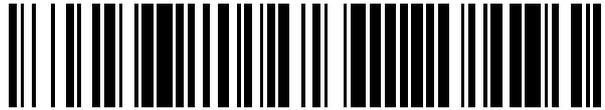


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 542 717**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/82** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.02.2007 E 07763365 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2015 EP 1989315**

54 Título: **Generación de plantas transgénicas libres de marcadores y de estructura usando un enfoque binario único**

30 Prioridad:

**06.02.2006 US 765177 P**

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

**10.08.2015**

73 Titular/es:

**J.R. SIMPLOT COMPANY (100.0%)  
SIMPLOT PLANT SCIENCES 5369 W. IRVING  
STREET  
BOISE, ID 83706, US**

72 Inventor/es:

**RICHAEL, CRAIG**

74 Agente/Representante:

**LAZCANO GAINZA, Jesús**

**ES 2 542 717 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**

Generación de plantas transgénicas libres de marcadores y de estructura usando un enfoque binario único

5 Esta solicitud de patente no provisional de los Estados Unidos reivindica prioridad con la solicitud provisional de los Estados Unidos con serial No. 60/765.177 presentada el 6 de febrero de 2006.

Campo de la invención

10 La presente invención proporciona un método conveniente para la producción de una planta transformada. Este método requiere la expresión de un gen de la hormona colocado dentro de la estructura del plásmido que porta también un ADN-P o un ADN-T para obtener plantas transformadas sin estructura.

Antecedentes

15 Como se sabe bien, *Agrobacterium tumefaciens* es una bacteria útil para el suministro e integración de ácidos nucleicos deseados, tal como transgenes deseables, en el genoma de la célula de una planta. El ADN de transferencia de la bacteria (ADN-T) es el vehículo que transporta el transgén desde el plásmido que induce el tumor contenido dentro de la cepa de la bacteria y dentro del material genético de la planta. La industria agrícola explota esta capacidad con el fin de modificar genéticamente los cultivos para expresar genes y rasgos deseables.

20 Típicamente, se coloca un gen marcador seleccionable al lado del transgén en el ADN-T, de modo que se integra en el genoma de la planta junto con el transgén. La expresión del marcador ayuda a identificar aquellas células que contienen un transgén integrado. Algunos marcadores comunes incluyen genes de resistencia a antibióticos bacterianos, tales como neomicina fosfotransferasa, "nptII" (Fraley y colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci. 80: 4803-4807, 1983) e higromicina fosfotransferasa, "hpt" (Waldron y colaboradores, Plant Mol. Biol. 5: 103-108, 1985). Otros marcadores fúngicos bacterianos incluyen al gen de resistencia a la micotoxina fúngica, cianamida hidratasa, "cah" (Weeks y colaboradores, Crop Sci. 40: 1749-1754, 2000), fosfomanosa isomerasa, "manA" o "pmi" (Joersbo y colaboradores, Physiol Plant 105: 109-115, 1999) y treonina desaminasa, "TD" (Ebmeier y colaboradores, Planta 218: 751-758, 2004).

25 Es posible coasignar un marcador a un gen específico y por lo tanto crear un ADN-T, que contiene múltiples genes y múltiples marcadores para la integración definitiva en un genoma de una planta. Por lo tanto, la así llamada estrategia de "apilado de genes" combina varias características deseadas en una línea de plantas. Sin embargo, la capacidad de apilar numerosos genes, depende de la disponibilidad e idoneidad de los marcadores coasignados. Por lo tanto, el apilado de genes puede estar limitado por su dependencia de los genes marcadores.

30 Otra preocupación, es que algunos creen que los marcadores representan riesgos potenciales para la salud humana y animal y para el medio ambiente. Por ejemplo, existe la preocupación de que los genes de resistencia a los antibióticos y a los herbicidas pueden escapar de las plantas en las que han sido introducidos y hacia el medio ambiente. Por lo tanto, los genes de resistencia, fuera del genoma de la planta modificada, pueden conferir una ventaja adaptativa a las malezas y a los patógenos que los incorporen en sus propios genomas (Dale y colaboradores, Nat. Biotech. 20: 567-574, 2002).

35 Por consiguiente, se han ideado varias estrategias para extirpar un marcador seleccionable de una planta transgénica. Uno de tales métodos emplea enzimas recombinasa específicas del sitio para eliminar el marcador de su ubicación en el genoma de la planta. Ver Dale y Ow, Proc. Natl. Acad. Sci. 23: 10558-10562, 1991; Kilby y colaboradores, Plant J. 8: 637-652, 994; y Sugita y colaboradores, Plant J. 22: 461-469, 1999. La tasa de éxito de eliminación, sin embargo, es bastante baja. Además, el proceso de escisión típicamente deja elementos de ADN foráneo incrustados en el genoma de la planta.

45 Otro método implica la eliminación de los marcadores del genoma de la planta por cotransformación. Esta estrategia esencialmente implica el suministro e integración del gen de interés y su marcador en el genoma de la planta usando dos ADN-T. La idea es que es más fácil eliminar el marcador de la línea de la planta, mientras se conserva el gen deseado, porque el gen y el marcador no están enlazados genéticamente. Por lo tanto, deben ocurrir dos eventos de integración distintos permitiendo de este modo que distintos elementos marcadores de ADN-T se crucen nuevamente o bien sean segregados del gen distinto ya que están presentes en lugares no vinculados.

50 Los ADN-T que contienen el marcador y el gen puede existir dentro del mismo vector binario o en diferentes vectores binarios. Del mismo modo, un ADN-T que contiene un marcador puede estar en un plásmido que está contenido dentro de una cepa de *Agrobacterium* que es igual o diferente a la cepa que contiene el plásmido con el gen deseado o en la estructura de un solo vector binario. Ver Puchta, Plant Cell Tiss. Organ Cult., 74: 123-134, 2003, y Huang y colaboradores, Transgen. Res. 13: 451-461, 2004.

- 5 Infortunadamente, estas estrategias de eliminación del marcador requieren mucho tiempo y puede ser económicamente, agotadoras, lo cual es problemático ya que es la ausencia de genes marcadores lo que ayuda a reducir el costo de la desregulación y facilita la comercialización de cultivos genéticamente modificados (Smyth y colaboradores, Nat. Biotech 20: 537-541, 2002). Más importante aún, estas estrategias son inútiles en cultivos que sean estériles y no se pueden aplicar a los cultivos propagados en forma clonal tales como la patata.
- 10 Incluso una preocupación adicional es no sólo la eliminación del gen marcador, sino el hecho de que la transformación mediada por *Agrobacterium* más frecuentemente no introduce secuencias innecesarias de ADN en la estructura del plásmido en el genoma de la planta. Es decir, las enzimas que empalman el ADN-T del vector plásmido no siempre cortan el plásmido con precisión. Por ejemplo, las enzimas pueden cortar el plásmido más allá de los extremos del ADN-T, que están delineados por secuencias del borde izquierdo y derecho que sirven como sitios de reconocimiento para el corte por parte de las enzimas. Por lo tanto, el ADN-T, una vez empalmado al plásmido, puede ser más largo de lo esperado y por lo tanto transportar secuencias de la estructura del plásmido además del marcador y el gen de interés.
- 15 Estas secuencias de la estructura también pueden integrarse en el genoma de la planta. De hecho, 75% de todos los eventos de integración contienen elementos de la estructura en especies de solanáceas (Kononov y colaboradores, Plant J. 11: 945-957, 1997; Heeres y colaboradores, Euphytica 124: 13-22, 2002; Rommens y colaboradores, Plant Physiol. 135: 421-431, 2004).
- 20 Esta es una preocupación adicional porque las secuencias de la estructura de los plásmidos inductores de tumores que se utilizan en la transformación mediada por *Agrobacterium* contienen muchos elementos genéticos diferentes, tales como orígenes de replicación, genes marcadores seleccionables bacterianos y otros elementos reguladores externos. Las autoridades agrícolas y ambientales a menudo encuentran la presencia de tal ADN externo extraño en el genoma de una planta que es inaceptable, a pesar de los beneficios conferidos por la expresión del gen cointegrado de interés.
- 25 En consecuencia, además de idear estrategias para la eliminación de los marcadores, también deben desarrollarse estrategias para identificar aquellas plantas transgénicas que también contienen secuencias de la estructura del plásmido. Estas incluyen amplificación con base en la reacción en cadena de la polimerasa y transferencias tipo Southern para identificar la retención de las secuencias conocidas del plásmido en la composición genética de la planta. Ambos métodos de detección son tediosos y costosos, especialmente cuando las frecuencias de integración a la estructura son altas.
- 30 La colocación de genes letales en la estructura para eliminar las células que se transforman con la estructura es potencialmente útil. Véase la patente de los Estados Unidos No. 6.521.458. Dichos genes, sin embargo, pueden causar problemas a las células circundantes, tales como la alteración de su capacidad para regenerarse.
- 35 El gen condicionalmente letal de la citosina desaminasa, (*codA*), convierte la 5-fluorocitosina no tóxica (5-FU) en 5-fluorouracilo tóxico. Si embargo, se sabe que 5-FU migra a las células que no contienen ninguna secuencia de la estructura del plásmido. Por otra parte, el método de utilización de genes condicionalmente letales requiere la adición de sustratos exógenos, lo que significa otra etapa en la preparación del medio o transferencia del explante.
- 40 El uso de genes marcadores no letales en la estructura ha sido sugerido como una alternativa a los genes letales, condicionalmente letales o puntuables, tales como GUS, glucuronidasa beta. Véase la publicación de la solicitud de patente de los Estados Unidos No. 2004/0237142.
- 45 Los genes no letales proporcionan un medio visual para distinguir eventos transgénicos que contienen la estructura del vector. Tales genes incluyen aquellos que están implicados en la biosíntesis de hormonas de la planta, la degradación de hormonas de la vegetal, la señalización de hormonas de la planta, o la interferencia metabólica.
- 50 Este método identifica las plantas transgénicas que contienen el ADN del plásmido sin realizar la detección por PCR o una transferencia tipo Southern, pero requiere el uso de un marcador de selección positiva dentro del ADN-T y, por lo tanto, no es un método libre de marcador.
- 55 Se desarrolló un método que aprovechó la utilidad del gen marcador, mientras hace selección en contra de su integración. Mediante el empleo de selección positiva para la expresión transitoria del gen marcador seguido por selección negativa en contra de la integración estable del gen marcador, aproximadamente 25% de las plantas regeneradas contiene el transgén de interés, pero sin gen marcador. Véase Rommens y colaboradores, Plant Physiol. 135: 421-431, 2004.
- 60 Otro método emplea cepas "armadas" de *Agrobacterium* que aún contienen sus propios genes de la hormona (Mihalka y colaboradores, Plant Cell Rep. 21: 778-784, 2003, Aronen y colaboradores, Plant Cell Tissue Organ Cult. 70: 147-154, 2002). Se modifica un gen de interés en un plásmido binario desarmado y se introduce en mutantes especiales "disparadores" que contienen un plásmido Ti nativo, oncogénico (o "armado"). Aunque este método generalmente

proporcionará brotes libres de marcador con baja frecuencia, se requiere el uso de cepas oncogénicas especiales. Otro problema es que la probabilidad de tener un evento de integración a la estructura con el gen de interés se ve agravado por el uso de dos binarios en lugar de uno.

5 La presente invención detalla un nuevo método que requiere la expresión de un gen o genes para la síntesis de la hormona situado(s) dentro de la estructura de un plásmido que tiene un ADN de transferencia (ADN-P o ADN-T). El gen para la síntesis de las hormonas impulsa la regeneración de las plantas libres de marcadores que albergan el ADN de transferencia. La selección contra la integración de secuencias de estructura se logra en la regeneración y por lo tanto, simplifica la identificación de eventos sin secuencias superfluas de ADN.

10 Resúmen

En un aspecto, la presente invención proporciona un método para producir una planta transformada de acuerdo con la reivindicación 1.

15 En una realización preferida, el gen de la hormona es un gen de isopentenil transferasa.

20 En otra realización, la expresión de una secuencia de ácido nucleico en el ADN de transferencia modifica un rasgo en la planta transgénica resultante, en donde el rasgo es al menos uno de (i) niveles más bajos de acrilamida, (ii) reducción de lesiones de puntos negros, y (iii) reducción del endulzamiento inducido por el frío en comparación con una planta que no contiene una célula que expresa esa secuencia de ácido nucleico.

25 En una realización preferida, la planta transgénica tiene un menor nivel de acrilamida en comparación con una planta que no contiene una célula que expresa la secuencia de ácido nucleico en el ADN de transferencia.

En otra realización, el vector binario individual está en una cepa de *Agrobacterium* y la etapa de transformación comprende poner en contacto la célula de la planta con la cepa de *Agrobacterium*.

30 En una realización, el ADN de transferencia comprende secuencias de ácido nucleico que son nativas del genoma de la célula de la planta.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para producir una planta transformada de acuerdo con la reivindicación 6.

35 En otro ejemplo, las células de la planta son de una planta dicotiledónea seleccionada de entre el grupo que consiste de patata, tabaco, tomate, remolacha, brócoli, yuca, canola, batata, pimiento, algodón, flor de pascua, legumbres, alfalfa, soja, zanahoria, fresa, lechuga, roble, arce, nogal, rosa, menta, calabaza, margarita, manzana, pera, cereza, ciruela, y cactus.

40 En un ejemplo, las células de la planta son células de plantas de patata. En un ejemplo, las células de plantas de patata son de una variedad cultivada, tal como Russet Ranger o Bintje. En un ejemplo, la variedad de patata es Russet Atlantic, All Blue, Purple Valley y Borah Valley.

45 En otro ejemplo, las células de la planta son de una planta monocotiledónea seleccionada de entre el grupo que consiste de trigo, pan de hierba, césped, cereal, maíz, arroz, avena, trigo, cebada, sorgo, orquídea, iris, lirio, cebolla, plátano, caña de azúcar, sorgo y palma.

Breve descripción de las figuras

50 Figura 1: fenotipo normal (negativo para ipt) versus fenotipo anormal (positivo para ipt) en tabaco y papa. Las plantas que sobreexpresan ipt tienden a carecer de la dominancia apical que resulta en una condición muy ramificada y llena de retoños. También tienden a ser cloróticas y con pocas raíces o sin raíces en medio MS sin hormonas. Los brotes positivos para ipt se ilustran a la derecha de cada imagen.

55 Figura 2. Diagrama esquemático que ilustra una realización de un plásmido binario de la presente invención. El ADN de transferencia, que puede ser un ADN-P o un ADN-T, está delineado por un borde derecho (RB) y uno izquierdo (LB) y contiene el gen de interés (GOI). La región fuera del ADN de transferencia se refiere a la estructura y contiene al gen biosintético para la hormona de la planta (ipt).

60 Descripción detallada

El presente método de la invención utiliza un plásmido binario de *Agrobacterium* que contiene un ADN de transferencia derivado de la planta (ADN-P) en lugar de un ADN-T de *Agrobacterium*. El ADN-P está delineado por secuencias de ADN que provienen del genoma de la planta y facilitar el corte enzimático del plásmido en *Agrobacterium*. Por lo tanto, el ADN-P también es capaz de servir como un vehículo para mover de un lado a otro los genes deseados y los polinucleótidos de interés en un genoma de una planta, pero que no es extraño al genoma de la planta.

Por lo tanto, el plásmido binario de la presente invención contiene un gen de interés insertado dentro de los bordes del ADN-P, y un gen biosintético de citoquinina en la estructura del plásmido, fuera del ADN-P (solicitudes de patente de los Estados Unidos Nos. 2003/0221213A1 y 2004/0107455A1). Alternativamente, el plásmido puede contener un borde de ADN-P y una secuencia de oriT como reemplazo para el segundo borde. También es posible usar bordes de ADN-T o combinaciones de bordes de ADN-P y bordes de ADN-T (solicitud de patente provisional 058951-0241). La expresión del gene biosintético de citoquinina impulsa la regeneración de brotes normales libres de marcador y sirve como un marcador visual de la integración de la estructura dentro del genoma de la planta. El plásmido de la presente invención se transforma en una célula adecuada de *Agrobacterium* que suministrará la construcción anterior en células de plantas.

Una "estructura" de un plásmido es cualquier porción de la secuencia de ADN del vector binario fuera de la región del ADN de transferencia. La estructura comprende cualquier ADN que no es de transferencia del vector binario incluyendo la región del replicón bacteriano del vector y las secuencias de resistencia al antibiótico para el mantenimiento del vector.

Los genes biosintéticos de la citoquinina incluyen cualquier secuencia que demuestra promover directa o indirectamente la síntesis de citoquininas que impulsan la división, la elongación y la diferenciación de las células de la planta en los brotes, raíces o embriones. Tales secuencias incluyen al gen de la isopentenil transferasa (*ipt*), al gen 1 independiente de la citoquinina (CDK-1), los genes ESR-2 y ESR-1A.

Los métodos convencionales de regeneración de plantas requieren medios que contengan altas concentraciones de hormonas. Típicamente, se utilizan auxinas para la proliferación celular y la formación de callo, citoquininas para el desarrollo celular y la regeneración de brotes, y ácido giberélico para la expansión celular. A medida que los niveles de hormonas se reducen, se reducen las frecuencias de transformación y se volverán demasiado bajos para generar plantas. La presente invención se basa en el uso de vectores binarios que contienen un casete de expresión para un gen o genes de la hormona en la estructura del vector. La expresión de tales genes da como resultado la producción de citoquinina. En consecuencia, los medios utilizados para producir brotes transformados de acuerdo con la presente invención contienen bajas concentraciones de hormona. Preferiblemente, el medio contiene aproximadamente menos de 10% de las concentraciones de hormona que están presentes en medios convencionales. Más preferiblemente, estos nuevos medios no contienen ninguna hormona.

La invención proporciona por lo tanto un método para crear plantas de cultivo transgénicas sin marcadores ni estructura. Proporciona un medio para la selección de plantas comercialmente aceptables sin elementos de ADN externos, tales como genes de resistencia a los antibióticos y elementos genéticos bacterianos. Con el uso de un borde derivado de la planta (los ADN-P) y transgenes derivados de la planta, se convierte en rutinario crear todos los transgénicos nativos utilizando este método.

La presente invención utiliza un plásmido de ADN que contiene un casete de un gen biosintético de citoquinina situado en una región fuera de un ADN-P y asociado con el ADN de mantenimiento del plásmido también conocido como ADN de la estructura del vector. El gen de la isopentenil transferasa (*ipt*), cuando se expresan de forma estable en una célula de una planta transgénica, induce la regeneración de plantas fisiológica y morfológicamente aberrantes (véase la Figura 1). La planta que surge de células establemente transformadas con *ipt* muestra una morfología anormal debido a la producción constante de citoquinina (Li y colaboradores, *Devel. Biol.*, 153: 386-395, 1993; Machackova y colaboradores, *Plant Growth Reg.* 21: 27-36, 1997). El gen de *ipt* se aisló de *Agrobacterium tumefaciens* y codifica la enzima que produce el primer compuesto intermedio en la biosíntesis de citoquinina. En consecuencia, *ipt* utilizado en la estructura se convierte en un marcador visual de eventos de integración a la estructura. Otros utilizan el gen *ipt* de tal manera que eliminan las plantas que contienen secuencias indeseables de la estructura (solicitud de patente de los Estados Unidos No. 2004/0237142A1 y Rommens y colaboradores 2004).

En la presente invención, se aprovecha la tendencia de sobreexpresión de *ipt* para inducir la regeneración de plantas con fenotipos normales que muestran dominancia apical y de la raíz fácilmente en un medio libre de hormonas. Un porcentaje de estos brotes normales tiene el transgén de interés modificado dentro del ADN-P. Este método es generalmente más eficiente en la producción de brotes libres de marcadores que los métodos publicados anteriormente (Mihalka y colaboradores, *Plant Cell Rep.* 21: 778-784, 2003) y tiene el beneficio adicional de selección contra la integración en la estructura. No se necesitan mutantes "disparadores" especiales y la construcción binaria es sencilla, requiriendo solamente la adición de un casete de expresión de un gen biosintético de citoquinina en la estructura.

Se han descrito métodos que utilizan promotores inducibles ligados al gen *ipt* colocado dentro de los bordes del ADN-T. (Patentes de los Estados Unidos. Nos. 6.452.068 y 6.326.192). Esta estrategia emplea *ipt* para conducir la regeneración y elude el problema de la morfología aberrante creado por la expresión constante de *ipt*. Sin embargo, las plantas transgénicas continuarán portando el gen *ipt*. La presente invención utiliza *ipt* para conducir la regeneración pero elimina la necesidad de crear un vector tan complejo y permite la generación de transgénicos libres de ADN externo y libres de marcadores. La presente invención evita también la etapa de inducción. En la presente invención, el gen *ipt* se expresa preferentemente constitutivamente.

Los genes biosintéticos de citoquinina incluyen al gen 1 independiente de citoquinina (CDK-1) que también proporciona un fenotipo tipo *ipt* (Kakimoto, Science 274: 982-985, 1996). Otros genes biosintéticos de citoquinina incluyen ESR-2 (patente de los Estados Unidos No. 6.441.276) y ESR-1A (patente de los Estados Unidos No. 6.407.312).

El vector utilizado para demostrar este sistema fue previamente descrito en Rommens y colaboradores, 2004 (solicitud de patente de los Estados Unidos No. 2003/0221213A1). En lugar de ser un vector típico de ADN-T, se reemplazan los bordes del ADN-T con secuencias como las del borde de la planta. Este ADN de la planta (ADN-P) soporta una transferencia efectiva de ADN de plásmidos binarios de *Agrobacterium* al genoma de las células de la planta. La generación de plantas intragénicas sin ADN extraño se ve facilitada por la derivación de tales ADN-P.

#### Ejemplos

##### Ejemplo 1: Vectores de ADN para experimentos de prueba de concepto

Aquí se demuestra el uso de un único binario con un gen biosintético de citoquinina como el gen de la citoquinina isopentenil transferasa (*ipt*) en la estructura y el gen de interés en el ADN-P para generar plantas sin estructura y sin marcadores. Los constructos genéticos contienen el gen de interés *nptII*, (neomicina fosfotransferasa II) dentro de los bordes izquierdo y derecho de ADN-P conducidos por un promotor constitutivo expresado en el callo y en la plántula en desarrollo (por ejemplo el promotor de ubiquitina-7) que terminan en la secuencia de terminación 3' del gen de ubiquitina-3. Dentro de la estructura del mismo binario se inserta el(los) gen(es) de la hormona conducidos por el promotor de ubiquitina y terminados por la secuencia de terminación 3' del gen de la ubiquitina 3. El casete del gen de la hormona se coloca cerca de la secuencia del borde izquierdo (240 pares de bases de la secuencia de la estructura separan al terminador de ubiquitina 3 del inicio del borde izquierdo). Colocando el casete del gen sintético de citoquinina tan cerca como sea posible del borde izquierdo maximiza la utilidad del(de los) gen(es) como marcadores contra la integración de la estructura ya que la endonucleasa VirD2 de *Agrobacterium* puede cortar dentro de la estructura en sitios al azar en lugar de en el LB. El diseño básico de un plásmido de la presente invención se ilustra en la Figura 2. El vector de control contiene un casete de expresión idéntico de ADN-P, pero no contiene el(los) gen(es) biosintético(s) de citoquinina en la estructura del vector. El gen de interés puede ser cualquier cantidad de genes agronómicos o detectables puntuables, pero se escogió *nptII* como un marcador fácilmente detectable para propósitos de la experimentación. Los elementos del borde derecho e izquierdo pueden ser sustituidos con otros elementos similares que actúan como sitios de corte para endonucleasas de *Agrobacterium*.

##### Ejemplo 2: Producción de plantas de patata transformadas y libres de estructura que contienen constructos de prueba

Se usan cepas desarmadas de *Agrobacterium tumefaciens* (tales como LBA4404) para suministrar el ADN-P que contiene el gen de interés *NptII* y la estructura que contiene el gen *ipt* en las células de los explantes internodales de patata. Se cultivaron diluciones diez veces diluidas de cultivos durante la noche del *Agrobacterium* que alberga este vector durante 5 a 6 horas. Se precipitó este cultivo a 2800 rpm, se lavó con medio MS líquido (sales de MS 1X, 3% de sacarosa, pH 5,7) y se lo resuspendió en el mismo hasta una  $DO_{600}$  de 0,2. El cocultivo de *Agrobacterium* con explantes de patata se hizo en medio de cocultivo (sales de MS 0,1X, 3% de sacarosa, 0,7% de FitoAgar, pH 5,7) durante 2 días. Después del cocultivo, se transfieren los explantes a un medio Murashige/Skoog libre de hormonas (sales de MS 1X, 3% de sacarosa, 0,7% de FitoAgar, pH 5,7) y 150 mg/ml de Timentina para eliminar el *Agrobacterium*. Alternativamente, los explantes pueden ser transferidos a un medio que contiene auxina (por ejemplo, NAA a razón de 0,1 mg/l) o citoquinina (por ejemplo, ribósido zeatina a razón de 0,25 g/l) en niveles que no promueven la regeneración de brotes no transformados, pero mejoran la regeneración de brotes producidos a través de la expresión de *ipt*.

Después de un mes se transfirieron los explantes al nuevo medio de la misma composición. Dependiendo de la variedad cultivada y de las condiciones de cultivo, los brotes aparecen después de aproximadamente un mes. Esto no es cierto para los explantes infectados con el control vector. No surgen brotes de tales explantes de control. Durante el segundo mes, se corta un brote de apariencia normal de cada explante que proporcione uno. Generalmente, no se toma más que un brote de modo que los clones de un solo evento de transformación no producen confusión en los resultados finales. Se observan brotes con fenotipos normales que se arraigan en medio MS sin hormonas y no tienen ramificación, brotes múltiples ni apariencia clorótica. Se toma una muestra de tejido para análisis por PCR para verificar la presencia del gen de interés y la ausencia de secuencias de estructura.

- 5 Los explantes internodales de patata normalmente producen brotes dentro de 4 a 6 semanas en medio MS sin hormonas. La variedad de cultivo Bintje produjo más brotes por explante e inició la formación de brotes antes que la variedad de cultivo Russet Ranger. En dos experimentos independientes, 75% y 89% de todos los explantes de la variedad de cultivo Bintje produjeron al menos un brote normal (sin germinación, mostrando dominancia apical). Esto difiere ligeramente de la variedad de cultivo Ranger donde sólo 59% de los explantes formó al menos un brote normal.
- También se encontró que la aplicación del método a otras variedades tales como Atlantic, All Blue, Purple Valley y Borah Valley produjo brotes en un lapso de aproximadamente 4-6 semanas después de la infección del explante.
- 10 Se usa un método con base en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para registrar las plantas con respecto a la presencia o ausencia de las secuencias de ADN-P (casete de nptII) y de la estructura del vector (casete de *ipt*). El casete de *ipt* es adyacente al LB y un resultado positivo PCR para este indica que ha ocurrido la transferencia de las secuencias del vector más allá del LB. La Tabla 1 muestra los resultados para el análisis de la PCR.
- 15 En experimentos usando la variedad cultivada Bintje, tanto el análisis fenotípico como molecular demostraron que un promedio de 5% de brotes sin estructura de aspecto normal (que tienen dominancia apical, sin germinación) son positivos para el gen de interés. En experimentos usando la variedad de cultivo Ranger, la PCR para el gen de interés indicó que un promedio de 7% de los brotes de aspecto normal (que tienen dominancia apical, sin germinación) son positivos para el gen de interés.
- 20 Cuando se transformó la variedad de cultivo Bintje usando un vector binario que utiliza bordes de ADN-T en lugar de los bordes de ADN-P, se determinó que las frecuencias de las plantas libres de estructura y libres de marcadores son comparables a aquellas obtenidas con los bordes de ADN-P (Tabla 1).
- 25 Estos resultados muestran el beneficio conferido por la adición de un casete de *ipt* expresado constitutivamente a la estructura para eliminar los eventos de integración de la estructura. También es evidente la simplicidad del uso de esta estrategia cuando no se requieren hormonas para regenerar brotes libres de marcadores y no se añaden correcciones al medio para eliminar secuencias de la estructura.
- 30 Ejemplo 3: Producción de plantas de tomate transformadas y libres de estructura que contienen constructos de prueba
- Se germinan semillas de tomate esterilizadas (variedad de cultivo MoneyMaker) en medio MS solidificado con gelrite (1%) a 24°C con un período de luz de 16 h. Las plántulas se cultivaron durante 8 días antes de la explantación en cuyo momento se corta cada cotiledón en 3 partes en un medio MS líquido y se cortan los hipocotilos en segmentos de 10 mm de largo.
- 35 Se usan cepas desarmadas de *Agrobacterium tumefaciens* (tales como LBA4404) para suministrar el ADN-P que contiene el gen de interés NptII y la estructura que contiene el gen *ipt* en las células de los explantes de tomate. Después del cocultivo, se transfieren los explantes a medio Murashige / Skoog sin hormonas (sales de MS 1X, 3% de sacarosa, 0,7% de Phytagar, pH 5,7) y 150 mg/ml de timentina para eliminar el *Agrobacterium*. Alternativamente, se pueden transferir los explantes a un medio que contiene auxina (por ejemplo, IAA a razón de 0,1 mg/l) o citoquinina (por ejemplo, ribósido de zeatina a razón de 0,2 g/l) a niveles que no promuevan la regeneración de brotes no transformados. Los explantes de hipocotilo de tomate de la variedad de cultivo MoneyMaker producen brotes en 4-8 semanas en medio MS con cantidad limitada de hormonas o libre de hormonas. Los explantes de cotiledones de tomate no formaron brotes en medio MS libre de hormonas lo que demuestra la necesidad de encontrar el material de explante adecuado para el método descrito en la invención. Se cortó únicamente un brote con apariencia normal de cada explante para garantizar que no se tomaran las réplicas de un evento de transformación único. Una vez que los brotes se arraigaron, se tomó una muestra de tejido de la hoja para análisis de PCR. Únicamente se tomaron muestras de brotes arraigados de apariencia normal para verificación molecular posterior. Las plantas que contienen el casete de *ipt* eran claramente anormales con múltiples brotes, un color clorótico e inhabilidad para arraigarse efectivamente en el medio MS libre de hormonas.
- 40
- 45
- 50 La Tabla 2 muestra los resultados de los análisis fenotípico y de PCR. Dos ensayos independientes con tomate (variedad cultivada MoneyMaker) demostraron que 2% de apariencia normal (que tenían dominancia apical, sin germinación) fueron positivos para el transgén de interés y negativos para estructura.
- 55 Ejemplo 4: Producción de plantas de tabaco transformadas y sin estructura que contienen constructos de prueba
- Se usaron pedazos de hoja de plantas de la variedad Petite Havana de *Nicotiana tabacum* aséptica, *in vitro*, 4 a 6 semanas de edad, cortadas en cuadrados de aproximadamente 0,5 cm<sup>2</sup> como explantes. Se usaron cepas desarmadas de *Agrobacterium tumefaciens* (tales como LBA4404) para suministrar el ADN-P que contiene el gen de interés NptII y la estructura que contiene el gen *ipt* en las células de los explantes de hoja de tabaco. Después del cocultivo, se transfirieron los explantes se transfirieron al medio Murashige/Skoog libre de hormonas (sales de 1X MS, 3% de sacarosa, 0,7% de
- 60

Phytagar, pH 5,7) y 150 mg/ml de timentina para eliminar el *Agrobacterium*. Alternativamente, se pueden transferir los explantes a un medio con una cantidad limitada de hormonas que contenía auxina (por ejemplo, NAA a razón de 0,1 mg/l) o citoquinina (por ejemplo BAP a razón de 0,1 g/l) en niveles que no promueven la regeneración de los brotes no transformados. Los brotes son evidentes 4-6 semanas después de la infección. Se cortó únicamente un brote con apariencia normal de cada explante de hipocotilo para garantizar que no se tomaran réplicas de un solo evento de transformación.

La Tabla 3 muestra los resultados de los análisis fenotípicos y de PCR. Dos ensayos de tabaco demostraron que, en promedio, 13% de los brotes regenerados de aspecto normal (con dominancia apical, sin germinación) fueron positivos para el transgén de interés y negativos para estructura.

El método se puede aplicar a otras especies de plantas solanáceas incluyendo pimiento, berenjena, *Solanum phureja*, y petunia.

Ejemplo 5: Producción de plantas de canola transformadas y libres de estructura que contienen constructos de prueba

Se cortan segmentos entre los nodos de aproximadamente 6-12 mm de longitud de plantas de canola asépticas que crecen en forma sana y activa, (*Brassica napus*, variedad de cultivo Westar). Como fuente de plantas patrón asépticas, se deben cultivarlas plántulas arraigadas de 4 a 6 semanas en medio 0,5 X MS, 1,5% de sacarosa y solidificado con gelrite. Se determinó que los explantes de hipocotilo no son adecuados para el método descrito en la invención, ya que únicamente forman raíces en medio MS libre de hormonas de la planta. Los explantes de peciolo del cotiledón son también propensos a enraizamiento y a una pobre regeneración en medio de regeneración libre hormonas. Se usan cepas desarmadas *Agrobacterium tumefaciens* (tales como LBA4404) para suministrar el ADN-P que contiene el gen de interés *nptII* y la estructura que contiene al gen *ipt* conducido por el promotor de ubiquitina-7 en las células de los explantes internodales de canola. Después del cocultivo, se transfieren los explantes a medio Murashige/Skoog libre de hormonas (sales de MS 1X, 3% de sacarosa, 0,7% de Phytagar, pH 5,7) y 150 mg/ml de timentina para eliminar el *Agrobacterium*. Alternativamente, los explantes se pueden transferir al medio que contiene auxina (por ejemplo, NAA a razón de 0,1 mg/l.) o citoquininas (por ejemplo ribósido zeatina a razón de 0,2 g/l) en niveles que no promoverán la regeneración de brotes no transformados. Dependiendo de la condición del material del explante y de las condiciones de crecimiento, de los explantes se empiezan a formar brotes aproximadamente después de un periodo de meses y continúan creciendo hasta 4 semanas más. Se cortó únicamente un brote con apariencia normal de cada explante de hipocotilo para garantizar que no se tomaran réplicas de una solo evento de transformación.

La Tabla 4 muestra los resultados de los análisis fenotípico y de PCR. Dos experimentos demostraron que, en promedio, 3% de los brotes regenerados de aspecto normal (con dominancia apical, sin germinación) fueron positivos para el transgén de interés y negativos para estructura.

El método se puede aplicar también a otras especies de Brassica.

Ejemplo 6: Producción de plantas de manzana transformadas y libres de estructura que contienen constructos de prueba

Se mantienen plantas de la variedad cultivada Golden Delicious de *Malus x domestica* *in vitro* en medio de proliferación de brotes (sales de MS, BAP 5  $\mu$ M y 0,7% de agar). Los cultivos de brotes se mantienen a 25°C con un periodo de luz de 16: 8 horas. Se recolectan hojas jóvenes en expansión de 3 semanas de edad de cultivos de brotes en agua estéril y se cortaron en 3 - 4 segmentos en forma perpendicular a la nervadura central. Se mezclan los explantes de hojas con una suspensión de *Agrobacterium* con una  $DO_{600} = 0,2$  durante 10 minutos. Se transfieren los segmentos foliares a un papel filtro estéril para eliminar el exceso de células bacterianas y se cocultivan en un medio de cocultivo (medio basal MS, tiazurón 3  $\mu$ M (TDZ), NAA 5  $\mu$ M, 0,2% gelrite) con la superficie adaxial hacia arriba. Después de 2 días, se transfieren los explantes a medio MS con 150 mg/l timentina y se solidifica con agar (0,7%). En este caso, se usó medio libre de hormonas. Alternativamente, se pueden transferir los explantes a medio que contiene auxina (por ejemplo, NAA a razón de 5  $\mu$ M) o citoquinina (por ejemplo TDZ a razón de 0,03  $\mu$ M) en niveles que no promoverán los brotes no transformados, pero que podrían mejorar la regeneración de los brotes afectados por la sobreexpresión de *ipt*. Se transfieren los explantes a medio MS fresco pobre en hormonas o libre de hormonas cada 2-4 semanas. Para el periodo inicial de 2 semanas, se mantienen los cultivos en la oscuridad a 24°C, y luego se mueven a la luz. Se transfieren brotes verdes de apariencia normal (que no muestran fenotipo positivo para *ipt*) a un medio MS libre de hormonas, con 50 mg/l de kanamicina para detectar la presencia del gen de interés. Se transfieren los brotes supervivientes positivos para el gen de interés a un medio de proliferación después de 4 semanas en un medio de detección. Se recolectan las muestras para confirmación molecular.

También se puede aplicar el método para transformar otros árboles frutales incluyendo pera, cerezas, y ciruela.

Ejemplo 7: Uso de medio con cantidad restringida de hormonas

Como se describe aquí, es posible añadir pequeñas cantidades de hormonas al medio. Estas cantidades generalmente no son suficientes para inducir la formación de brotes en explantes no infectados. Se infectan explantes de Brócoli (variedad cultivada Green Comet) con cepas desarmadas de *Agrobacterium tumefaciens* que suministran el ADN-P que contiene el gen de interés nptII y la estructura que contiene el gen *ipt* en las células. Los explantes son secciones de 5x5 mm de hojas jóvenes de plantas cortadas de plantas de 5 semanas de edad mantenidas *in vitro*. Después de dos días de cocultivo se transfieren los explantes a medio Murashige/Skoog (sales 1X MS, Vitaminas de Gamborg 1x, 3% de sacarosa, 0,7% de Phytagar, pH 5,7, 150 mg/ml de timentina) complementado con 0,5, 1, 2 o 4 mg/l de NAA. Se mantienen las placas a 25°C con un período de luz de 16/8 h. Después de un mes se transfirieron los explantes a medio nuevo de la misma composición. Únicamente se cortó un brote con apariencia normal de cada explante de hipocotilo para garantizar no tomar replicas de un único evento de transformación. Se transfieren brotes verdes de apariencia normal (que no muestran fenotipo positivo para *ipt*) a un medio MS libre de hormonas, con 25 mg/l de kanamicina para detectar la presencia del gen de interés. Se transfieren los brotes supervivientes positivos para el gen de interés a un medio MS sin kanamicina y se solidifica con agar después de 4 semanas en un medio de detección. Las muestras se recolectan para confirmación molecular.

La combinación de citoquinina producida por el gen *ipt* y NAA aplicado en forma exógena crea transgénicos o intragénicos libre de marcador, libres de estructura.

Ejemplo 8: Empleo de genes hormonas alternativas (como referencia)

Aquí se demuestra el uso de un vector binario único con el gen del factor de transcripción AP2 / ERF de Baby Boom (BBM) en la estructura y el gen de interés en el ADN-P para generar plantas libres de marcador libres de estructura. El constructo contiene el gen de interés nptII, dentro de los bordes izquierdo y derecho de ADN-P conducidos por un promotor constitutivo expresado en el callo y la plántula en desarrollo (por ejemplo, promotor de ubiquitina 7) terminado por la secuencia de terminación 3' del gen de la ubiquitina 3. Dentro de la estructura del mismo vector binario se inserta el gen de BBM mediante el promotor de ubiquitina y terminado por la secuencia de terminación 3' del gen ubiquitina 3. Se coloca el casete del gen biosintético de la hormona cerca de la secuencia del borde izquierda (240 pares de bases de la secuencia separan al terminador de la ubiquitina-3 del inicio del borde izquierdo). Se utilizan cepas de *Agrobacterium tumefaciens* desarmadas (tales como LBA4404) para suministrar el ADN-P dentro de las células de los explantes internodales de patata. Se cultivaron diluciones diluidas diez veces de cultivos durante la noche de *Agrobacterium* durante 5 a 6 horas. Se precipitó este cultivo a 2800 rpm, se lo lavó con medio MS líquido (sales 1X de MS, 3% de sacarosa, pH 5,7) y se lo resuspendió en el mismo medio hasta una DO<sub>600</sub> de 0,2. El cocultivo de *Agrobacterium* con explantes de patata se produjo en medio de cocultivo (sales de MS 0,1X, 3% de sacarosa, 0,7% de Phytagar, pH 5,7) durante 2 días. Después del cocultivo, se transfieren los explantes a medio Murashige/Skoog libre de hormonas (sales MS 1X, 3% de sacarosa, 0,7% de Phytagar, pH 5,7) y 150 mg/ml de timentina para eliminar el *Agrobacterium*. Alternativamente, se pueden transferir los explantes a un medio que contiene auxina (por ejemplo, NAA a razón de 0,1 mg/l) o citoquinina (por ejemplo, ribósido de zeatina a razón de 0,25 g/l) a niveles que generalmente no promoverán la regeneración de brotes no transformados. Después de un mes, se transfieren los explantes a medio nuevo de la misma composición. Las plántulas que surgen de los eventos de transformación, donde las secuencias del vector que incluyen BBM se integran de forma estable, tienen un fenotipo anormal. Las plántulas enanas con dominancia apical reducida y hojas arrugadas con márgenes ondulados se ignoran. Se corta un brote de aspecto normal de cada explante que tenga uno. Se toma una muestra de tejido para análisis de PCR para verificar la presencia del gen de interés y la ausencia de secuencias de la estructura.

También es posible combinar más de un gen de síntesis de citoquinina en la misma estructura binaria o combinar un gen de citoquinina junto con un gen de síntesis de auxina.

Ejemplo 9: Transformación de ADN nativo completamente libre de marcador y libre de estructura

Los anteriores ejemplos demuestran la utilidad de colocar un gen o genes de biosintéticos de la planta en la estructura del vector que alberga el gen de interés dentro del ADN-P para generar transgénicos libres de marcador. Se coloca un constructo complejo que porta dos grandes repeticiones invertidas (Figura 3) entre los bordes de ADN-P. Dentro de la estructura del mismo binario se inserta el gen *ipt* biosintético de citoquinina conducido por el promotor de ubiquitina y terminado por la secuencia de germinación 3' del gen ubiquitina 3. Se cultivaron diluciones diluidas diez veces de cultivos durante la noche del *Agrobacterium* que alberga este vector durante 5 a 6 horas. Se precipitó este cultivo a 2800 rpm, se lo lavó con medio MS líquido (sales de MS 1X, 3% de sacarosa, pH 5,7) y se lo resuspendió en el mismo medio hasta una DO<sub>600</sub> de 0,2. El cocultivo de *Agrobacterium* con 21,000 explantes de patata Russet Ranger se produjo en medio de cocultivo (sales de MS 0,1X, 3% de sacarosa, 0,7% de Phytagar, pH 5,7) durante 2 días. Después del cocultivo, se transfieren los explantes a medio Murashige/Skoog pobre en hormonas (sales de MS 1X, 3% de sacarosa, 0,7% de Phytagar, pH 5,7) y 150 mg/ml de timentina para eliminar el *Agrobacterium*. Alternativamente, se pueden transferir los explantes a un medio que contienen auxina (por ejemplo, NAA a razón de 0,1 mg/l) o citoquinina (por ejemplo, ribósido de zeatina a razón de 0,25 g/l) a niveles que no promueven la regeneración de brotes no transformados. Después de un mes, se transfieren los explantes a medio nuevo de la misma composición. Comienzan a surgir los brotes en aproximadamente

5 uno y medio meses. Durante el segundo mes y el tercer mes, se cortan brotes de apariencia normal de los explantes. Cerca del 65% de todos los explantes formaron brotes de aspecto normal después de 3 meses sobre un medio pobre en hormonas. Se observan brotes con fenotipos normales para enraizamiento en medio MS sin hormonas y no tienen una apariencia clorótica ramificada y de brotes múltiples.

10 Se utiliza un método basado en la PCR para contabilizar las plantas por la presencia o ausencia de secuencias ADN-P y de la estructura del vector. De los 6.500 brotes de aspecto normal contabilizados por la PCR, 65 (1%) fueron positivos para el gen de interés y carecían de ADN de estructura. Estos resultados muestran que incluso los ADN de transferencia extremadamente complejos se pueden introducir en forma efectiva en plantas utilizando el método de transformación libre de marcador y libre de estructura.

Tablas

15 Tabla 1. Los resultados experimentales de la frecuencia de eventos libres de marcadores y libres de estructura en el cultivo Solanáceo de patatas (variedades de cultivo Russet Ranger y Bintje de *Solanum tuberosum*) \* Los brotes normales son aquellos que no tienen un fenotipo inducido por *ipt*. Los brotes positivos para *ipt* son cloróticos, germinados, carecen de dominancia apical y no se enraízan o lo hacen pobremente sobre medio MS libre de hormonas.

Variedad de cultivo	No. de explantes infectados	No. de brotes normales muestreados*	No. de eventos con el gen de interés & sin estructura
Bintje	250	100	6
	250	100	5
	250	100	5
Ranger	250	100	10
	250	100	5
	250	100	5

20 Tabla 2. Los resultados experimentales de la frecuencia de eventos libres de marcadores y libres de estructura en el cultivo Solanáceo de tomate (variedad de cultivo MoneyMaker de *Lycopersicon esculentum*) \* Los brotes normales son aquellos que no tienen un fenotipo inducido por *ipt*. Los brotes positivos para *ipt* son cloróticos, germinados, carecen de dominancia apical y no se enraízan o lo hacen pobremente sobre medio MS libre de hormonas.

Variedad de cultivo	No. de explantes infectados	No. de brotes normales muestreados*	No. de eventos con el gen de interés & sin estructura
MoneyMaker	294	42	1
	286	60	1

25 Tabla 3. Los resultados experimentales de la frecuencia de eventos libres de marcadores y libres de estructura en el cultivo Solanáceo de tabaco (variedad de cultivo Petite Havana de *Nicotiana tabacum*) NA = datos no disponibles \* Los brotes normales son aquellos que no tienen un fenotipo inducido por *ipt*. Los brotes positivos para *ipt* son cloróticos, germinados, carecen de dominancia apical y no se enraízan o lo hacen pobremente sobre medio MS libre de hormonas.

Variedad de cultivo	No. de explantes infectados	No. de brotes normales muestreados*	No. de eventos con el gen de interés & sin estructura
Petite Havana	100	88	NA
	100	62	NA

30 Tabla 4. Los resultados experimentales de la frecuencia de eventos libres de marcadores y libres de estructura en el cultivo Crucífero de canola (variedad de cultivo Westar de *Brassica napus*) \* Los brotes normales son aquellos que no tienen un fenotipo inducido por *ipt*. Los brotes positivos para *ipt* son cloróticos, germinados, carecen de dominancia apical y no se enraízan o lo hacen pobremente sobre medio MS libre de hormonas.

Variedad de cultivo	No. de explantes infectados	No. de brotes normales muestreados*	No. de eventos con el gen de interés & sin estructura
Westar	146	46	1
	68	20	1

Reivindicaciones

- 5 1. Un método para producir una planta transformada que no contiene un marcador seleccionable en su genoma, que comprende (a) infectar células de plantas con *Agrobacterium* que contiene un vector binario único que comprende (i) un ADN de transferencia que contiene un gen de interés y (ii) un casete de expresión que contiene un gen biosintético de la hormona de una planta posicionado en la estructura fuera del ADN de transferencia, para expresar un gen biosintético de citoquinina; (b) cultivar las células en un medio libre de hormonas para producir brotes; (c) identificar un brote que tiene ADN genómico que contiene el ADN de transferencia pero no el casete de expresión del gen biosintético de citoquinina por selección sin el uso de genes de resistencia a los antibióticos; y (d) cultivar una planta de a partir del brote identificado de (c), en donde la planta es una planta transformada que no contiene un gen biosintético de la hormona de la planta en su genoma.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en donde el gen biosintético de citoquinina se selecciona de entre un gen de isopentenil transferasa, un gen 1 independiente de citoquinina (CDK-1), un gen ESR-2 y un gen ESR-1A.
- 15 3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde la expresión de una secuencia de ácido nucleico en el ADN de transferencia modifica un rasgo en la planta transgénica resultante, en donde el rasgo es al menos uno de (i) niveles más bajos de acrilamida, (ii) lesiones reducidas de manchas negras, y (iii) endulzamiento reducido inducido por frío en comparación con una planta que no contiene una célula que exprese esa secuencia de ácido nucleico.
- 20 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el vector binario único está en una cepa de *Agrobacterium* y la etapa de transformación comprende poner en contacto la célula de la planta con la cepa de *Agrobacterium*.
- 25 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el ADN de transferencia comprende secuencias de ácido nucleico que son nativos al genoma de la célula de la planta.
- 30 6. Un método para producir una planta transformada que no contiene un marcador seleccionable en su genoma, que comprende (a) infectar células de plantas con *Agrobacterium* que contiene un vector binario único que comprende (i) un ADN de transferencia que contiene un gen de interés y (ii) un casete de expresión que contiene un gen biosintético de la hormona de una planta posicionado en la estructura fuera del ADN de transferencia, para expresar un gen biosintético de citoquinina; (b) cultivar las células en un medio libre de hormonas para producir brotes; (c) cultivar los brotes en plantas; y (d) identificar una planta que tiene ADN genómico que contiene el ADN de transferencia, pero no el gen biosintético de citoquinina por selección sin el uso de genes de resistencia a antibióticos, en donde la planta de (d) es una planta transformada que no contiene un gen biosintético de la hormona de la planta en su genoma.
- 35 7. El método de la reivindicación 6, en donde el gen biosintético de citoquinina se selecciona a partir de todo el gen de isopentilo transferasa, un gen 1 independiente de citoquinina un gen ESR-2, y un gen ESR-1A.
- 40 8. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde las células de las plantas están en un explante.
- 45 9. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde las células de la planta son de una planta seleccionada a partir de patata o de tomate.

Figura 1. Fenotipo normal (negativo para ipt) versus anormal (positivo para ipt) en tabaco y patata. Las plantas que sobreexpresan ipt tienden a carecer de dominancia apical dando como resultado una condición altamente ramificada, germinada. Ellas tienden también a ser cloróticas y pobremente enraizadas o sin ningún enraizamiento en el medio MS sin hormonas. Los brotes positivos para ipt se ilustran a la derecha de cada imagen.

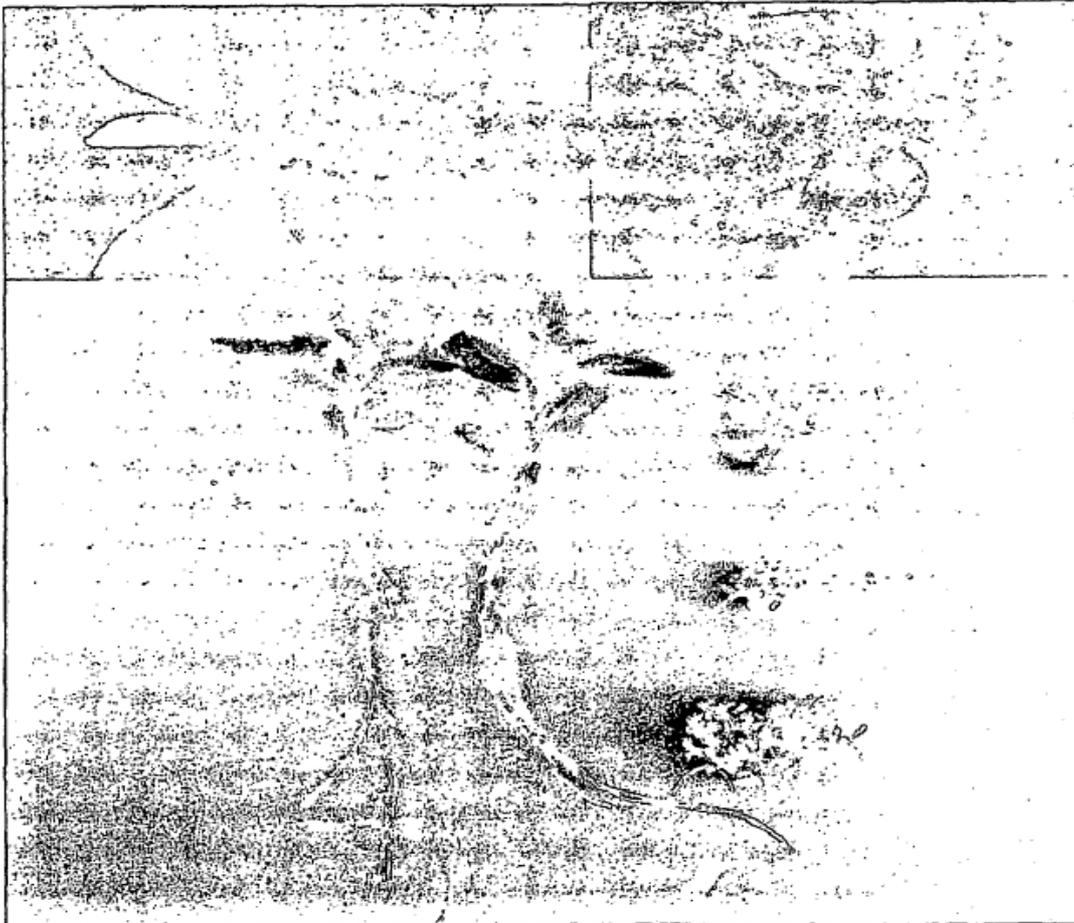


Figura 2. Diagrama esquemático que muestra la estructura base del plásmido binario descrito en esta invención. El ADN de transferencia (ADN-P o ADN-T) está delineado por el borde derecho (RB) y el borde izquierdo (LB) y contiene el gen de interés (GOI). La región fuera del ADN de transferencia se refiere a la estructura y contiene el gen biosintético de la hormona de la planta (ipt).

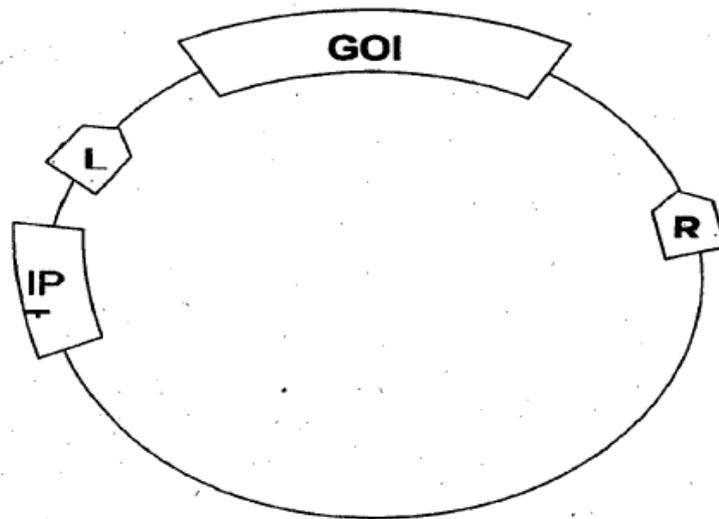


Figura 3. Estructura del ADN-P complejo

