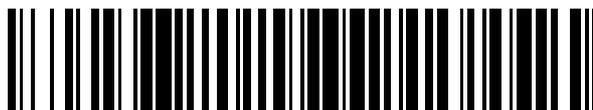


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 522 993**

51 Int. Cl.:

A01H 4/00 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.07.2004 E 04748401 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.10.2014 EP 1722624**

54 Título: **Método para preparar pimientos transgénicos utilizando la inducción del callo**

30 Prioridad:

12.03.2004 KR 2004016722

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

20.11.2014

73 Titular/es:

**NONGWOOBIO (100.0%)
1197-4 MAETAN 2-DONG, PALDAL-GU
SUWON-SI GYEONGGI-DO 443-372, KR**

72 Inventor/es:

**HARN, CHEE HARK;
LEE, YUN HEE;
KIM, JU YEON;
KIM, HYO SOON;
JUNG, MIN;
CHOI, SOON HO y
YANG, SEUNG GYUN**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 522 993 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para preparar pimientos transgénicos utilizando la inducción del callo

5 CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a un método para producir plantas de pimiento transgénicas y, más particularmente, a un método para producir en masa plantas de pimiento transgénicas utilizando la inducción del callo, estando caracterizado el método por las etapas de: pre-cultivar explantes de pimiento; co-cultivar los explantes de pimiento pre-cultivados con *Agrobacterium* en los que se ha introducido un gen diana; seleccionar el callo; y formar brotes.

TÉCNICA DE ANTECEDENTES

15 El pimiento es uno de los principales cultivos en el mundo y es ampliamente utilizado como alimento o condimento. Además, el pimiento se utiliza en tintes industriales, en particular se utiliza como materia prima principal de lápices de labios cosméticos. La cantidad anual de ventas totales de productos del pimiento en Corea es de aproximadamente dos trillones de won en moneda coreana y forma el mercado de semillas más grande de Corea. El pimiento es el cultivo más adecuado para ser capaz de crear un alto valor añadido en relación con el uso de biotecnología.

La primera puerta de entrada a utilizar el pimiento en biotecnología es llevar a cabo la transformación. Sin embargo, el pimiento se conoce como un cultivo que es muy difícil de ser transformado debido a las dos razones siguientes. En primer lugar, la probabilidad de éxito de la regeneración en plantas de pimiento transgénicos varía definitivamente en función de las líneas de semillas (Christopher, T *et al.*, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 46: 245,1996;. Kim, JY *et al.*, *J. Plant Biotechnol.*, 4: 129, 2002). Dado que una alta tasa de transformación sólo se obtiene en líneas de semillas con una elevada tasa de regeneración, es muy difícil transformar líneas de semillas con una baja tasa de regeneración. En segundo lugar, la tasa de infección de *Agrobacterium* varía dependiendo de los cultivos. Se infiere que los cultivos, que son difíciles de transformar, son el caso en el que el pilus de *Agrobacterium* es impermeable a las células de tejido de explantes o no son inoculados lo suficientemente a las células de tejido.

Los casos de éxito en la transformación del pimiento siguen siendo raros en todo el mundo. Un método para transformar plantas de pimiento utilizando *Agrobacterium* fue reseñado por primera vez en EE.UU. (patente de EE.UU. N° 5.262.316), y también fue estudiado por Sung-Han Son, et al. en Corea (Registro de patente coreana N° 344573). Sin embargo, estos métodos tienen desventajas, debido a que muestran una muy baja tasa de transformación, no son reproducibles y hacen que sea difícil producir en masa plantas de pimiento transgénicas.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

40 Durante extensos estudios realizados por los autores de la invención para producir en masa plantas de pimiento transgénicas con alta eficiencia, éstos han encontrado que, cuando los explantes de pimiento son regenerados mediante pre-cultivo en el medio de inducción del callo, seguido de co-cultivo con *Agrobacterium*, se puede obtener fácilmente pimiento transgénico, completando con ello la presente invención.

45 Por consiguiente, un objeto principal de la presente invención es proporcionar un método para producir en masa plantas de pimiento transgénicas, estando el método caracterizado por pre-cultivar explantes de pimiento en medio de inducción del callo, seguido de co-cultivo con *Agrobacterium*.

50 Para lograr el objeto anterior, la presente invención proporciona un método para producir en masa plantas de pimiento transgénicas, comprendiendo el método las etapas de: (a) pre-cultivar explantes de pimiento en un medio de inducción del callo; (b) co-cultivar los explantes pre-cultivados con *Agrobacterium* en los que se ha introducido un gen diana; (c) cultivar los explantes co-cultivados en un medio de selección a fin de formar un callo y seleccionar el callo formado; y (d) cortar el callo y cultivar el callo cortado en un medio de inducción de brotes con el fin de formar brotes.

Tal como se utiliza en esta memoria, el término "explantes" se refiere a segmentos de tejido extirpados de plantas, que incluyen cotiledones o hipocótilos.

En lo que sigue se describirá en detalle la presente invención.

El método de la presente invención comprende las siguientes etapas: (a) el precultivo de explantes de pimiento; (b) la transformación (co-cultivo con *Agrobacterium* en el que se ha introducido un gen diana), (c) la selección del callo; y (d) la formación de brotes. Además, el método de la invención puede comprender adicionalmente las etapas de formación de la raíz y la adaptación al suelo. En particular, el método de la invención se caracteriza por que los explantes de pimiento se pre-cultivan en un medio de inducción del callo y se transforman con el fin de formar artificialmente el callo, y la regeneración de plantas se induce a partir del callo formado. Se describirá ahora en detalle cada una de las etapas del método de la invención.

(a) Pre-cultivo de explantes para la inducción del callo

En el método de la invención, explantes de pimiento se pre-cultivan primero en medio de inducción del callo. En este momento, los explantes son dañados preferiblemente con el fin de fomentar la inducción del callo. Además, como explantes de pimiento, se pueden utilizar en la presente invención cotiledones o hipocótilos. Se utilizan con mayor preferencia los cotiledones obtenidos mediante la esterilización y el lavado de semillas de pimiento y la germinación de las semillas lavadas en medio MS.

El medio de inducción del callo que se utiliza en la etapa de pre-cultivo del método de la invención se refiere a un medio de cultivo vegetal (por ejemplo, medio MS y medio ½ MS) que contiene una hormona vegetal que induce el callo. La hormona vegetal que se puede utilizar para la inducción del callo es una seleccionada del grupo que consiste en zeatina, ácido 2,4-diclorofenoxi-acético (2,4-D), ácido indol-3-acético (IAA), ácido naftaleno-acético (NAA) y bencilaminopurina (BA).

Cada una de las hormonas vegetales se añade en la siguiente concentración: 0,01-5 mg/l de 2,4-D, 0,01-5 mg/l de IAA, 0,01-5 mg/l de zeatina, 0,01-5 mg/l de NAA y 0,01-5 mg/l de BA. Lo más preferiblemente, se puede utilizar 1 mg/l de 2,4-D o 1 mg/l de IAA. También se puede utilizar una mezcla de las hormonas antes mencionadas. Preferiblemente, se puede utilizar una mezcla de 0,01-2 mg/l de zeatina con uno seleccionado del grupo que consiste en 0,1-5 mg/l de 2,4-D, 0,1-5 mg/l de IAA y 0,01-2 mg/l de NAA. La etapa de pre-cultivo se realiza preferiblemente a 22-28° C durante 20-60 horas. Durante la etapa de pre-cultivo, el callo se induce en las partes dañadas de los explantes por la influencia de la hormona.

(b) Transformación (co-cultivo con *Agrobacterium* en el que se ha introducido un gen diana)

Con el fin de transformar los explantes que han sido pre-cultivados en el medio de inducción del callo, los explantes pre-cultivados se co-cultivan con *Agrobacterium*. Antes del co-cultivo, un gen diana a ser introducido en plantas de pimiento necesita ser introducido en *Agrobacterium*. La transformación de *Agrobacterium* puede realizarse por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar el método de congelación-descongelación (Glevin *et al.*, *Plant molecular biology*. Kluwer Academic Publishers A3/7, 1988). Después de ello, *Agrobacterium*, en el que se ha introducido el gen diana, se inocula a los explantes de pimiento pre-cultivados durante 10-20 minutos y luego se co-cultiva. En este momento, el mismo medio que el medio de inducción del callo utilizado en la etapa (a) se utiliza preferiblemente como medio de co-cultivo. Además de ello, la etapa de co-cultivo se realiza preferiblemente a 22-28°C durante 40-80 horas.

(c) Selección del callo

Los explantes de pimiento que han sido co-cultivados con *Agrobacterium* se cultivan en medio de selección para seleccionar el callo transgénico. El medio de selección contiene preferiblemente no sólo un antibiótico para la selección del callo transgénico, sino también zeatina y IAA para la inducción del desarrollo del callo. Como sustituto para IAA, también se puede utilizar NAA. Además, el antibiótico utilizado en la selección del callo es preferiblemente un antibiótico correspondiente a un gen resistente a los antibióticos presente en un vector recombinante introducido en *Agrobacterium*. También, zeatina se utiliza preferiblemente a una concentración de 0,1-5 mg/l, cada uno de IAA y NAA se utiliza preferiblemente a una concentración de 0,01-1 mg/l. Más preferiblemente, se puede utilizar una mezcla de 2 mg/l de zeatina y 0,3 mg/l de IAA. 4-5 semanas después de que los explantes co-cultivados con *Agrobacterium* se transfieren al medio de selección, el callo comienza a crecer. Después, el callo se cultiva preferiblemente durante 5-8 semanas adicionales.

(d) Formación de brotes

El callo transformado obtenido en la etapa (c) se corta en trozos pequeños. Los trozos de callo cortados se transfieren a un medio de inducción de brotes para inducir la formación de los brotes. El medio de inducción de brotes contiene preferiblemente zeatina sola o una mezcla de zeatina y uno de IAA y NAA. Zeatina se utiliza preferiblemente a una concentración de 0,5-10 mg/l, y cada uno de IAA y NAA se utiliza preferiblemente a una concentración de 0,01-0,2 mg/l. Más preferiblemente, se puede utilizar una mezcla de 2 mg/l de zeatina y 0,01 mg/l de IAA. Un mes más tarde el callo se transfiere al medio de inducción de brotes, se forman brotes. Después, los brotes se cultivan preferiblemente en el mismo medio durante un periodo adicional de aproximadamente dos meses, a fin de alargar los brotes.

10 (e) Formación de la raíz y adaptación al suelo

Los brotes alargados se transfieren y se cultivan en medio de inducción de la raíz. El medio de inducción de la raíz no contiene preferiblemente hormona vegetal alguna. Preferiblemente, como medio de inducción de la raíz se puede utilizar un medio basal MS que contiene una pequeña cantidad de antibióticos. Aproximadamente 4-5 semanas después de la transferencia al medio de inducción de la raíz, se forman raíces. Cuando las raíces crecen aproximadamente 4-10 cm, el medio se retira de forma clara y las raíces se plantan en macetas.

El método de la invención para la transformación de plantas de pimiento tiene las siguientes ventajas.

20 En primer lugar, inducción directa de brotes a partir de explantes de pimiento de acuerdo con el método de transformación mediada por *Agrobacterium* anterior proporciona poca o ninguna transformación, mientras que el método de la invención muestra notablemente una elevada tasa de transformación.

25 En segundo lugar, el método de la invención no se limita a determinadas líneas de plantas de pimiento (línea no específica). Así, el método de la invención puede transformar de manera estable diversas líneas de plantas de pimiento.

30 En tercer lugar, el método de la invención puede producir en masa plantas transgénicas en un período de tiempo más corto que el del método anterior, ya que la hormona de inducción del callo se añade en la etapa de pre-cultivo de los explantes con el fin de acortar el tiempo de inducción del callo.

35 Por consiguiente, diversos genes útiles tales como genes implicados en mecanismos de defensa de la planta o genes implicados en la biosíntesis de metabolitos útiles, se pueden introducir en plantas de pimiento por el método de transformación de la invención, de modo que se puede producir en masa con una alta eficacia una diversidad de plantas de pimiento transgénicos funcionales.

40 Un ejemplo de los genes implicados en los mecanismos de defensa de las plantas, que se pueden utilizar en la presente invención, son preferiblemente genes que codifican una proteína seleccionada del grupo que consiste en proteína inactivadora de ribosomas (RIP – siglas en inglés), ácido jasmónico carboxilo metiltransferasa, trehalosa sintasa, defensina 1.2 de plantas, tionina sintasa, glucanasa, quitinasa, fenilalanina amonio liasa, chalcona sintasa, glutatión-S-transferasa, antranilato sintasa, proteína de almacenamiento, calmodulina, triptófano sintetasa, inhibidor de proteinasa II, óxido nítrico sintasa, cistemina, ácido graso peroxidasa, aleno óxido sintasa, factor de transcripción 1 de la interacción pimiento-PMMV (PPI1), factor de transcripción de dominio WRKY, proteína de respuesta a patógenos y la proteína de la envuelta del virus, pero no se limitan a los mismos. Ejemplos de los genes que codifican las proteínas de la envuelta del virus incluyen genes *TMV-CP*, *CMV-CP* y *PepMoV-CP*.

45 Además, los genes implicados en la biosíntesis de metabolitos útiles se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en genes implicados en la biosíntesis de taninos, sinapina, saponina, alicina, espinosina, ácido cinámico, flavonoides, terpenoides, catequina, vitaminas, penicilina, indol, insulina, prostaglandinas, taxol, alisol, ricina, cartenoide y capsicina, pero no se limitan a los mismos.

55 El método de transformación de la invención puede ser aplicado a todos los pimientos del género *Capsicum*, y preferiblemente *Capsicum annuum* L. Ejemplos de *Capsicum annuum* L. incluyen el pimiento guindilla (*Capsicum annuum* L. var. *acuminatum*), pimiento dulce o campana (*Capsicum annuum* L. var. *grossum*), pimiento cónico (*Capsicum annuum* L. var. *conoides*), pimiento cereza (*Capsicum annuum* L. var. *cerasiforme*), pimiento rojo de racimo (*Capsicum annuum* L. var. *fasciculatum*), pimiento largo (*Capsicum annuum* L. var. *longum*), y así sucesivamente.

En una realización de la presente invención, los explantes de pimiento se pre-cultivaron en un medio que contenía

una mezcla de zeatina y NAA o una mezcla de zeatina e IAA, y luego se transformaron con *Agrobacterium* en el que se ha introducido un gen *TMV-CP* o un gen *PPI1*.

Después de ello, a diferencia de un caso general donde los brotes se forman directamente a partir de partes dañadas de explantes transformados durante un proceso de regeneración del pimiento (formación directa de brotes), se observó que había un caso en el que el callo había sido inducido en partes dañadas, a partir del cual se formaron entonces los brotes (formación indirecta de brotes; formación de brotes mediada por el callo) (véase la **FIG. 1** y la **FIG. 2**).

Se examinaron las tasas de transformación en los dos casos anteriores y los resultados demostraron que, en el caso de la formación directa de brotes, la frecuencia de la formación directa de brotes era elevada, pero la frecuencia de la formación de raíces a partir de brotes era baja y ninguno de los brotes individuales se habían transformado (véase la **Tabla 1** y la **Tabla 3**). Por otro lado, en el caso de la formación indirecta de brotes mediada por el callo, aunque la frecuencia de inducción del callo de las partes dañadas de los explantes era muy baja, la frecuencia de la formación de brotes a partir del callo y la formación de la raíz a partir de los brotes eran altas (véase la **Tabla 2**). Además, se examinaron las tasas de transformación de los brotes formados a partir de los callos y los resultados demostraron que las tasas de transformación eran 0,19% para el pimiento de la línea P915 y 0,03% (3/37.500) para el pimiento de la línea P409 (véase la **Tabla 4**). A partir de estos resultados, los autores de la presente invención pudieron encontrar que una se alcanza una elevada eficacia de transformación del pimiento en el caso en que la formación de brotes sea inducida a partir del callo transformado. Esto se encontró por primera vez en la presente invención.

Por lo tanto, la presente invención proporciona plantas de pimiento transgénicas transformadas con un gen que codifica una proteína PPI1, así como plantas de pimiento resistentes al TMV, transformadas con un gen que codifica TMV-CP.

En otra realización de la presente invención, con el fin de inducir de manera más eficaz el callo a partir de explantes de pimiento, los explantes de pimiento se pre-cultivaron en un medio que contenía una o más diversas hormonas vegetales y luego se co-cultivaron con *Agrobacterium* en el que se había introducido un gen GFP. En este momento, 2,4-D, IAA o una mezcla de zeatina y 2,4-D se utilizaron como la hormona vegetal, respectivamente. Después de ello, los explantes transformados se cultivaron en medio de selección para seleccionar el callo transgénico (véase la **FIG. 3** y la **FIG. 4**). El callo se cortó en trozos pequeños y luego se transfirió a medio de inducción de brotes para formar brotes (véase la **FIG. 5**). Después de esto, las raíces fueron inducidas a partir de los brotes y luego se regeneraron en plantas enteras a través de una etapa de adaptación (véase la **FIG. 6**).

Se examinaron las tasas de inducción del callo en el caso en que los explantes de pimiento han sido pre-cultivados en el medio que contiene una mezcla de 2,4-D y zeatina, 2,4-D o IAA. Los resultados demostraron que el callo se indujo generalmente a una tasa de aproximadamente 13%, aunque hay una ligera diferencia en la tasa de inducción del callo entre líneas de pimiento (véase la **Tabla 6**). Esta tasa de inducción de callo es aproximadamente 10 veces mayor que la del caso en que los explantes fueron pre-cultivados en un medio que contenía zeatina y NAA (o IAA). Además, la tasa de transformación de los brotes formados a partir de callo era de aproximadamente 1%, basado en el número total de explantes utilizados en la transformación (véase la **FIG. 7**). Este valor es aproximadamente 5 veces mayor que la tasa de transformación de brotes mediada por el callo (0,19%) del caso en el que los explantes fueron pre-cultivados en un medio que contenía zeatina y NAA (o IAA). Además, en el caso en el que los explantes se pre-cultivaron en el medio que contenía la mezcla de 2,4-D y zeatina, 2,4-D o IAA, se encontró que todos los 8 pimientos de la línea utilizados en un ensayo se habían transformado de forma estable (véase la **Tabla 6** y la **FIG. 7** a la **FIG. 9**). El método de la invención tal como se describe arriba permitió que el tiempo de transformación fuese acortado en comparación con los métodos anteriores al pre-cultivar los explantes de pimiento en el medio de inducción del callo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **FIG. 1** es una fotografía que muestra cada una de las etapas de un proceso de regeneración mediante la formación directa de brotes. Las líneas de puntos representan las partes cortadas para el cultivo en una etapa subsiguiente (A: formación directa de brotes; B: formación de múltiples brotes; C: alargamiento de múltiples brotes; D: alargamiento de un solo brote a partir de múltiples brotes; y E: formación de raíces).

La **FIG. 2** es una fotografía que muestra cada una de las etapas de un proceso de regeneración mediante la formación indirecta de brotes mediada por el callo. Las líneas de puntos representan las partes cortadas para el

cultivo en una etapa subsiguiente (A: formación del callo; B: desarrollo del callo; C: formación de brotes; D: alargamiento de un solo brote; y E: formación de raíces)

5 La **FIG. 3** es una fotografía que muestra el callo (representada por la flecha) desarrollado en medio de selección durante dos semanas de acuerdo con la presente invención. La **FIG. 4** muestra un estado en el que el callo transformado por el método de la invención expresa continuamente GFP durante su crecimiento. La **FIG. 5** muestra un proceso de formación de brotes a partir de callos transformados por el método de la invención.

10 La **FIG. 6** muestra el aspecto de una planta de pimiento transgénico de acuerdo con la presente invención, un mes después de haber sido plantada en una maceta después de la formación de la raíz.

15 La **FIG. 7** muestra los resultados de la amplificación por PCR de ADN genómico extraído de callos que expresan GFP (pistas 1-9) y a partir de callos que no expresan GFP (pistas 10-15) (+: clon GFP; y M: marcador del peso molecular).

20 La **FIG. 8** muestra los resultados de la amplificación por PCR de ADN genómico extraído de las hojas de las plántulas regeneradas a partir de callos que expresan GFP (+: clon GFP; M: marcador del peso molecular; pistas 1-9: línea P410; pistas 10-15: línea P915; pistas 16-21: línea P318; pistas 22-28: línea P319; y -: planta no transgénica).

25 La **FIG. 9** muestra los resultados del análisis de transferencia Southern en ADNs genómicos obtenidos a partir de plantas de pimiento transgénicas producidas por el método de la invención (pistas 1-2: línea P915; pistas 3-6: línea P318; pistas 7-14: línea P319; y pista 15 : planta no transgénica).

25 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención se describirá a continuación con más detalle mediante ejemplos. Sin embargo, resultará obvio para una persona experta en la técnica que la presente invención no está limitada a o por los ejemplos.

30 **Ejemplo 1: Producción de plantas de pimiento transformadas con el gen *TMV-CP* o el gen *PPI1***

1-1: Preparación y pre-cultivo de explantes

35 En un ensayo se utilizaron cuatro líneas endogámicas (P915, P409, P410 y P101) de semillas de pimiento guindilla (Nongwoo Bio Co., Corea). La superficie de las semillas se esterilizó con etanol al 95% durante 30 segundos y luego con lejía al 50% (Yuhanrocks, Yuhan Corp., Corea) durante 10 minutos. Después, las semillas se lavaron tres veces con agua esterilizada. Las semillas esterilizadas se transfirieron a medio ½ MS (½ MS, sacarosa al 1,5%, agar al 0,8%, pH 5,8) y se germinaron bajo condiciones de luz a 25°C. Los cotiledones e hipocótilos fueron extirpados de las plantas de 8-10 días, y se utilizaron como explantes. Aproximadamente 190.000 explantes fueron dañados con un cuchillo, después de lo cual se transfirieron a medio de pre-cultivo (medio basal MS que contiene 2 mg/l de zeatina y 0,05 mg/l de NAA o 0,1 mg/l de IAA) y se cultivaron bajo condiciones de luz a 22-28°C durante 2-36 horas.

45 1-2: Co-cultivo con *Agrobacterium*

50 Un fragmento de ADN que codifica un gen *TMV-CP* (GenBank N° de acceso: L35074; Park *et al.*, 1997) o un gen *PPI1* (GenBank N° de acceso: AF430372; Lee *et al.*, 2002) se insertó en un vector pCAMBIA 2300 (CAMBIA, Australia). El vector recombinante resultante se introdujo en una cepa LBA4404 o cepa EHA105 de *Agrobacterium*. La cepa de *Agrobacterium* transformada se cultivó en un medio YEP que contenía 50 mg/l de kanamicina, 50 mg/l rifampicina y 100 µM de acetosiringona. El caldo de cultivo se centrifugó y después se diluyó en medio basal MS hasta una DO₆₀₀ de 0,3-0,5. La suspensión de cultivo se mezcló con un medio basal MS que contenía 100 µM de acetosiringona, y la mezcla se inoculó a los explantes pre-cultivados en el Ejemplo 1-1 de arriba durante 10-20 minutos. Después de ello, los explantes se co-cultivaron con la cepa de *Agrobacterium* en un medio con la misma composición que la del medio de pre-cultivo utilizado en el Ejemplo 1-1 de antes, en condiciones de oscuridad durante 38 - 96 horas. Los explantes co-cultivadas con la cepa de *Agrobacterium* se lavaron tres veces con un medio líquido ½ MS que contenía 500 ~ 800 mg/l de cefotaxima o liliacilina.

1-3: Formación de brotes

Con el fin de seleccionar plantas transgénicas, los explantes co-cultivados con la cepa de *Agrobacterium* en el Ejemplo 1-2 de antes se cultivaron en un medio basal MS (medio de selección) que contenía 2 mg/l de zeatina, 0,05 mg/l de NAA (o 0,1 mg/l de IAA), 80-100 mg/l de kanamicina y 300 mg/l de cefotaxima (o lilacilina) durante 6-8 semanas. 4-5 semanas después del cultivo, se pudo observar que se formaba tejido similar al callo alrededor de las partes dañadas de varios explantes. Después de ello, con el fin de inducir los brotes, los explantes se transfirieron a un medio basal MS (medio de alargamiento) que contenía 2 mg/l de zeatina, 0,01 mg/l de NAA (o 0,01 mg/l de IAA), 60-100 mg/l de kanamicina y 300 mg/l de cefotaxima y se cultivaron durante 7-10 semanas.

1-4: Formación de la raíz y adaptación al suelo

Los brotes alargados fueron transferidos a un medio basal MS (medio de inducción de la raíz) que contenía 20-30 mg/l de kanamicina y 200 mg/l de cefotaxima y se cultivaron durante 6-8 semanas. Las plantas regeneradas se transfirieron a una maceta desmontable y se cultivaron bajo una condición de luz durante 16 h a 25 C durante 2 semanas.

En el ensayo anterior se pudo confirmar que aparecieron dos patrones de formación de brotes a partir de los explantes. Un patrón es un patrón general en el que los brotes (o múltiples brotes) se forman directamente a partir de las partes dañadas de los explantes (formación directa de brotes), y el otro patrón es uno en el que se forma tejido de callo alrededor de las partes dañadas de los explantes y, a continuación, se forman brotes a partir de tejido del callo (formación indirecta de brotes; formación de brotes mediada por el callo).

El proceso de regeneración mediante la formación directa de brotes se observó en la mayoría de los casos. Como se muestra en la **FIG. 1**, el proceso de regeneración consistía en 5 etapas, incluyendo la formación de brotes, la formación de múltiples brotes, el alargamiento de múltiples brotes, el alargamiento de un solo brote, y la formación de raíces. Por otro lado, muy raramente se observó el proceso de regeneración mediante la formación indirecta de brotes mediada por el callo se observó, y se piensa que esto se debe a que el callo no es fácil de ser inducido de forma natural a partir de las partes dañadas de cotiledones. Como se muestra en la **FIG. 2**, el proceso de regeneración mediante la formación indirecta de brotes consistía en cinco etapas que incluían la formación de callos, el desarrollo de callos, la formación de brotes, el alargamiento de un solo brote y la formación de raíces.

Ejemplo 2: Examen de la frecuencia de la formación de brotes

2-1: Frecuencia de la formación directa de brotes

Un total de 151.700 explantes obtenidos a partir de cuatro líneas de plantas de pimiento se transformaron de la misma manera que en el Ejemplo 1, después de lo cual se examinó la frecuencia de la formación directa de brotes a partir de las partes dañadas de los explantes. La frecuencia de la formación directa de brotes sobre el medio de inducción de brotes era de 5,3% (8.089/151.700) (véase la **Tabla 1**). Sin embargo, la tasa de brotes que sobrevivieron en el medio de inducción de raíces era de 17,4% (1.407/8.089). Los valores numéricos para cada una de las líneas de plantas recogidos en las **Tablas 1 y 2** representan el total de los resultados para cada una de las hormonas utilizadas.

Tabla 1: Frecuencia de la formación directa de brotes

Genes	Número de explantes				Número de brotes				Número de brotes con raíz			
	P915	P409	P410	P101	P915	P409	P410	P101	P915	P409	P410	P101
<i>TMV-CP</i>	30.512	26.039	24.107	21.983	2.106	1.017	1.697	628	392	156	311	49
<i>PPI1</i>	14.413	14.080	7.488	13.078	1.024	587	720	310	186	103	176	34
Subtotal	44.925	40.119	31.595	35.061	3.130	1.604	2.417	938	578	259	487	83
Total	151.700				8.089				1.407			

2-2: Frecuencia de la formación indirecta de brotes mediada por el callo

Un total de 37.500 explantes obtenidos de cuatro líneas de plantas de pimiento se transformaron de la misma manera que en el Ejemplo 1 anterior, después de lo cual se examinó la frecuencia de la formación de brotes mediada por el callo. La frecuencia de la formación de callos a partir de los explantes estaba en un nivel muy bajo de 1,2% (459/37.500) (véase la **Tabla 2**). Sin embargo, la frecuencia de desarrollo de brotes a partir del callo era 11,6% (53/459), y la frecuencia de la formación de raíces a partir de los brotes era 52,8% (28/53). Estos son valores que son mucho más altos que las tasas de formación de brotes y de raíces en el proceso de regeneración

mediante la formación directa de brotes.

Tabla 2: Frecuencias de desarrollo del callo y la formación de brotes a partir de callos

Genes	Número de explantes				Número de callos formados				Número de brotes formados a partir del callo				Número de brotes con raíces			
	P915	P409	P410	P101	P915	P409	P410	P101	P915	P409	P410	P101	P915	P409	P410	P101
TMV-CP	5.188	6.917	5.491	7.210	81	30	25	94	14	5	1	7	12	3	0	2
PPI1	2.903	3.056	3.798	2.937	107	46	17	59	15	4	2	5	7	2	1	1
Subtotal	8.091	9.973	9.289	10.147	188	76	42	153	29	9	3	12	19	5	1	3
Total	37.500				459				53				28			

5 Los resultados anteriores sugieren que, una vez que se forma un callo en la regeneración de explantes de pimiento, se pueden formar brotes y raíces a partir de los callos con una alta eficacia.

Ejemplo 3: Examen de la eficacia de transformación

10 Un total de 1.407 brotes formados directamente a partir de las partes dañadas de los explantes en el Ejemplo 1, y un total de 28 brotes formados indirectamente a partir de callosexaminaron en cuanto a sus tasas de transformación mediante ensayo por PCR. En primer lugar, se aisló el ADN genómico de plantas de pimiento de acuerdo con el método descrito en Lee *et al.*, *Plant Mol. Biol.*, 46: 661,2001. Para detectar la inserción de un gen TMV-CP, la PCR se realizó utilizando los cebadores representados por la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2. Además, para detectar la inserción de un gen PPI1, la PCR se realizó utilizando los cebadores representados por la SEQ ID NO: 3 y la SEQ ID NO: 4. La PCR se realizó repitiendo 35 ciclos, consistiendo cada uno en 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C y 1 minuto a 72°C. Los resultados del ensayo de PCR demostraron que ninguno de los 1.407 brotes formados directamente de las partes dañadas de explantes se insertó con el gen *TMV-CP* o el gen *PPI1* (véase la **Tabla 3**). Las eficacias de transformación recogidas en las **Tablas 3 y 4** que figuran a continuación son valores obtenidos al dividir el número de brotes que son positivos en el ensayo de PCR por el número de explantes utilizados.

Tabla 3: Tasas de transformación de brotes formados directamente a partir de partes dañadas de explantes

Genes	Número de brotes positivos en el ensayo de PCR			
	P915	P409	P410	P101
<i>TMV-CP</i>	0	0	0	0
<i>PPI1</i>	0	0	0	0
Total	0	0	0	0
Eficacia de Transformación	0%	0%	0%	0%

30 Por otra parte, los resultados del examen de las tasas de transformación de brotes formados indirectamente a partir de callos demostraron que las tasas de transformación eran 0,19% (15/37.500) para plantas de la línea P915 y 0,03% (3/37.500) para plantas de la línea P409 (véase la **Tabla 4**). La relación entre el número de brotes que son positivos en el ensayo de PCR al número de brotes formados a partir del callo era 34% (18/53).

Tabla 4: Tasas de transformación de brotes formados indirectamente a partir de callos

Genes	Número de brotes positivos en el ensayo de PCR			
	P915	P409	P410	P101
<i>TMV-CP</i>	10	2	0	0
<i>PPI1</i>	5	1	0	0
Total	15	3	0	0
Eficacia de Transformación	0,19%	0,03%	0%	0%

35 Los resultados anteriores sugieren que, si se forman brotes a partir de callos después de la transformación, la posibilidad de transformación de plantas de pimiento se ve grandemente incrementada.

Ejemplo 4: Examen de la resistencia a TMV de plantas de pimiento transgénicas

Con el fin de examinar si las plantas de pimiento transgénicas en las que se ha introducido el gen *TMV-CP* mediante la formación indirecta de brotes mediada por callo en el Ejemplo 1 anterior muestra resistencia al TMV, se llevó a cabo el siguiente ensayo. Plantas T0 se auto-cruzado para obtener plantas T1. Las hojas de 408 individuos de las plantas T1 se inocularon con TMV dos veces a intervalos de dos semanas. Dos semanas después de la segunda inoculación, se realizó un ELISA utilizando un anticuerpo TMV-CP (Shin, R. *et al.*, *Mol. Plant. Microbe. Interact.*, 15: 983,2002). Los resultados demostraron que 28 individuos de 408 individuos de las plantas T1 eran resistentes a la infección por TMV (véase la **Tabla 5**). Se observaron manchas de mosaico en las hojas de plantas susceptibles, pero no observaron en las plantas resistentes.

Además de ello, un molde de ADN genómico aislado de las hojas de plantas se sometió a PCR de la misma manera que en el Ejemplo 3. Los resultados del ensayo de PCR demostraron que el gen *TMV-CP* se insertaba en todas las 28 plantas resistentes individuales (datos no mostrados).

Tabla 5: Examen de la resistencia al TMV

	Número de plantas ensayadas	Número de plantas susceptibles	Número de plantas resistentes
T1	408	380	28
No transformante	66	66	0

Ejemplo 5: Producción de plantas de pimiento transformadas con el gen *GFP*

5-1: Preparación de pre-cultivo de explantes

Con el fin de determinar las condiciones óptimas para inducir el callo a partir de explantes de pimiento en un nivel superior, los explantes se pre-cultivaron en un medio que contenía una o más de diversas hormonas vegetales.

En primer lugar se utilizaron en un ensayo ocho líneas endogámicas (P915, P318, P319, P409, P410, P784, P2377 y PMAL) de semillas de pimiento guindilla (Nongwoo Bio Co., Corea). La superficie de las semillas se esterilizó con etanol al 95% durante 30 segundos y luego con lejía al 50% (Yuhanrocks, Yuhan Corp., Corea) durante 10 minutos. Después, las semillas se lavaron tres veces con agua esterilizada. Las semillas esterilizadas se transfirieron a medio ½ MS (½ MS + sacarosa al 1,5% + agar al 0,8%, pH 5,8) y luego se germinaron bajo condiciones de luz a 25°C. A continuación de esto, los cotiledones fueron extirpados de las plantas de 8-10 días. Los cotiledones fueron dañados con un cuchillo, después de lo cual se transfirieron a medio de inducción del callo que contenía una o más diversas hormonas vegetales (medio basal MS que contenía 1 mg/l de 2,4-D y 1 mg/l de IAA o una mezcla de 1 mg/l de 2,4-D y 0,2 mg/l de zeatina) y se pre-cultivaron. El pre-cultivo se realizó en una incubadora controlada en temperatura (22-28°C) bajo condiciones de luz durante 20-60 horas.

1-2: Co-cultivo con *Agrobacterium*

Un gen *GFP* (GenBank acceso N°: AY508125; Haseloff J, *et al.*, *PNAS*, 94:2122,1997) se introdujo en un vector pCAMBIA 2300. El vector recombinante resultante se introdujo en una cepa LBA4404 de *Agrobacterium*. La cepa de *Agrobacterium* transformada se cultivó en un medio YEP que contenía 50 mg/l de kanamicina, 50 mg/l de rifampicina y 100 µM de acetosiringona. El caldo de cultivo se centrifugó, y luego se diluyó en medio basal MS hasta una DO₆₀₀ de 0,3-0,6. La suspensión de cultivo se mezcló con un medio líquido MS que contenía 100 µM de acetosiringona, y la mezcla se inoculó a los cotiledones pre-cultivados en el Ejemplo 5-1 anterior durante 20 minutos. Después de ello, los cotiledones fueron co-cultivados con la cepa de *Agrobacterium* en un medio con la misma composición que la del medio de pre-cultivo utilizado en el Ejemplo 5-1, en condiciones de oscuridad durante 48-70 horas. Los cotiledones co-cultivados con la cepa de *Agrobacterium* se lavaron tres veces con un medio líquido ½ MS que contiene 500-800 mg/l de cefotaxima.

5-3: Selección del callo

A fin de seleccionar el callo transgénico, los cotiledones co-cultivados con la cepa de *Agrobacterium* en el Ejemplo 5-2 anterior se transfirieron a un medio basal MS (medio de selección) que contenía 2 mg/l de zeatina, 0,3 mg/l IAA, 80 mg/l de kanamicina, 100 mg/l de cefotaxima y 300 mg/l de lilacilina, y se cultivaron en una incubadora bajo un ciclo de luz de 16 h/oscuridad de 8 h durante 4-5 semanas. Durante este proceso de cultivo, el callo comenzó a crecer. La **FIG. 3** es una fotografía que muestra el callo desarrollado durante dos semanas después de la

transferencia al medio de selección. Después, el callo se cultivó adicionalmente durante 5-8 semanas. El patrón de crecimiento del callo transgénico de acuerdo con el tiempo de cultivo se observó bajo un microscopio UV y los resultados se muestran en la **FIG. 4**. Como se muestra en la **FIG. 4**, se pudo confirmar que el callo transgénico que expresa GFP muestra una expresión continua de GFP durante su crecimiento, indicando con ello que es genéticamente estable.

5-4: Formación de brotes

El callo desarrollado se cortó en trozos pequeños, y luego se transfirió a un medio basal MS (medio de inducción de brotes) que contenía 2 mg/l de zeatina, 0,01 mg/l de IAA, 30-60 mg/l de kanamicina y 300 mg/l de cefotaxima y se cultivó durante aproximadamente un mes. Después de ello, los brotes formados se cultivaron adicionalmente durante aproximadamente dos meses con el fin de alargar los brotes formados. El proceso de formación de brotes a partir del callo transformado se muestra en la **FIG. 5**.

5-5: Formación de la raíz y adaptación al suelo

Con el fin de inducir raíces a partir de los brotes, éstos se cultivaron en un medio basal MS que contenía 20-30 mg/l de kanamicina y 200 mg/l de cefotaxima. Después de aproximadamente 4-5 semanas, las raíces se formaron a partir de los brotes. Cuando las raíces crecieron aproximadamente 10 cm, se retiró el medio y las raíces restantes se plantaron en una maceta desmontable. Se cultivaron en una incubadora durante unos pocos días, y después se cultivaron en un invernadero. La aparición de plantas de pimiento transgénicas obtenidas un mes después de haber plantado las raíces la maceta desmontable se muestra en la **FIG. 6**.

Ejemplo 6: Verificación de las plantas transgénicas por el ensayo de PCR

ADNs genómicos se extrajeron de callos que expresan GFP y callos que no expresan GFP bajo UV, respectivamente, entre las plantas transgénicas obtenidas en el Ejemplo 5 anterior. Para detectar la inserción de un gen *GFP*, cada uno de los moldes de ADN extraídos se sometió a PCR utilizando cebadores representados por la SEQ ID NO: 5 y la SEQ ID NO: 6. La PCR se realizó repitiendo 35 ciclos, consistiendo cada uno en 1 minuto a 60°C, 1 minuto a 94°C y 1 minuto a 72°C. Como se muestra en la **FIG. 7**, los resultados del ensayo de PCR demostró que una banda con un tamaño de aproximadamente 720 pb correspondiente al gen *GFP* se detectó sólo en el callo que expresa GFP. Además de ello, un ADN genómico se extrajo de las hojas de varias líneas de plántulas regeneradas a partir del callo que expresa GFP, y después se sometió a PCR de la misma manera a como se describe justo antes. Como se muestra en la **FIG. 8**, los resultados del ensayo de PCR demostraron que el gen *GFP* se introdujo de forma estable en todas las líneas P410, P915, P318 y P319. Esto indica que el método de transformación de acuerdo con la presente invención no es específico de la línea.

Ejemplo 7: Determinación del número de copias del gen *GFP* introducido en plantas transgénicas

ADNs genómicos se extrajeron de 14 individuos de plantas de pimiento transgénicas (T0) obtenidas en el Ejemplo 5 anterior, y luego se sometieron a análisis de transferencia Southern, determinando así el número de copias de un gen *GFP* insertado en las plantas transgénicas. 30 µg de cada uno de los ADNs genómicos se cortó con *Bam*HI y *Xba*I, y luego se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% a 20 V durante 20 horas. Después de esto, el ADN fue transferido a una membrana de nitrocelulosa, y se mezcló con un gen *GFP* marcado con ³²P-dCTP y se hibridó a 65°C durante 16 horas. Como se muestra en la **FIG. 9**, los resultados del análisis demostraron que existían dos copias del gen *GFP* en el genoma de 4 individuos entre los 14 individuos, y existía una copia en los individuos restantes. Además, las posiciones de las bandas de las plantas transgénicas eran diferentes entre sí, lo que sugiere que los orígenes de los callos de las plantas transgénicas son diferentes unos de otros.

Ejemplo 8: Examen de la eficacia de transformación

8-1: Examen de la tasa de inducción de callos

La inducción de callos en 8 líneas de plantas de pimiento se intentó de la misma manera que en el Ejemplo 5. Los resultados demostraron que el callo se indujo en todas las líneas en una tasa general de aproximadamente 13%, aunque hubo una diferencia en la tasa de inducción de los callos entre las líneas de plantas de pimiento (véase la **Tabla 6**). En particular, el caso de tratamiento con 2,4-D o IAA solo mostró una tasa de inducción de callo más alta que la del caso de tratamiento con una mezcla de 2,4-D y zeatina. Además de ello, la tasa de inducción de callos del Ejemplo 5 era aproximadamente 10 veces mayor que la del Ejemplo 1 (1,2%; véase la **Tabla 2**). Además, la

relación de callos que expresan GFP bajo UV era de 4,7%, basada en explantes totales utilizados en la transformación, y aproximadamente de 36,1% (233/645), basada en callos totales inducidos a partir de explantes (véase la **Tabla 6**). Esto sugiere de nuevo que, una vez que el callo es inducido a partir de explantes, la tasa de transformación aumenta grandemente. Los valores numéricos para cada una de las líneas expuestas en la **Tabla 6** representa el total de los resultados para cada una de las hormonas utilizadas en el pre-cultivo.

Tabla 6: Tasa de transformación de acuerdo con la tasa de inducción de callos y la expresión de GFP

Líneas de pimiento	Número de explantes	Número de callos inducidos (relación, %)	Número de callos que expresan GFP (relación, %)
P915	1343	202 (15,0)	68 (5,1)
P318	853	27 (3,2)	9 (1,1)
P319	596	186 (31,2)	82 (13,8)
P409	933	77 (8,3)	27 (2,9)
P410	402	76 (18,9)	19 (4,7)
P784	56	5 (8,9)	2 (3,6)
P2377	312	43 (13,8)	22 (7,1)
PMAL	415	29 (7,0)	4 (1,0)
Total	4910	645 (13,1)	233 (4,7)

8-2: Examen de la tasa de formación de brotes y de la tasa de transformación de callos

La frecuencia de la formación de brotes a partir del callo inducido a partir de explantes se examinó durante aproximadamente 5 meses después de co-cultivo con *Agrobacterium*, y el resultado demostró una frecuencia de formación de brotes de aproximadamente 37,7% (véase la **Tabla 7**). El ensayo de PCR en los brotes formados a partir de callos se realizó para examinar la tasa de introducción de un gen *GFP*. Los resultados del ensayo de PCR demostraron que la relación de los brotes que tienen una inserción del gen *GFP* entre los brotes formados a partir de callo era de 45% (**Tabla 7**). Se determinó que la tasa de transformación de los brotes con el gen *GFP* era aproximadamente 1% (27/2792), basado en el número total de explantes utilizados en la transformación. Este valor es aproximadamente 5 veces mayor que el del Ejemplo 1 (0,19%) (véase la **Tabla 4**).

Tabla 7: Tasa de formación de brotes y tasa de transformación a partir de callos

Líneas de pimientos	Número de brotes formados a partir de callos	Número de brotes positivos en el ensayo de PCR
P915	12/68	2
P318	8/9	4
P319	40/82	21
Total	60/159 (37,7%)	27/60 (45,0%)

APLICABILIDAD INDUSTRIAL

Como se describió anteriormente, en la presente invención, los explantes de pimiento se pre-cultivaron en medio de inducción del callo y luego se transformaron con el fin de formar artificialmente el callo y la regeneración de plantas se indujo a partir del callo. El método de la invención muestra una muy alta eficacia de transformación y puede transformar plantas de pimiento en una línea de una manera no específica. Además, el método de la invención permite una producción en masa de diversas líneas de plantas de pimiento transgénicas con una alta eficacia, ya que el tiempo necesario para la preparación de las plantas de pimiento transgénicas se acorta en comparación con el método anterior.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> NONGWOOBIO

<120> MÉTODO PARA PREPARAR PIMIENTOS TRANSGÉNICOS UTILIZANDO LA INDUCCIÓN DEL CALLO

<130> PP-B0045 SEQ)

<150> KR 10-2004-0016722
 <151> 12-03-2004
 <160> 6
 5 <170> KopatentIn 1.71
 <210> 1
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador directo para la PCR
 15 <400> 1
atgacgcaca atcccactat **20**
 20 <210> 2
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> cebador inverso para la PCR
 <400> 2
cgaaaccctg aaaataat **18**
 30 <210> 3
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> cebador directo para la PCR
 <400> 3
 40 **atgacgcaca atcccactat** **20**
 <210> 4
 <211> 17
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador inverso para la PCR
 50 <400> 4
gtaccacttg aagaagc **17**
 <210> 5
 55 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 522 993 T3

<220>

<223> cebador directo para la PCR

<400> 5

5

atgacgcaca atcccactat

20

<210> 6

<211> 23

10

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador inverso para la PCR

15

<400> 6

catgtggtct ctcttttctgt tgg

23

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir plantas de pimiento transgénicas, comprendiendo el método las etapas de:
 - (a) pre-cultivar explantes de pepino en un medio de inducción del callo;
 - (b) co-cultivar los explantes pre-cultivados con *Agrobacterium* en el que se ha introducido un gen diana;
 - (c) cultivar los explantes co-cultivados en un medio de selección con el fin de formar un callo y seleccionar el callo formado; y
 - (d) cortar el callo y cultivar el callo cortado en un medio de inducción de brotes con el fin de formar brotes.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los explantes de la etapa (a) se dañan con el fin de fomentar la inducción del callo.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los explantes de la etapa (a) son cotiledones o hipocótilos.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el medio de inducción del callo de la etapa (a) comprende uno o más seleccionados del grupo que consiste en zeatina, ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido indol-3-acético (IAA), ácido naftalenoacético (NAA) y bencilaminopurina (BA).
5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el medio de inducción del callo de la etapa (a) comprende uno o más seleccionados del grupo que consiste en 0,01-5 mg/l de 2,4-D, 0,01-5 mg/l de IAA, 0,01-5 mg/l de zeatina, 0,01-5 mg/l de NAA y 0,01-5 mg/l de BA.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el medio comprende 1 mg/l de 2,4-D o 1 mg/l de IAA.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el medio comprende una mezcla de 0,01-2 mg/l de zeatina con uno seleccionado del grupo que consiste en 0,1-5 mg/l de 2,4-D, 0,1-5 mg/l de IAA y 0,01-2 mg/l de NAA.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el co-cultivo en la etapa (b) se realiza en el mismo medio que el medio de inducción del callo utilizado en la etapa (a).
9. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el medio de selección en la etapa (c) comprende una mezcla de 0,1~5 mg/l de zeatina y 0,01~1 mg/l de IAA o una mezcla de 0,1~5 mg/l de zeatina y 0,01~1 mg/l de NAA.
10. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el medio de inducción de brotes en la etapa (d) comprende uno seleccionado del grupo que consiste en:
 - (i) 0,5~10 mg/l de zeatina;
 - (ii) una mezcla de 0,5~10 mg/l de zeatina y 0,01~0,2 mg/l de IAA; y
 - (iii) una mezcla de 0,5~10 mg/l de zeatina y 0,01~0,2 mg/l de NAA.
11. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que después de la etapa (d) está comprendida adicionalmente la siguiente etapa (e): transferir los brotes a un medio de formación de raíces, y luego cultivar los brotes transferidos para formar raíces.
12. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el gen diana es un gen implicado en mecanismos de defensa de la planta o un gen implicado en la biosíntesis de metabolitos útiles.
13. El método de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el gen implicado en mecanismos de defensa de la planta es un gen que codifica una proteína seleccionada del grupo que consiste en proteína inactivadora de ribosomas (RIP), ácido jasmónico carboxilo metiltransferasa, trehalosa sintasa, defensina 1.2 de plantas, tionina sintasa, glucanasa, quitinasa, fenilalanina amonio liasa, chalcona sintasa, glutatión-S-transferasa, antranilato sintasa, proteína de almacenamiento, calmodulina, triptófano sintetasa, inhibidor de proteinasa II, óxido nítrico sintasa, cistamina, ácido graso peroxidasa, aleno óxido sintasa, factor de transcripción 1 de la interacción pimiento-PMMV (PPI1), factor de transcripción de dominio WRKY, proteína de respuesta a patógenos y proteína de la envuelta del virus.
14. El método de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el gen que codifica la proteína de la envuelta del virus

se selecciona del grupo que consiste en el gen *TMV-CP*, *CMV-CP* y *PepMoV-CP*.

- 5 15. El método de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el gen implicado en la biosíntesis de metabolitos útiles se selecciona del grupo que consiste en genes implicados en la biosíntesis de taninos, sinapina, saponina, alicina, espinosina, ácido cinámico, flavonoides, terpenoides, catequina, vitaminas, penicilina, indol, insulina, prostaglandinas, taxol, alisol, ricina, cartenoide y capsicina.
- 10 16. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el pimiento es el género *Capsicum*.
- 15 17. El método de acuerdo con la reivindicación 16, en el que dicho género *Capsicum* es *Capsicum annuum* L.
18. El método de acuerdo con la reivindicación 17, en el que dicho *Capsicum annuum* L se selecciona del grupo que consiste en pimiento guindilla (*Capsicum annuum* L. var. *acuminatum*), pimiento dulce o campana (*Capsicum annuum* L. var. *grossum*), pimiento cónico (*Capsicum annuum* L. var. *conoides*), pimiento cereza (*Capsicum annuum* L. var. *cerasiforme*), pimiento rojo de racimo (*Capsicum annuum* L. var. *fasciculatum*) y pimiento largo (*Capsicum annuum* L. var. *longum*).

FIG. 1

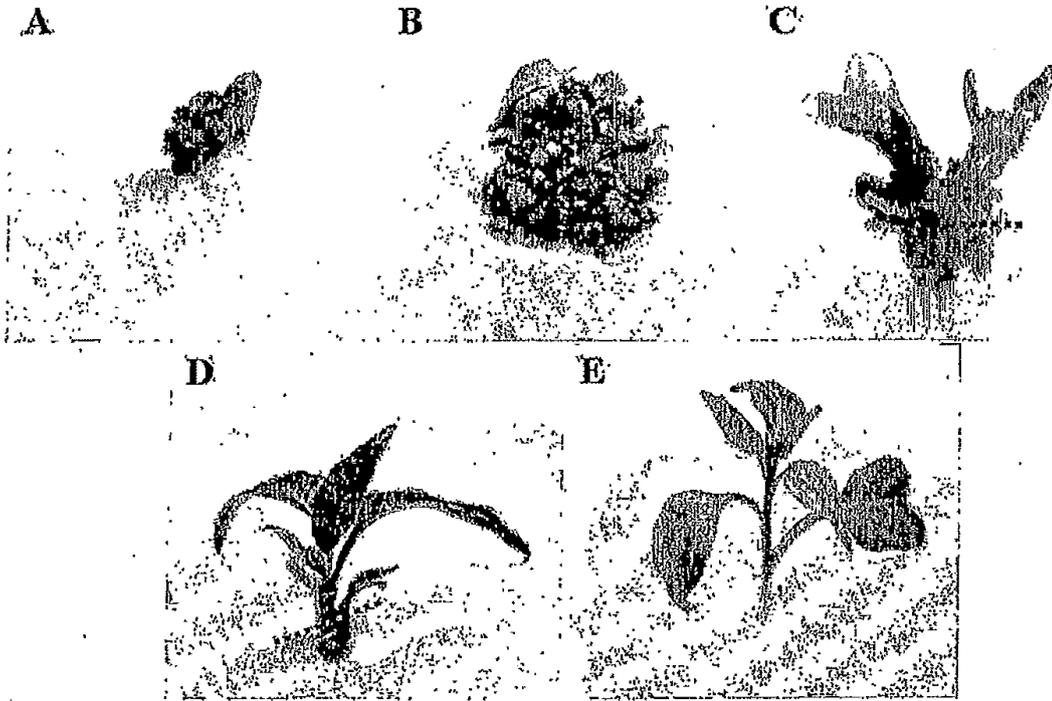


FIG. 2

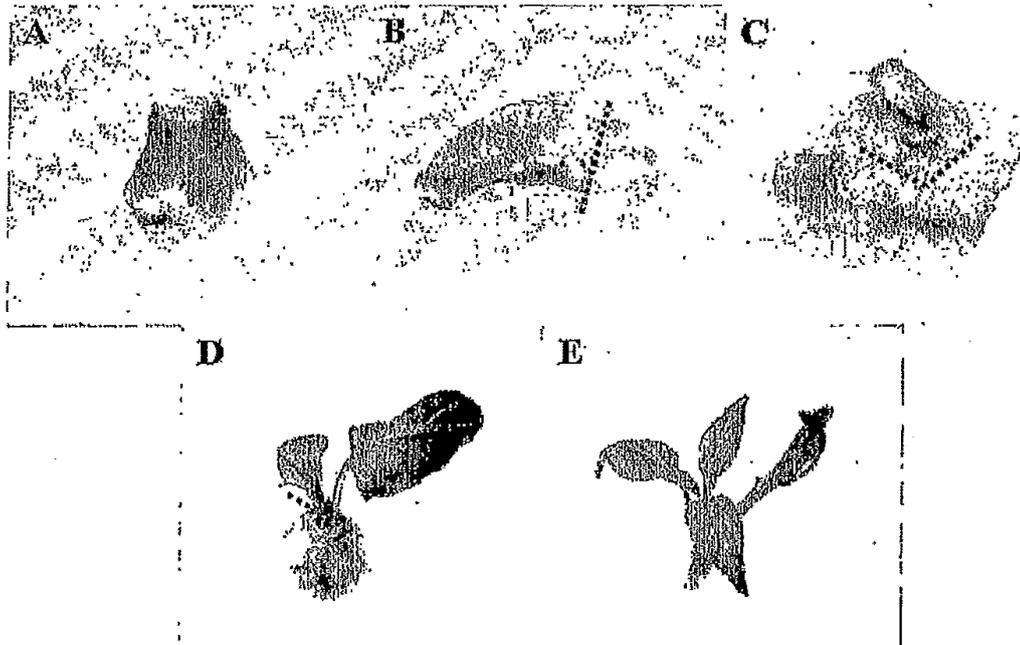


FIG. 3

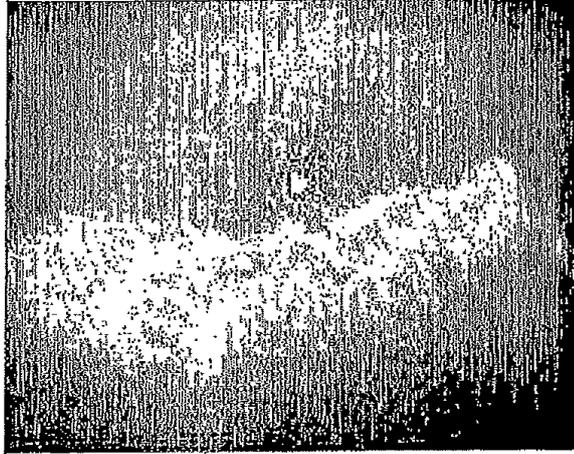


FIG. 4

		Irradiación UV	Irradiación UV
		Filtro Normal	U-MNIBA(SX)
Callo no transgénico			
Callo transgénico	2 semanas		
	1 mes		
	2 meses		

FIG. 5

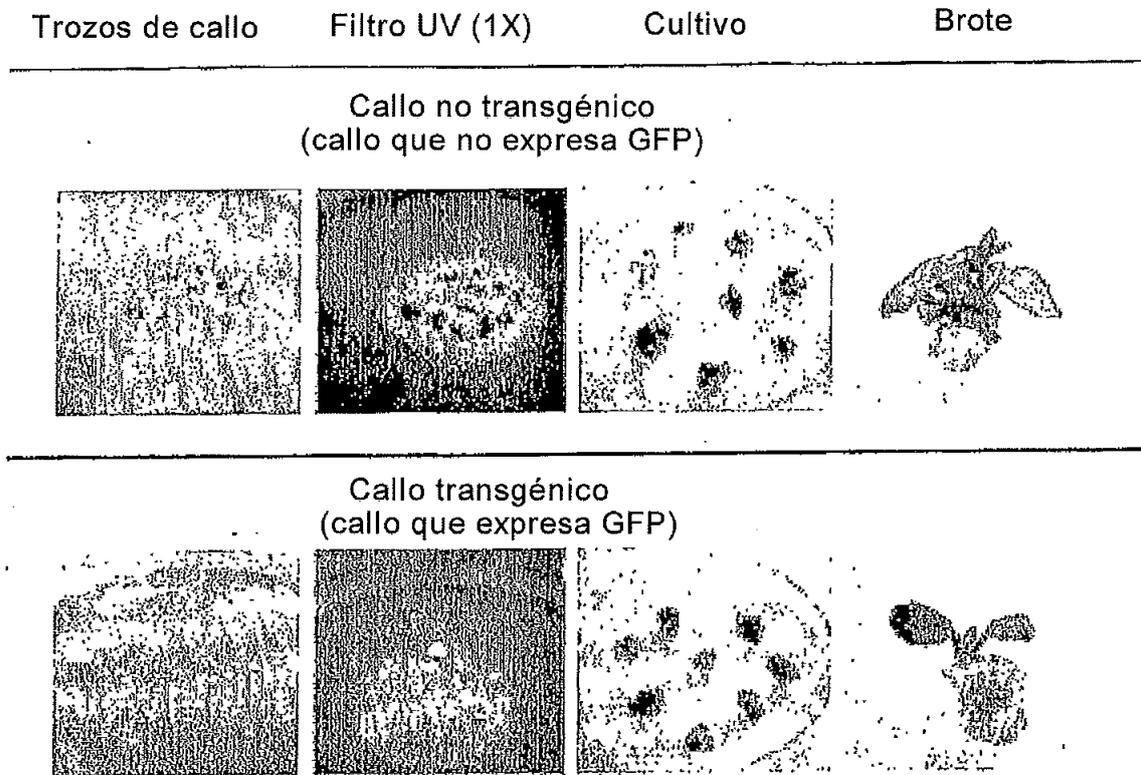


FIG. 6



FIG. 7

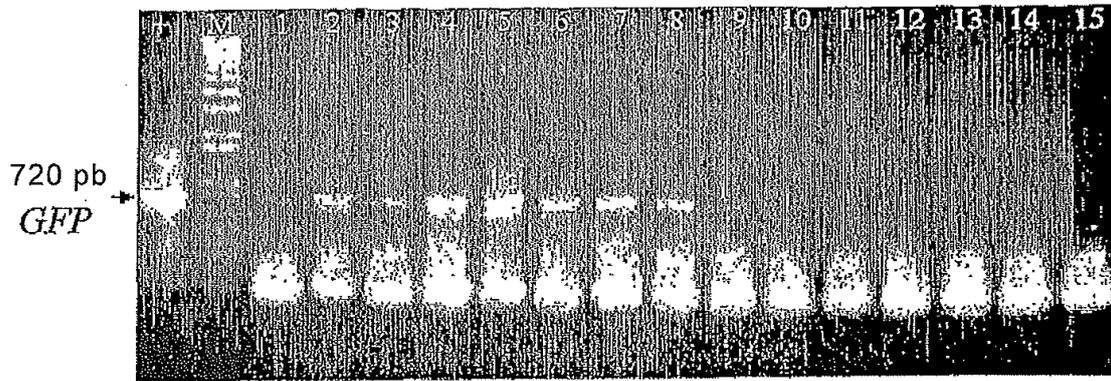


FIG. 8

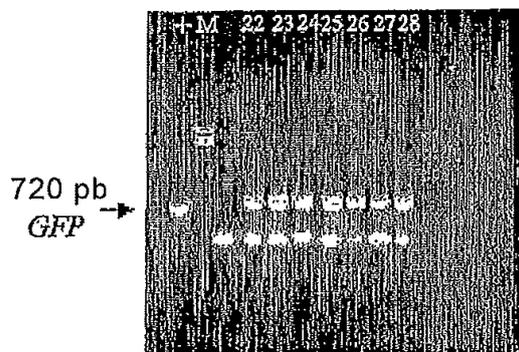
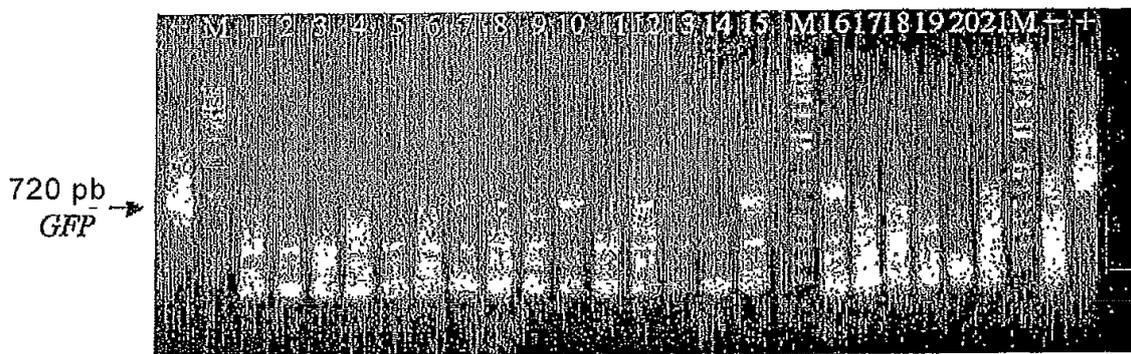


FIG. 9

