660.
- Ma; et al.; (2003), Nature Reviews - Genetics Vol. 4 p 794-805.
- Maeda, et al.; (1983) Plant Cell Reports Vol.2, p 179-182.
- Hahne, et al.; (1984), Proc Natl. Acad Sci. USA Vol 81, p5449-5453.
- Klein,etal., (1981);Plants Vol 152,pl05-U4.
- Currier, H.B.; (1957) American Journal of Botany Vol. 44, No. 6 p 478-488.
- Hayashi, et, al. (1986) Plant Physiol. Vol. 82, p 301-306.
- Hayashi, et, al. (1984) Plant Physiol. Vol. 84, p 596-604.
- Bourgin et al (1983) Protoplasts (1983) Eds. Potrykus, Harms, Hinnen, Hutter, King, Shillito (Birkhauser, Basel) pp 43-50.
- Bouton, et al., (2002) The Plant Cell Vol. 14, p 2577-2590.
- Sterling, etal., (2006) PNAS Vol 103, No 13, p 5236-5241.
- Naill, Michael C. (2005) Doctoral Dissertation: UMI Number 3163691, University of Massachusetts, Amherst
- Lee et al. (2004) Plant Molecular Biology Reporter Vol 22, p 259-267.
- Umetsu, et al. (1975) Planta (Berl.) Vol. 125 p 197-200.
- Lewin (1980) Gene Expression p. 11-42

16. Itoh, Takao, (1976) *Plant & Cell Physiol* Vol. 17, p385-398.
17. Albersheim et al (1985) *Oligosaccharins*, *Sci Amer.* Vol. 253, p. 44-50
18. Martin, et. al., (2001) AGRO-078. Publisher: American Chemical Society, CODEN:69FZD4 Journal; Meeting Abstract.
- 5 19. Smith, et al., (2001) 221st ACS National Meeting, San Diego, CA, United States, April 1-5,2001 (2001), AGRO-006. Publisher: American Chemical Society, CODEN: 69FZD4 Journal; Meeting Abstract
20. Henshaw, et al., (1965) *Journal of Experimental Biology* Vol. 17, No 56, p. 362-377.
21. Nagata, T., Nemoto, Y., and Hasezawa, S. (1992) *Int Rev. Cyto* 132, 1-30 22. Hayashi and Yoshida, 85 *PNAS* 2618-22 (1988).
- 10 23. Akashi et al, (1988). *Plant Cell Physiol* 29(6):1053-1062.

REIVINDICACIONES

1. Método para producir una célula vegetal única, aislada, que comprende una pared celular intacta, en el que dicho método comprende el cultivo de células vegetales que comprenden las paredes celulares intactas en un medio que contiene glicerol y un compuesto despolimerizador de tubulina seleccionado de entre el grupo constituido por las dinitroanilinas y un compuesto de conformidad con la fórmula siguiente:



en la que

X = CO₂R, CH₂CO₂R, CH₂CH₂CO₂R, (CH₂)₃CO₂R, OCH₂CO₂R, OCH(CH₃)CO₂R, OC(CH₃)₂CO₂R, CH₂OCH₂CO₂R, CH₂CH(CO₂CH₂CH₃)CO₂R, o OCH(CO₂CH₂CH₃)CO₂R

Y = CN, Cl, Br, F, o NO₂

Ar₁ = fenilo no sustituido, piridina no sustituida, fenilo 1-3 sustituido, piridina 1-3 sustituida, o sustituida con halógeno o CN

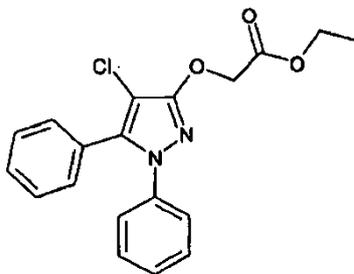
Ar₂ = fenilo no sustituido, piridina no sustituida, fenilo 1-3 sustituido, piridina 1-3 sustituida, o sustituida con halógeno o CN;

y

R = H o éster lineal o ramificado con 1-5 carbonos

2. Método según la reivindicación 1, en el que el compuesto de la fórmula según la reivindicación 1 es el éster etílico del ácido (4-cloro-1,5-difenil-1H-pirazol-3-iloxi)-acético.

3. Método según la reivindicación 1, en el que el compuesto de la fórmula según la reivindicación 1 es



4. Método según la reivindicación 1, en el que dicho medio es un medio líquido y dichas células están en una suspensión.

5. Método según la reivindicación 1, en el que dicho medio contiene colquicina además de un compuesto de la fórmula según la reivindicación 1.

6. Método según la reivindicación 1, en el que dicha célula única, aislada, es seleccionada de entre el grupo constituido por una célula de alga, una célula de dicotiledónea, una célula de monocotiledónea, una célula de planta vascular inferior, o una célula de planta no vascular.

7. Método según la reivindicación 1, en el que dicha célula aislada es transformada posteriormente con un polinucleótido heterólogo, y la célula transformada es seleccionada.

8. Método según la reivindicación 7, en el que dicha etapa de selección utiliza una selección sin marcadores.

9. Método según la reivindicación 7, en el que dicha célula transformada es transgénica o transplastómica.

10. Método según la reivindicación 7, en el que dicha etapa de transformación se lleva a cabo utilizando un método seleccionado de entre el grupo constituido por polietilenglicol, electroporación, biolística y nanopartículas.

11. Método según la reivindicación 1, en el que dicho método es un método de tratamiento de alto rendimiento.
12. Método según la reivindicación 1, en el que dicha célula única, aislada, es seleccionada de entre el grupo
5 constituido por una célula de tabaco, una célula de zanahoria, una célula de maíz, o una célula de estramonio.
13. Método según la reivindicación 1, en el que dicho medio es seleccionado de entre el grupo constituido por un medio de gel y semisólido.

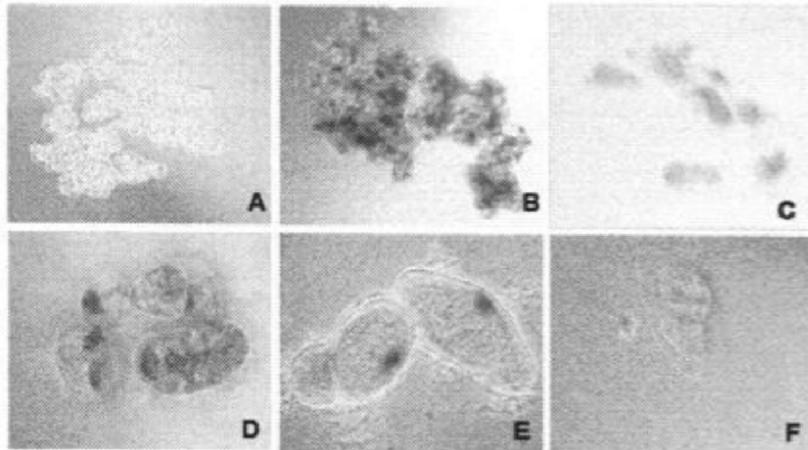


FIG. 1

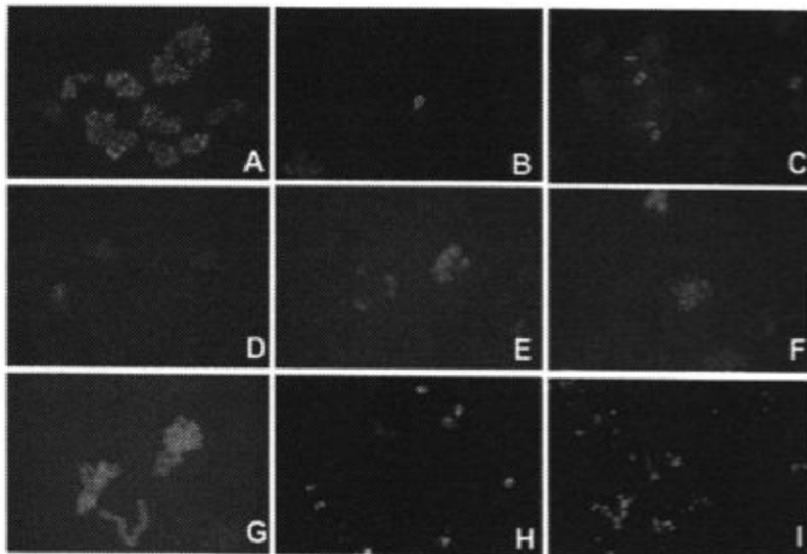


FIG. 2

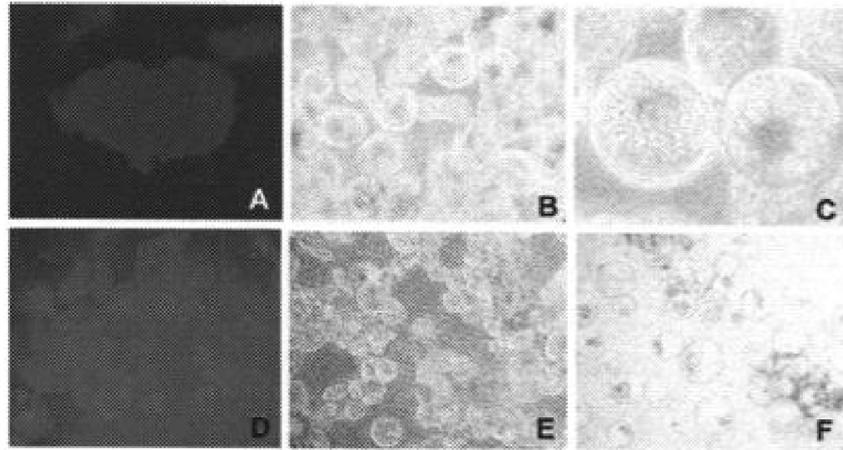


FIG. 3

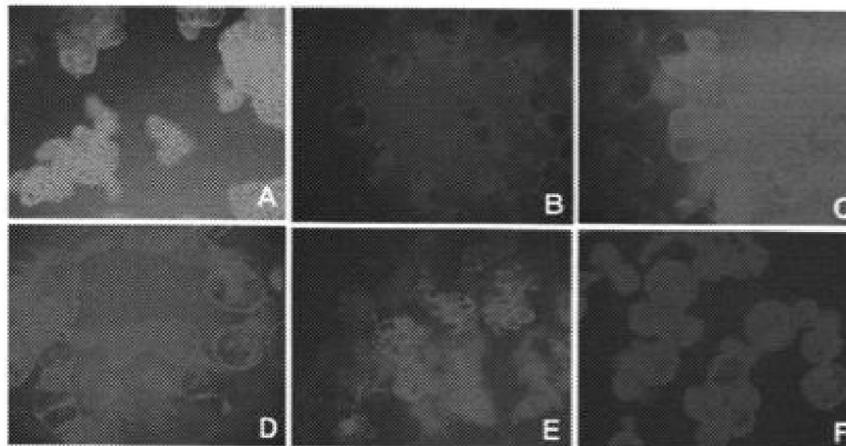


FIG. 4

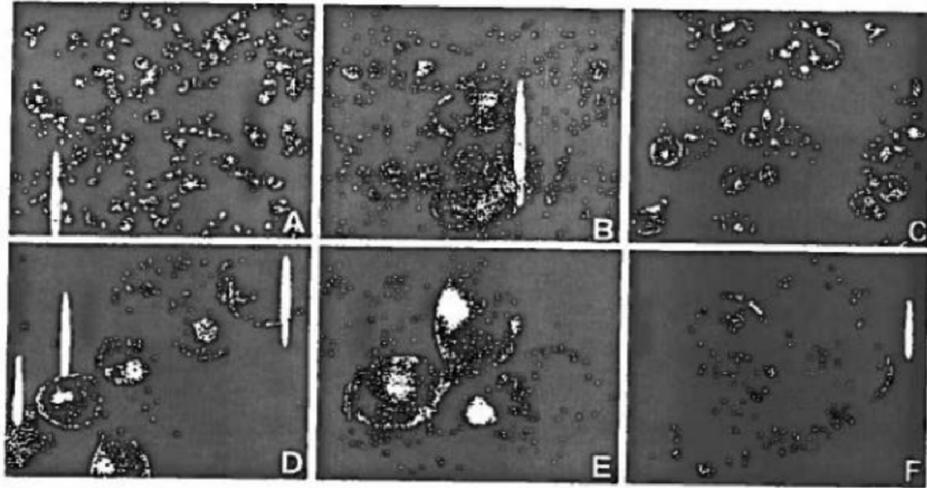


FIG. 5

Efectos de la concentración de DAS-PMTI-1 sobre el crecimiento de células de tabaco BTI-NT1

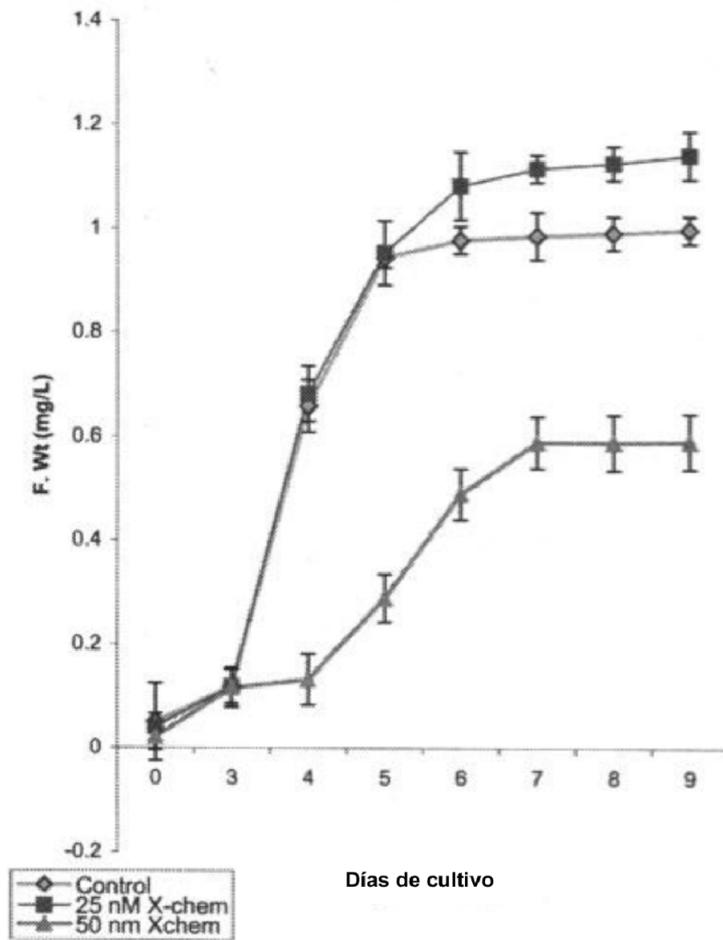


FIG. 6

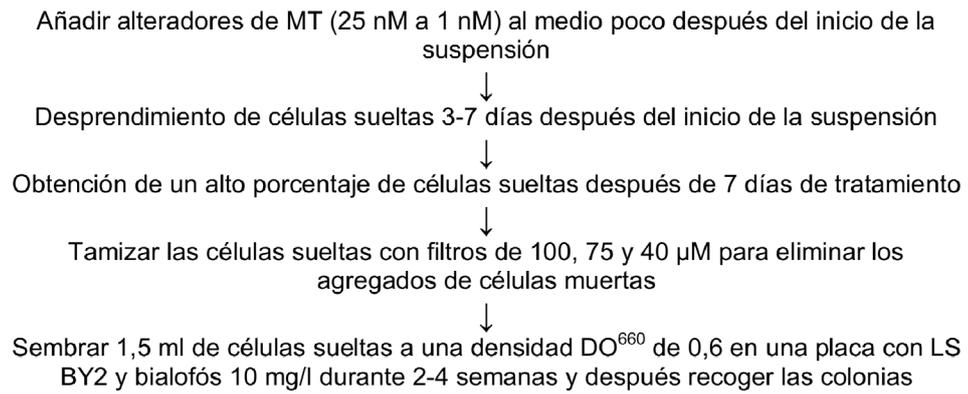


FIG. 7



FIG. 8A



FIG. 8B



FIG. 8C

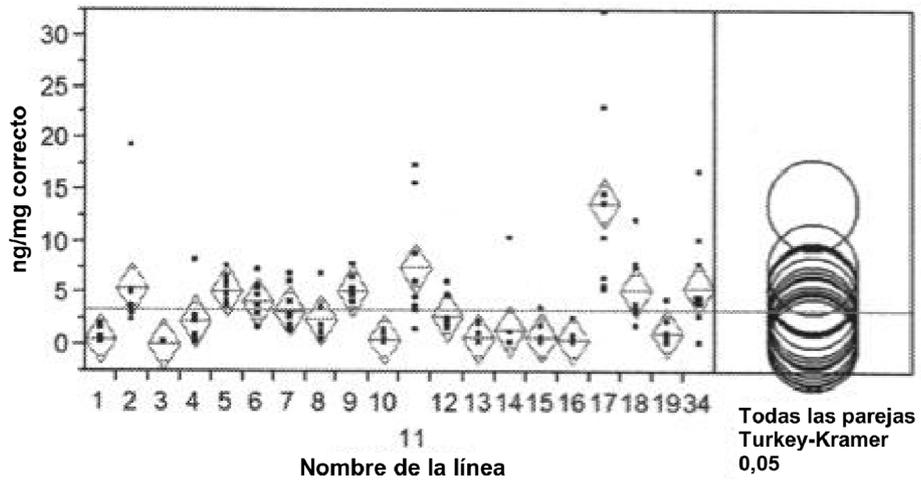


FIG. 9



FIG. 10

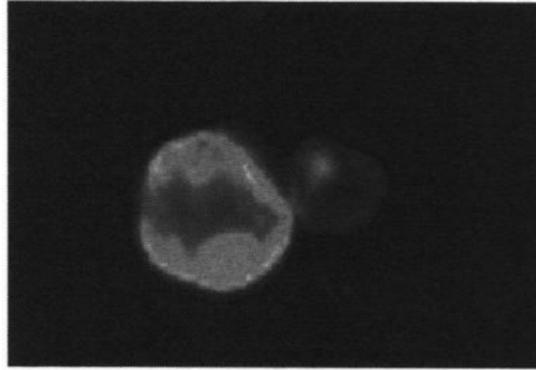


FIG. 11

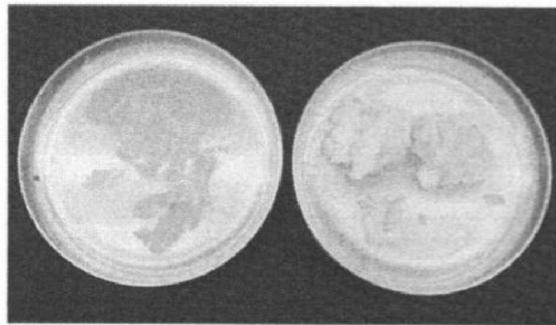


FIG. 12

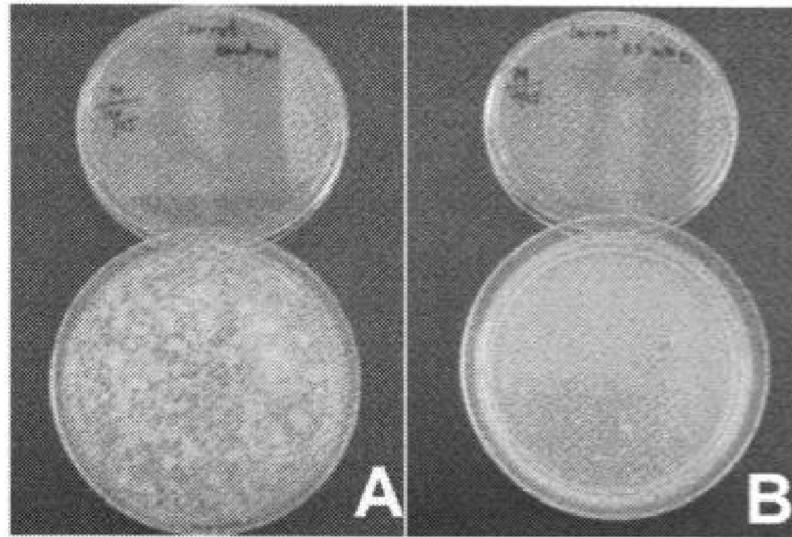


FIG. 13A

FIG. 13B

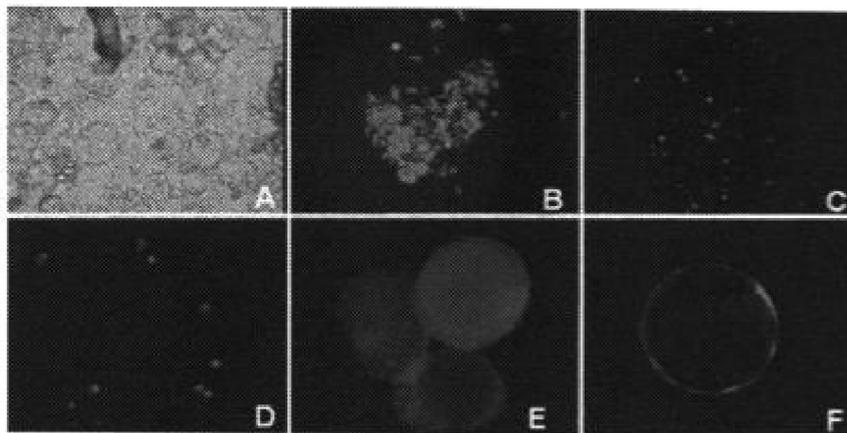


FIG. 14

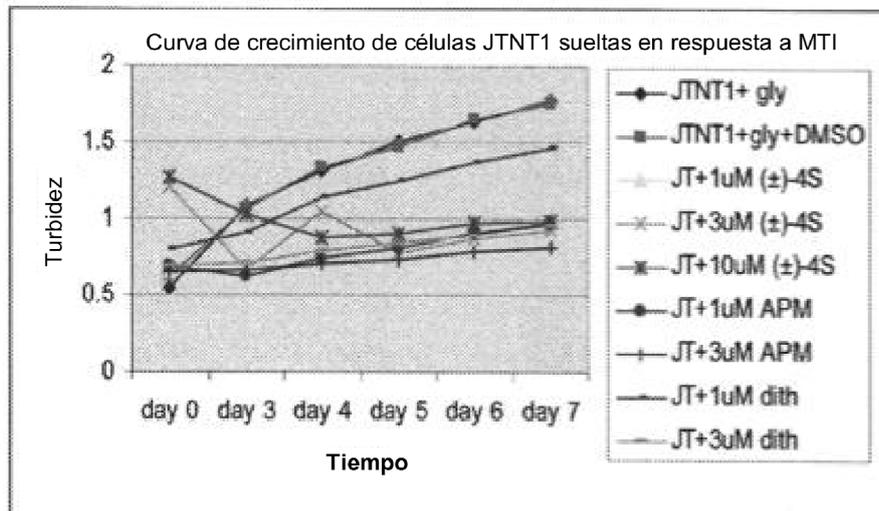


FIG. 15