

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 551 256**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/82** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2007 E 12193811 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.09.2015 EP 2562261**

54 Título: **Un procedimiento de mutagénesis mejorado con el uso de la introducción de nucleobases mutágenas en protoplastos vegetales mediante polietilenglicol**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**17.11.2015**

73 Titular/es:

**KEYGENE N.V. (100.0%)  
P.O. Box 216  
6700 AE Wageningen, NL**

72 Inventor/es:

**DE BOTH, MICHIEL THEODOOR JAN;  
BUNDOCK, PAUL y  
LHUISSIER, FRANCK GEORGES PAUL**

74 Agente/Representante:

**PONTI SALES, Adelaida**

**ES 2 551 256 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

Un procedimiento de mutagénesis mejorado con el uso de la introducción de nucleobases mutágenas en protoplastos vegetales mediante polietilenglicol

5

Campo de la invención

**[0001]** La presente invención es según se define en las reivindicaciones y se refiere a un procedimiento para la producción de una célula vegetal, una planta, un callo vegetal o un tallo, en que el procedimiento comprende la realización de una alteración dirigida de una secuencia de ADN aceptor bicatenario en un protoplasto de una célula vegetal, que comprende la combinación de la secuencia de ADN aceptor bicatenario con una nucleobase mutágena monocatenaria donante, en que la secuencia de ADN aceptor bicatenario contiene una primera secuencia de ADN y una segunda secuencia de ADN que es el complemento de la primera secuencia de ADN y en que la nucleobase mutágena monocatenaria donante comprende al menos un emparejamiento erróneo con respecto a la secuencia de ADN aceptor bicatenario que ha de alterarse, preferentemente con respecto a la primera secuencia de ADN, en que el procedimiento comprende además una etapa de introducción de la nucleobase mutágena monocatenaria en los protoplastos celulares por transformación mediante polietilenglicol (PEG); y la regeneración de una célula vegetal a partir de dicho protoplasto y/o, opcionalmente, la regeneración de un callo vegetal, un tallo y/o una planta. La invención también se refiere al uso de PEG en el procedimiento de la invención.

20

Antecedentes de la invención

**[0002]** El proceso de crear deliberadamente cambios en el material genético de células vivas tiene como objetivo la modificación de una o más propiedades biológicas codificadas genéticamente de tal célula o del organismo del que forma parte la célula o en el que se puede regenerar. Estos cambios pueden tomar la forma de una delección de partes del material genético, una adición de material genético exógeno o cambios en la secuencia nucleotídica existente del material genético. Los procedimientos para la alteración del material genético de los organismos eucariotas se conocen desde hace más de 20 años y su aplicación está ampliamente extendida en células vegetales, humanas y animales, así como en microorganismos, para obtener mejoras en los campos de la agricultura, la salud humana, la calidad alimentaria y la protección ambiental. Los procedimientos más comunes constan de la adición de fragmentos de ADN exógeno al genoma de una célula, los cuales conferirán entonces una nueva propiedad a dicha célula o a su organismo, además de las propiedades codificadas por los genes ya existentes (incluidas aplicaciones en las que la expresión de los genes existentes se suprime en consecuencia). Aunque muchos de estos ejemplos son eficaces para la obtención de las propiedades deseadas, estos procedimientos no son sin embargo demasiado precisos porque no existe un control sobre las posiciones genómicas en las que se insertan los fragmentos de ADN exógeno (y, por tanto, sobre los niveles de expresión definitivos) y porque el efecto deseado deberá manifestarse además de las propiedades naturales codificadas por un genoma original bien equilibrado. Por el contrario, los procedimientos de mutagénesis dirigida que resultan en la adición, delección o conversión de nucleótidos en locus genómicos predefinidos permitirán la modificación precisa de genes existentes. Además, debido a la naturaleza precisa de la mutagénesis dirigida, se espera que las nuevas líneas de plantas obtenidas de esta manera sean aceptadas más fácilmente por los consumidores.

**[0003]** La mutagénesis dirigida es un procedimiento de mutagénesis de sitios específicos que se basa en la administración al núcleo de la célula eucariota de nucleobases mutágenas sintéticas (moléculas de constan de pequeños tramos de fracciones similares a nucleótidos que se asemejan al ADN en sus propiedades de emparejamiento de bases según Watson y Crick, pero que pueden ser químicamente diferentes del ADN) (Alexeev y Yoon 1998, Nature Biotechnol. 16: 1343; Rice 2001, Nature Biotechnol. 19: 321; Kmiec 2003, J. Clin. Invest. 112: 632). Una vez introducidas en la célula, tales nucleobases mutágenas se aparean con la secuencia complementaria del locus diana. Al diseñar deliberadamente un emparejamiento erróneo en la nucleobase, este emparejamiento erróneo puede dar lugar a una conversión nucleotídica en la posición correspondiente en la secuencia genómica diana. Este procedimiento permite la conversión de un único o, como máximo, unos pocos nucleótidos en locus endógenos, pero puede aplicarse para crear codones de parada en locus existentes que resulten en la interrupción de su función o para crear cambios de codones que resulten en genes codificantes de proteínas con una composición de aminoácidos alterada (ingeniería de proteínas).

55

**[0004]** La mutagénesis dirigida se ha descrito en células vegetales, animales y de levaduras. Es estos estudios se han usado dos clases diferentes de nucleobases sintéticas, las nucleobases químicas ADN:ARN o nucleobases monocatenarias.

**[0005]** Las nucleobases quiméricas ADN:ARN (quimeras) son moléculas autocomplementarias que constan de una región solo de ADN de 25 pb y una secuencia complementaria de 25 pb formada por una región central de ADN de 5 pb flanqueada a cada lado por 10 pb de ARN 2'-O-metilado que se piensa que añade estabilidad a la quimera en la célula. La región central de 5 pb incluye en su centro un emparejamiento erróneo diseñado para el nucleótido que ha de alterarse en la secuencia diana de ADN genómico. Estas dos regiones están unidas por horquillas de timidina de 4 pb. Al introducir la quimera en la célula, se piensa que forma un lazo D doble con su secuencia diana y se produce un emparejamiento erróneo entre la quimera y el nucleótido diana. Este emparejamiento erróneo se resuelve a continuación por medio de las proteínas endógenas de reparación del ADN celular mediante la conversión del nucleótido genómico. Los primeros ejemplos de mutagénesis dirigida mediante quimeras proceden de células animales (revisado por Igoucheva y col. 2001, *Gene Therapy* 8: 391-399) y también se usaron posteriormente para obtener mutagénesis dirigida en células vegetales (Beetham y col. 1999, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 8774-8778; Zhu y col. 1999, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 8768-8773; Zhu y col. 2000, *Nature Biotech.* 18: 555-558; Kochevenko y col. 2003, *Plant Phys.* 132: 174-184; Okuzaki y col. 2004, *Plant Cell Rep.* 22: 509-512). A diferencia de las células humanas, una célula vegetal en la que ha tenido lugar un suceso de mutagénesis dirigida puede regenerarse para dar una planta intacta y la mutación puede transferirse a la siguiente generación, lo que la convierte en una herramienta ideal para la mutagénesis tanto de investigación como comercial en cultivos alimentarios de importancia. Sin embargo, la investigación intensiva en muchos laboratorios ha demostrado que la frecuencia de mutagénesis dirigida al usar quimeras es bastante baja y variable o incluso no detectable (Ruiter y col. 2003, *Plant Mol. Biol.* 53: 715-729; Van der Steege y col. 2001, *Nature Biotech.* 19: 305-306) y depende de factores tales como el estado transcripcional de la diana, la posición de la célula en el ciclo celular, la secuencia de la diana y la calidad de las quimeras, que son difíciles de sintetizar. Debido a la relativamente baja frecuencia de mutagénesis dirigida con los procedimientos conocidos en la técnica, tales sucesos solo pueden detectarse cuando la alteración de un único nucleótido de la diana genómica resulta en un fenotipo dominante seleccionable. En células vegetales, se han introducido mutaciones puntuales específicas en el marco abierto de lectura del gen de la acetolactato-sintasa (ALS, en maíz AHAS), que cataliza la etapa inicial común a la síntesis de los aminoácidos de cadena ramificada leucina, isoleucina y valina. En tabaco, las alteraciones en solo nucleótido son suficientes para producir las conversiones de codones P194Q o W571L. La proteína ALS producida después de cualquiera de estas conversiones de codones es insensible a la inhibición por los herbicidas de la clase de las sulfonilureas, lo que proporciona un procedimiento para la selección de conversiones de un solo nucleótido en un locus cromosómico.

**[0006]** Debido a las dificultades de trabajar con quimeras, se han buscado diseños de oligonucleótidos alternativos de mayor fiabilidad. Varios laboratorios han investigado la capacidad de nucleobases monocatenarias (mc) para llevar a cabo mutagénesis dirigida. Se ha encontrado que estas dan resultados más reproducibles, son más sencillas de sintetizar y pueden incluir también nucleótidos modificados para mejorar el rendimiento de la nucleobase mutágena en la célula (Liu y col. 2002, *Nucl. Acids Res.* 30: 2742-2750; revisión, Parekh-Olmedo y col. 2005, *Gene Therapy* 12: 639-646; Dong y col. 2006, *Plant Cell Rep.* 25: 457-65; De Piédoue y col. 2007, *Oligonucleotides* 27: 258-263).

**[0007]** La mutagénesis dirigida ha sido descrita en diversas solicitudes de patente a nombre de Kmiec, por ejemplo, en los documentos WO 0173002, WO 03/027265, WO 01/87914, WO 99/58702, WO 97/48714 y WO 02/10364. En el documento WO 01/73002 se contempla que la baja eficiencia de alteración génica obtenida al usar nucleobases no modificadas parece ser en gran medida el resultado de su degradación por las nucleasas presentes en la mezcla de reacción de la célula diana. Para solucionar este problema, se propone la incorporación de nucleótidos modificados para hacer las nucleobases resultantes resistentes contra nucleasas. Algunos ejemplos típicos de tales nucleótidos modificados incluyen enlaces fosforioato o análogos 2'-O-metilados. Estas modificaciones se localizan preferentemente en los extremos de la nucleobase, dejando un dominio central sin modificar que rodea a la base diana. En apoyo de esto, la solicitud de patente WO 02/26967 muestra que ciertos nucleótidos modificados que aumentan la vida útil intracelular de la nucleobase aumentan la eficiencia de mutagénesis dirigida en un sistema de ensayo *in vitro* y también en una diana cromosómica de un mamífero. No solo la resistencia a nucleasas, sino también la afinidad de unión de una nucleobase mutágena mc a su ADN diana complementario tiene el potencial de aumentar considerablemente la frecuencia de mutagénesis dirigida. Una nucleobase mc que contiene nucleótidos modificados que aumentan su afinidad de unión puede encontrar más eficientemente su diana complementaria en un genoma complejo y/o permanecer unida a su diana durante más tiempo, siendo menos probable que sea separada por las proteínas que regulan la transcripción y la replicación del ADN. Se ha usado un ensayo de mutagénesis dirigida *in vitro* para analizar numerosos nucleótidos modificados para mejorar la eficiencia del proceso de mutagénesis. Los ácidos nucleicos bloqueados (ANB o LNA) y las C5-propinopirimidinas presentan modificaciones en la fracción del azúcar y la base, respectivamente, que estabilizan la formación de cadenas dobles y aumentan la temperatura de fusión de las mismas. Cuando estos nucleótidos

modificados se incorporan en una nucleobase mc, aumentan la eficiencia de mutagénesis dirigida hasta 13 veces en relación con la obtenida con una nucleobase de la misma secuencia sin modificar. Véanse a este respecto los documentos WO 2007073166 y WO 2007073170 a nombre de los presentes solicitantes. Los presentes inventores se han propuesto mejorar la frecuencia de mutagénesis dirigida en células vegetales mediante la optimización del procedimiento usado para la introducción de las nucleobases mutágenas en dichas células vegetales. El procedimiento de uso más extendido para la transformación de células vegetales, la transformación mediante *Agrobacterium*, transfiere una sección de su plásmido inductor de tumores (Ti), el denominado ADN-T, a las células vegetales, donde se integra eficientemente en el genoma vegetal en una posición aleatoria. El ADN-T está flanqueado en los dos extremos por secuencias de "borde" de hasta 22 pb derivadas del plásmido Ti, que no tienen homología con la secuencia diana. Dada la poca longitud de las nucleobases mc usadas para la mutagénesis dirigida, las secuencias de borde podrían interferir en el proceso. Por lo tanto, la mutagénesis dirigida en células vegetales solo puede conseguirse a través de la transferencia directa del ADN mediante procedimientos químicos o físicos.

En la bibliografía se han descrito varias de estas técnicas de transferencia directa de ADN que incluyen la electroporación, el tratamiento de protoplastos con polietilenglicol (PEG), el bombardeo biolístico de material de callo vegetal y la microinyección de ADN en protoplastos o tejidos individuales. El estado de la técnica no proporciona ninguna indicación con respecto a un procedimiento preferido para la transferencia de nucleobases mc para la mutagénesis dirigida, en particular para la transferencia de ADN a plantas o a protoplastos vegetales.

Con el fin de conseguir una eficiencia de mutagénesis dirigida en plantas lo más alta posible, en el curso de sus investigaciones, los presentes inventores han identificado cuatro factores que han de optimizarse. En primer lugar, la nucleobase mutágena se introduce preferentemente con una alta eficiencia de transformación, es decir, se introduce en tantas células vegetales como sea posible. En segundo lugar, preferentemente el tratamiento no es letal para la mayoría de las células, lo que asegura que el mayor número de células posible que se transforma también sobrevive el procedimiento de transformación (eficiencia de supervivencia). En tercer lugar, preferentemente el procedimiento de transformación no es perjudicial para las divisiones subsiguientes de las células vegetales transformadas para la formación de microcallos (eficiencia de regeneración/siembra) y, finalmente, preferentemente es posible identificar plantas regeneradas individuales derivadas de sucesos de mutagénesis dirigida sin la aplicación de selección (eficiencia de identificación).

La mayoría de los procedimientos de transformación de ADN en células vegetales individuales usan protoplastos, derivados directamente de hojas (protoplastos de mesofilo) o de suspensiones celulares (revisado por Sheen J. 2001, *Plant Phys.* 127: 1466-1475). Los protoplastos pueden usarse para estudios de expresión transitoria, en cuyo caso puede evaluarse la expresión génica o la localización de proteínas poco después de la transformación, o para la producción de plantas transformadas de manera estable cuando los protoplastos se cultivan en un medio para estimular la formación de callo y la organogénesis.

La transformación de protoplastos vegetales mediante electroporación ha sido descrita previamente (Fromm y col. 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 5824-5828; Nishiguchi y col. 1986, *Plant Cell Rep.* 5: 57-60; Ou-Lee y col. 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 6815-6819; Hauptmann y col. 1987, *Plant Cell Rep.* 6: 265-270; Jones y col. 1989, *Plant Mol. Biol.* 13: 503-511). Generalmente, la fuerza del campo (V/cm) que proporciona la máxima eficiencia de transformación resulta en una supervivencia de los protoplastos inferior al 50 % (Jones y col. 1989, *Plant Mol. Biol.* 13: 503-511). En estudios de electroporación de tabaco, hemos encontrado que solo aproximadamente el 10 % del total de los protoplastos de tabaco en la muestra se transforman con un plásmido que expresa GFP y está relativamente baja eficiencia de transformación también se ha observado después de la electroporación de protoplastos de *Arabidopsis* (Miao y col. 2007, *Nature Protocols* 10: 2348-2353). En general, las condiciones óptimas de electroporación deben determinarse empíricamente para cada especie vegetal y pueden variar también en función del tipo de aparato de electroporación y del procedimiento y los tampones usados para el aislamiento de los protoplastos. Aunque la electroporación se ha aplicado satisfactoriamente a numerosas especies vegetales, aún sigue siendo una técnica difícil, con varias limitaciones importantes (según se discute en: <http://genetics.mgh.harvard.edu/sheenweb/faq.html>), en particular, en cuanto a la reproducibilidad. Por consiguiente, la electroporación es menos deseable para aumentar la eficiencia total de intercambio dirigido de nucleótidos (TNE) en la mutagénesis dirigida.

La transferencia directa de genes mediante administración biolística ha tenido mucho éxito en la generación de plantas de cultivo transgénicas y se usa rutinariamente para la integración estable de transgenes. Se transfieren suspensiones celulares a medio sólido para la inducción de callo y este material se somete al bombardeo de partículas de oro impulsadas por una fuente de gas a alta presión. Se ha descrito que las frecuencias de

- transformación son bajas, con aproximadamente el 0,01 % de las células totales transformadas. Debido a la baja eficiencia de transformación, es difícil evaluar la supervivencia de las células transformadas. Por el contrario, es probable que la eficiencia de regeneración después del bombardeo sea alta, debido que el material que se trata está en intensa división. Sin embargo, dado que el TNE tendrá lugar en una célula individual o en un callo individual, este
- 5 suceso puede perderse fácilmente si no se selecciona o, alternativamente, las plantas regeneradas serán quiméricas para el suceso de mutagénesis dirigida. Por lo tanto, el bombardeo no es práctico para llevar a cabo mutagénesis dirigida en locus no seleccionables. Por el contrario, es posible recuperar sucesos de mutagénesis dirigida usando protoplastos, ya que cada microcallo deriva de un protoplasto individual.
- 10 Las conversiones de un solo nucleótido inducidas por quimeras en ALS han demostrado que la mutagénesis dirigida puede detectarse en células de tabaco, maíz y arroz. El bombardeo se ha usado para tabaco (Beetham y col. 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 8774-8778; Kochevenko y col. 2003, Plant Phys. 132: 174-184), maíz (Zhu y col. 1999 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 8768-8773) y arroz (Okuzaki y col. 2004, Plant Cell Rep. 22: 509-512). Beetham y col. (1999) han descrito que la frecuencia de resistencia a herbicidas después de la transferencia directa de
- 15 quimeras aumenta 20 veces en comparación con la tasa de mutación de fondo (considerada de  $10^{-7}$  a  $10^{-8}$ ). Kochevenko y col. también han usado electroporación para llevar a cabo experimentos de mutagénesis dirigida en protoplastos de mesófilo de tabaco. Los presentes inventores han sido capaces de obtener callos de tabaco resistentes a herbicidas con una frecuencia del 0,0001 %, comparable a la frecuencia obtenida por Beetham y col. Esto sugiere que, cuando se trata de la misma especie vegetal y el mismo nucleótido diana que en este caso, el
- 20 procedimiento directo de administración del ADN no tiene gran impacto en la eficiencia de mutagénesis dirigida, que se mantiene a un nivel indeseablemente bajo. Sin embargo, Ruitter y col. (2003, Plant Mol. Biol. 53, 715-729) han llevado a cabo experimentos de bombardeo y de electroporación en tabaco y en colza y no han podido detectar ningún efecto de las quimeras.
- 25 **[0008]** El bombardeo de callo de maíz y de arroz ha sido descrito con una eficiencia del 0,01 % de células transformadas (Zhu y col. 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 8768-8773; Okuzaki y col. 2004, Plant Cell Rep. 22: 509-512). Sin embargo, esto solo es factible en locus seleccionables. La transformación de protoplastos mediante PEG en sí misma se conoce ya desde 1985. El primer procedimiento de transformación de protoplastos utilizó PEG (Krens y col. 1982, Nature 296: 72-74; Potyrykus y col. 1985, Plant Mol. Biol. Rep. 3: 117-128; Negrutiu y col. 1987,
- 30 Plant Mol. Biol. 8: 363-373). La técnica es aplicable a protoplastos de muchas plantas diferentes (Rasmussen y col. 1993, Plant Sci. 89: 199-207). Se piensa que el PEG estimula la transformación por precipitación del ADN, en presencia de cationes divalentes, sobre la superficie de los protoplastos, desde donde después se internaliza (Maas y Werr 1989, Plant Cell Rep. 8: 148-151). La transformación mediante PEG es el procedimiento elegido para la transformación de protoplastos de *Arabidopsis* (<http://genetics.mgh.harvard.edu/sheen-web/faq.html>) (Mathur y col.
- 35 Methods in molecular biology, vol. 82: 267-276) y satisface plenamente los cuatro requerimientos definidos para que un procedimiento de transformación proporcione un eficiente TNE. Cuando los protoplastos de tabaco se tratan con PEG, puede detectarse un oligonucleótido mc marcado con biotina en todas las células examinadas. La supervivencia, valorada por tinción vital mediante diacetato de fluoresceína, es superior al 90 % después del tratamiento con PEG. No todos los protoplastos mantienen la capacidad de dividirse y formar microcallos. En un
- 40 aislamiento típico de protoplastos de tabaco sin tratar, aproximadamente el 25 % forma microcallos. El tratamiento con PEG tiene un ligero efecto sobre la eficiencia de regeneración, que se reduce a aproximadamente el 10 %, pero esto no es desmesurado, en comparación con otros procedimientos de transformación. Ninguno de los procedimientos del estado de la técnica descritos anteriormente ha contemplado el uso de la transformación mediante PEG para la mutagénesis de sitios específicos, en particular para TNE.
- 45 Los presentes inventores tienen como objetivo mejorar el procedimiento de la transferencia directa de ADN para obtener una mutagénesis dirigida eficiente en células vegetales. Los presentes inventores han encontrado que, entre las tecnologías de transformación según se describen en otra parte de este documento, la transformación mediante PEG aumenta significativamente la eficiencia total de mutagénesis dirigida en comparación con la electroporación y
- 50 la biolística. Esto es sorprendente, ya que, hasta la fecha, las tecnologías para la mutagénesis dirigida en plantas parecían favorecer la electroporación, con sus bajas eficiencias asociadas. Además, la mayoría de las mejoras en la tecnología se dirigían a mejorar las nucleobases mutágenas y no al sistema de administración para suministrar la nucleobase mutágena al ADN genómico diana.
- 55 A efectos de comparación, los presentes inventores usaron una nucleobase mutágena mc diseñada para producir una conversión P194Q en el locus ALS que conduce a resistencia a herbicidas. Se introdujeron nucleobases mutágenas idénticas en protoplastos de mesófilo de tabaco usando transformación mediante PEG o electroporación y las células resistentes a herbicidas se seleccionaron mediante idénticas condiciones de selección. De este modo, los presentes inventores han encontrado que la transformación de células vegetales mediante PEG es el procedimiento

más eficiente para llevar a cabo una mutagénesis dirigida en células vegetales, en comparación con los procedimientos de transformación conocidos.

La invención es según se define en las reivindicaciones.

- 5 En un aspecto, se desvela un procedimiento para la alteración dirigida de una secuencia de ADN aceptor bicatenario en un protoplasto de una célula vegetal que comprende la combinación de la secuencia de ADN aceptor bicatenario con una nucleobase mutágena mc, en que la secuencia de ADN aceptor bicatenario contiene una primera secuencia de ADN y una segunda secuencia de ADN que es el complemento de la primera secuencia de ADN y en que la
- 10 nucleobase mutágena mc donante comprende al menos un emparejamiento erróneo con respecto a la secuencia de ADN aceptor bicatenario que ha de alterarse, preferentemente con respecto a la primera secuencia de ADN, en que el procedimiento comprende además una etapa de introducción de la nucleobase mutágena mc en el protoplasto vegetal con el uso de transformación mediante polietilenglicol (PEG).
- 15 La nucleobase mutágena mc se pone en contacto con protoplastos de la planta que ha de transformarse usando una tecnología basada en la transformación mediante PEG. La tecnología de transformación mediante PEG en sí misma es ampliamente conocida y, en caso necesario, el experto en la técnica puede llevar a cabo pequeñas modificaciones en protocolos concretos sin abandonar la esencia de la presente invención.
- 20 La nucleobase mutágena mc usada en la presente invención tiene una longitud que concuerda con otras nucleobases mutágenas mc (quiméricas) usadas en mutagénesis dirigida, es decir, típicamente entre 10 y 60 nucleótidos, preferentemente de 20-55 nucleótidos, con mayor preferencia de 25-50 nucleótidos. En ciertas realizaciones de la invención, la nucleobase mutágena mc usada en la presente invención puede modificarse, por ejemplo por modificaciones con ANB y/o propinilo, según se describe en los documentos WO 2007073166 y WO
- 25 2007073170 a nombre de los solicitantes. De este modo, en ciertas realizaciones, la nucleobase mutágena mc contiene al menos un ANB situado en una posición que es del emparejamiento erróneo diana y preferentemente dos ANB situados al menos a un nucleótido de distancia a cada lado del emparejamiento erróneo. Además, estos ANB pueden estar al menos a tres, cuatro o cinco nucleótidos de distancia del extremo 5' y/o 3' de la nucleobase mutágena mc. En ciertas realizaciones, la nucleobase mutágena mc puede comprender una o más sustituciones con
- 30 propino, esencialmente según se describe en los documentos WO 2007073166 y WO 2007073170. En ciertas realizaciones, la nucleobase mutágena mc donante puede conjugarse con una proteína tal como una señal de localización nuclear. En esta realización, el oligonucleótido usado en la presente invención se acopla por medio de la tecnología (enlazante) convencional con una señal de localización nuclear tal como el péptido (NSL) conocido del antígeno T mayor de SV40, el factor de transcripción GATA 11, la helicasa para reparación de ADN XBP1, la
- 35 proteína de desarrollo sensible a la luz DET1, el factor de transcripción ERF, el activador transcripcional relacionado con la patogénesis PTI6 y la proteína nuclear enrollada, esencialmente según se describe en la solicitud pendiente de tramitación de los solicitantes PCT/NL2007/000279. El conjugado entre el oligonucleótido y la señal de localización nuclear puede usarse en la metodología de transformación basada en PEG descrita en este documento.
- 40 La alteración producida por el procedimiento de la presente invención es una delección, una sustitución o una inserción de al menos un nucleótido. Preferentemente, la alteración es una sustitución. En un oligonucleótido pueden alterarse más nucleótidos, pero se espera que la eficiencia disminuya, por lo que se prefiere la alteración de un nucleótido.
- 45 El ADN diana (o ADN aceptor bicatenario) puede proceder de cualquier fuente pero, preferentemente, el ADN diana es de una planta. Preferentemente, el ADN diana procede de ADN genómico, ADN lineal, cromosomas artificiales, ADN cromosómico nuclear, ADN cromosómico de orgánulos o ADN episómico. El procedimiento desvelado en este documento puede usarse para alterar una célula, corregir una mutación y restablecer el tipo natural, inducir una mutación, inactivar una enzima por interrupción de la región codificante, modificar la bioactividad de una enzima por
- 50 alteración de la región codificante o modificar una proteína por interrupción de la región codificante.

Sin limitarse a una teoría, se piensa que el uso de la transformación mediante PEG precipita el ADN sobre la membrana celular del protoplasto. La membrana celular encapsula el ADN precipitado y lo introduce en el protoplasto en forma protegida. El protoplasto, en el curso de su ciclo vital normal, inmediatamente después de su

55 formación por eliminación de la pared celular, empezará el proceso de regeneración de dicha pared celular. La división celular comienza típicamente más tarde (desde varias horas hasta unos pocos días). Generalmente, el intercambio dirigido de nucleótidos tiene lugar durante la división celular haciendo uso del mecanismo de reparación de la célula. En el periodo de tiempo entre la introducción del ADN donante en el protoplasto y el comienzo de la división celular, el ADN donante es sensible al ataque de los mecanismos de defensa de las células, como las

exonucleasas, y es probable que degeneren y por lo tanto sea ineficaz para TNE. Con el uso de la tecnología de la transformación mediante PEG, el ADN donante se encapsula por endocitosis y de esta manera queda protegido, al menos temporalmente, de la acción degenerativa de las endonucleasas. Cuando el ADN se libera de la forma encapsulada, tiene mayores oportunidades de estar presente en o alrededor del momento de la división celular, durante la cual el ADN (es decir, la nucleobase mutágena mc) está disponible para encontrar su complemento en el ADN de la célula aceptora e intercambiar el nucleótido como en los mecanismos de mutagénesis dirigida habituales.

#### Ejemplos:

#### 10 Comparación de las frecuencias de mutagénesis dirigida con el uso de transformación mediante PEG o electroporación

##### Aislamiento de protoplastos

15 **[0009]** Se mantienen cultivos de tallos *in vitro* de *Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana, línea SR1, en el medio MS20 con el 0,8 % de agar Difco en frascos de vidrio altos, con 16/8 h de fotoperiodo y 2.000 lux, a 25 °C y el 60-70 % de humedad relativa. El medio MS20 es básicamente el medio de Murashige y Skoog (Murashige T. y Skoog F. 1962, *Physiologia Plantarum* 15: 473-497) con el 2 % (p/v) de sacarosa, sin la adición de hormonas y con el 0,8 % de agar Difco. Se recogen hojas totalmente expandidas de cultivos de tallos de tres a seis semanas de edad. Las  
20 hojas se cortan en tiras finas de 1 mm, que se transfieren después a placas de Petri de gran tamaño (100 mm x 100 mm) con 45 ml del medio básico MDE para un tratamiento de preplasmólisis durante 30 min. El medio básico MDE contiene 0,25 g de KCl, 1,0 g de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,136 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,5 g de polivinilpirrolidona (PM 10.000), 6 mg de ácido naftalenacético y 2 mg de 6-bencilaminopurina en un volumen total de 900 ml. La osmolalidad de la disolución se ajusta con sorbitol a 600 mOsmol/kg y el pH a 5,7. Después se añaden 5 ml de la disolución madre enzimática  
25 para SR1. La disolución madre enzimática consta de 750 mg de celulasa Onozuka R10, 500 mg de driselasa y 250 mg de macerocima R10 por 100 ml, filtrada través de papel Whatman y esterilizada por filtración. La digestión se deja proceder durante la noche en la oscuridad a 25 °C. Las hojas digeridas se filtran a un recipiente estéril a través de filtros de nilón de 50 µm. Se usa un volumen igual de medio de lavado de KCl frío para lavar el filtro y se combina con la suspensión de protoplastos. El medio de lavado de KCl consta de 2,0 g de CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O por litro y una cantidad  
30 de KCl suficiente para ajustar la osmolalidad a 540 mOsmol/kg. La suspensión se transfiere a tubos de 10 ml y los protoplastos se sedimentan durante 10 min a 85x g a 4 °C. El sobrenadante se desecha y el sedimento de protoplastos se resuspende cuidadosamente en 5 ml de medio de lavado MLm frío, que son los macronutrientes del medio MS (Murashige T. y Skoog F. 1962, *Physiologia Plantarum* 15: 473-497) a la mitad de la concentración normal, 2,2 g de CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O por litro y una cantidad de manitol suficiente para ajustar la osmolalidad a 540  
35 mOsmol/kg. Se combina el contenido de dos tubos y se centrifuga durante 10 min a 85x g a 4 °C. El sobrenadante se desecha y los sedimentos de protoplastos se resuspenden cuidadosamente en 5 ml de medio de lavado MLs frío, que es el medio MLm con sacarosa en lugar de manitol.

Se combina el contenido de dos tubos y se añade 1 ml de medio de lavado de KCl sobre la disolución de sacarosa, teniendo cuidado de no alterar la fase inferior. Los protoplastos se centrifugan durante 10 min a 85x g a 4 °C. Se recoge cuidadosamente la interfase entre las disoluciones de sacarosa y KCl que contiene los protoplastos vivos. Se le mezcla cuidadosamente un volumen igual del medio de lavado de KCl. La densidad de los protoplastos se mide con un hemocitómetro.

#### 45 Transformación mediante PEG

**[0010]** La suspensión de protoplastos se centrifuga a 85x g durante 10 min a 5 °C. El sobrenadante se desecha y el sedimento de protoplastos se resuspende a una concentración final de 10<sup>6</sup>/ml en medio de lavado de KCl. En un tubo de 10 ml se mezclan cuidadosa pero completamente 250 µl de la suspensión de protoplastos, 1,6  
50 nmol de la nucleobase mutágena mc y 250 µl de una disolución de PEG. Después de 20 min de incubación a temperatura ambiente, se añaden gota a gota 5 ml de Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 0,275 M frío. La suspensión de protoplastos se centrifuga durante 10 min a 85x g a 4 °C. El sobrenadante se desecha y el sedimento de protoplastos se resuspende cuidadosamente en 1,25 ml de medio de cultivo T<sub>0</sub> enriquecido con 50 µg/ml de cefotaxima y 50 µg/ml de vancomicina. El medio de cultivo de la nucleobase mutágena mc contiene (por litro, pH 5,7) 950 mg de KNO<sub>3</sub>, 825  
55 mg de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 220 mg de CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 185 mg de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 85 mg de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 27,85 mg de FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 37,25 mg de Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O, los micronutrientes del medio de Heller (Heller R. 1953, *Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Veg.* 14: 1-223), las vitaminas del medio de Morel y Wetmore (Morel G. y R.H. Wetmore 1951, *Amer. J. Bot.* 38: 138-40), sacarosa al 2 % (p/v), 3 mg de ácido naftalenacético, 1 mg de 6-bencilaminopurina y una cantidad de manitol suficiente para ajustar la osmolalidad a 540 mOsmol/kg.

La suspensión se transfiere a una placa de Petri de 35 mm. Se le añade un volumen igual de medio de agarosa T<sub>0</sub> y se agita cuidadosamente. Las muestras se incuban a 25 °C en la oscuridad y se cultivan posteriormente según se describe a continuación.

5

#### Electroporación

**[0011]** Los protoplastos se centrifugan a 85x g durante 10 min a 5 °C. El sobrenadante se desecha y el sedimento se suspende en tampón de electroporación helado que consta de HEPES 10 mM, NaCl 80 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,04 mM, manitol 0,4 M, pH 5,7, ajustado a 540 mOsmol/kg con manitol hasta una concentración final de 10<sup>6</sup>/ml. Los protoplastos se mantienen en hielo durante la totalidad del procedimiento. Se añaden 4,5 nmol de la nucleobase mutágena mc y 700 µl de la suspensión de protoplastos a una cubeta de electroporación de 0,4 cm de ancho. Mediante un sistema de electroporación GenePulser XCell de Biorad, equipado con un ordenador y un módulo CE, se proporciona un único pulso de disminución exponencial a la suspensión de células de acuerdo con los parámetros siguientes:

Fuerza del campo	500 V/cm
Capacitancia	950 µF

**[0012]** En estas condiciones, la resistencia de la muestra es de aproximadamente 30 Ω y la constante de tiempo resultante de aproximadamente 30 ms. Estos parámetros se han seleccionado como los parámetros que producen el máximo nivel de expresión transitoria de GFP en protoplastos de tabaco 24 h después de la electroporación. Después del pulso, los protoplastos se dejan recuperar en la cubeta a temperatura ambiente durante 30 min. A continuación, los protoplastos se recogen en 1 ml de medio de cultivo T<sub>0</sub> y se transfieren a un tubo de 10 ml. La cubeta se lava con 5 ml adicionales de medio de cultivo T<sub>0</sub> que se combinan con la suspensión de protoplastos. Después de un mezclado cuidadoso pero completo, se añaden 50 µg/ml de cefotaxima y 50 µg/ml de vancomicina y 1,25 ml de la suspensión de protoplastos se transfiere a una placa de Petri de 35 mm. Se añade un volumen igual de medio de agarosa T<sub>0</sub> y la mezcla se homogeniza cuidadosamente. Las muestras se incuban a 25 °C en la oscuridad a se cultivan posteriormente según se describe a continuación.

30

#### Cultivo de protoplastos

**[0013]** Después de 10 días de cultivo, el bloque de agarosa se corta en seis partes iguales que se transfieren a una placa de Petri que contiene 22,5 ml de medio MAP1AO enriquecido con clorsulfurón 20 nM. Este medio consta (por litro, pH 5,7) de 950 mg de KNO<sub>3</sub>, 825 mg de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 220 mg de CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 185 mg de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 85 mg de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 27,85 mg de FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 37,25 mg de Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O, los micronutrientes del medio de Murashige y Skoog (Murashige T. y Skoog F. 1962, Physiologia Plantarum 15: 473-497) en una décima parte de la concentración original, las vitaminas del medio de Morel y Wetmore (Morel G. y R.H. Wetmore 1951, Amer. J. Bot. 38: 138-40), 6 mg de piruvato, 12 mg, respectivamente, de ácido málico, ácido fumárico y ácido cítrico, sacarosa al 3 % (p/v), manitol al 6 % (p/v), 0,03 mg de ácido naftalenacético y 0,1 mg de 6-bencilaminopurina. Las muestras se incuban a 25 °C con poca luz durante seis a ocho semanas. Los callos en crecimiento se transfieren entonces a medio MAP1 y se dejan desarrollar durante otras dos a tres semanas. El medio MAP1 tiene la misma composición que el medio MAP1AO, pero con manitol al 3 % (p/v) en lugar de al 6 % y con 46,2 mg/l de histidina (pH 5,7). Se solidifica con agar Difco al 0,8 % (p/v). Los callos se transfieren después a medio RP mediante pinzas estériles. El medio RP consta (por litro, pH 5,7) de 273 mg de KNO<sub>3</sub>, 416 mg de Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 392 mg de Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 57 mg de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 233 mg de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 271 mg de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 27,85 mg de FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 37,25 mg de Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O, los micronutrientes del medio de Murashige y Skoog en una quinta parte de la concentración publicada, las vitaminas del medio de Morel y Wetmore (Morel G. y R.H. Wetmore 1951, Amer. J. Bot. 38: 138-40), sacarosa al 0,05 % (p/v), manitol al 1,8 % (p/v), 0,25 mg de zeatina y clorsulfurón 41 nM y se solidifica con agar Difco al 0,8 % (p/v). Los tallos maduros se transfieren a medio de enraizamiento después de dos a tres semanas.

#### Nucleobases mutágenas mc

**[0014]** Todas las nucleobases mutágenas mc fueron sintetizadas por Eurogentec (Seraing, Bélgica), purificadas por HPLC de fase inversa y resuspendidas en agua milliQ estéril. Antes de su uso, las nucleobases mutágenas mc se calentaron hasta 95 °C durante 5 min. La nucleobase mutágena 06Q262 se diseñó para introducir un único emparejamiento erróneo (nucleótido subrayado) en el gen ALS de tabaco (número de acceso X07644) en la posición del codón de P194, que resultaría en una conversión de CCA a CAA (P194Q). La nucleobase mutágena mc 06Q261 es la pareja exacta de la secuencia del gen ALS de tabaco y sirve como control negativo. La nucleobase

mutágena mc 06Q263 consta de una combinación aleatoria de 40 nucleótidos y sirve como control negativo.

06Q261 5' TCAGTACCTATCATCCTACGTTGCACTTGACCTGTTATAG [SEQ ID 1]  
 06Q262 5' TCAGTACCTATCATCCTACGTTGCACTTGACCTGTTATAG [SEQ ID 2]  
 06Q263 5' ATCGATCGATCGATCGATCGATCGATCGATCGATCGATCG [SEQ ID 3]

Supervivencia de protoplastos por tratamiento

**[0015]** La supervivencia de los protoplastos después de la transformación mediante PEG y de la electroporación se evalúa por medio de la actividad esterasa con el colorante vital fluorescente diacetato de fluoresceína (FDA) 24 horas después de la transformación. Se añaden 2 µl de una disolución madre de FDA de 5 mg/ml en acetona a 1 ml de los protoplastos transformados. La proporción de protoplastos fluorescentes en la totalidad de la población se determina con un hemocitómetro. Las observaciones se llevan a cabo con un microscopio de epifluorescencia vertical Eclipse E600 de Nikon, equipado con un conjunto de filtros LP (EX480/40, DM505, BA510) para GFP. La excitación la suministra una lámpara de mercurio de muy alta presión y 100 W. Las imágenes se adquieren con una cámara CCD DS-2MBWc conectada a un controlador DS-U1 asociado a un ordenador con el software de adquisición/análisis de imágenes NIS Element.

Resultados

**[0016]** En la tabla 1 se presenta un resumen de los resultados de la transformación mediante PEG y de la electroporación. Al usar la transformación mediante PEG, la tasa de supervivencia es significativamente superior en comparación con la electroporación. La naturaleza de la electroporación en sí misma es más perjudicial para la supervivencia de los protoplastos que la transformación mediante PEG, lo que resulta en una tasa de recuperación/supervivencia muy superior, así como en una mayor eficiencia de mutagénesis dirigida. La eficiencia de mutagénesis dirigida se evalúa después de la incubación de los protoplastos en presencia de clorsulfurón.

**Tabla 1:** Comparación de la transformación mediante PEG y la electroporación con respecto a la tasa de supervivencia de los protoplastos.

Nucleobase mutágena	Tratamiento con PEG Supervivencia** (%)	Electroporación Supervivencia** (%)
06Q261	83,5 ± 1,8	65,9 ± 2,2
06Q262	82,6 ± 2,1	66,3 ± 2,6
06Q263	83,8 ± 2,6	64,7 ± 3,1

\*expresada como el porcentaje de protoplastos fluorescentes después de la tinción con FDA en la población recuperada de protoplastos.  
 Los resultados son la media de tres réplicas independientes ± DE.

**Amplificación de ALS por PCR y secuenciación**

**[0017]** El ADN de microcolonias de tabaco resistentes a clorsulfurón se aísla mediante el kit DNeasy (Qiagen) y se usa como molde en una reacción de PCR. Las conversiones de los codones diana en el gen ALS de tabaco se detectan con los cebadores 5'GGTCAAGTGCCACGTAGGAT [SEQ ID 4] y 5'GGGTGCTTCACTTTCTGCTC [SEQ ID 5] que amplifican un fragmento de 776 pb de este gen, incluido el codón 194. La conversión nucleotídica en el callo de tabaco resistente al herbicida se confirma mediante la clonación de los productos de PCR en pCR2.1::TOPO (Invitrogen) y la secuenciación de los plásmidos individuales. El tabaco contiene dos alelos de ALS (SurA y SurB). La conversión nucleotídica en el codón P194 de cualquiera de estos locus es suficiente para conferir resistencia a clorsulfurón. Dado que el tabaco es una especie alotetraploide, hay ocho posibles dianas en el mismo en las que puede haber tenido lugar el TNE. Por consiguiente, fue necesario secuenciar más de 10 clones plasmídicos que contenían el producto de la PCR para detectar uno con una conversión de CCA a CAA. Esto sugiere que en cada callo resistente, solo uno de los ocho alelos de ALS había experimentado una conversión nucleotídica mediante mutagénesis dirigida. En todos los callos producidos en este estudio observamos la conversión nucleotídica esperada de CCA a CAA.

LISTADO DE SECUENCIAS

**[0018]**

<110> Keygene NV

<120> Mejora del intercambio dirigido de nucleótidos con el uso de la introducción de oligonucleótidos monocatenarios en protoplastos vegetales mediante polietilenglicol

<130> P28853EP01

5 <160> 5

<170> PatentIn, versión 3.3

<210> 1

<211> 40

10 <212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> oligonucleótido para intercambio dirigido de nucleótidos

<400> 1

15

tcagtaccta tcacctcagc ttgcactga cctggtatag 40

<210> 2

<211> 40

20 <212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> oligonucleótido para intercambio dirigido de nucleótidos

<400> 2

25

tcagtaccta tcacctcagc ttgcactga cctggtatag 40

<210> 3

<211> 40

30 <212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> oligonucleótido para intercambio dirigido de nucleótidos

<400> 3

35

atcgatcgat cgatcgatcg atcgatcgat cgatcgatcg 40

<210> 4

<211> 20

40 <212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> cebador

<400> 4

45

ggtaagtc cacgtaggat 20

<210> 5

<211> 20

50 <212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> cebador

<400> 5

55

gggtgcttca cttctgctc 20

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la producción de una célula vegetal, una planta, un callo vegetal o un tallo, en que el procedimiento comprende la realización de una alteración dirigida de una secuencia de ADN aceptor bicatenario en un protoplasto de una célula vegetal, que comprende la combinación de la secuencia de ADN aceptor bicatenario con una nucleobase mutágena monocatenaria donante, en que la secuencia de ADN aceptor bicatenario contiene una primera secuencia de ADN y una segunda secuencia de ADN que es el complemento de la primera secuencia de ADN y en que la nucleobase mutágena monocatenaria donante comprende al menos un emparejamiento erróneo con respecto a la secuencia de ADN aceptor bicatenario que ha de alterarse, preferentemente con respecto a la primera secuencia de ADN, en que el procedimiento comprende además una etapa de introducción de la nucleobase mutágena monocatenaria en los protoplastos celulares por transformación mediante polietilenglicol (PEG); y la regeneración de una célula vegetal a partir de dicho protoplasto y/o, opcionalmente, la regeneración de un callo vegetal, un tallo y/o una planta.
- 15 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la nucleobase mutágena monocatenaria tiene una longitud de entre 10 y 60 nucleótidos.
3. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1-2, en el que la nucleobase mutágena monocatenaria comprende sustituciones con ácidos nucleicos bloqueados (ANB) que están al menos a un nucleótido de distancia del emparejamiento erróneo y, opcionalmente, al menos a tres, cuatro o cinco nucleótidos de distancia de los extremos 5' y 3' de la nucleobase mutágena.
- 20 4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la nucleobase mutágena monocatenaria comprende dos ANB situados al menos a un nucleótido de distancia a cada lado del emparejamiento erróneo.
- 25 5. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1-3, en el que la nucleobase mutágena monocatenaria comprende sustituciones con propino.
6. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1-5, en el que la nucleobase mutágena monocatenaria se conjuga con una señal de localización nuclear.
- 30 7. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el ADN aceptor procede de ADN genómico, ADN lineal, cromosomas artificiales de mamíferos, cromosomas artificiales bacterianos, cromosomas artificiales de levaduras, cromosomas artificiales de plantas, ADN cromosómico nuclear, ADN cromosómico de orgánulos o ADN episómico.
- 35 8. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes para alterar una célula, corregir una mutación y restablecer el tipo natural, inducir una mutación, inactivar una enzima por interrupción de la región codificante, modificar la bioactividad de una enzima por alteración de la región codificante o modificar una proteína por interrupción de la región codificante.
- 40 9. Uso de la transformación mediante PEG en el procedimiento para la producción de una célula vegetal, una planta, un callo vegetal o un tallo de acuerdo con las reivindicaciones 1-8.