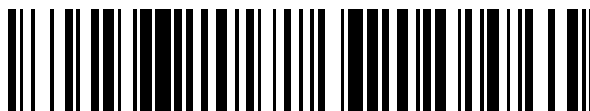


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 605 652**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/82** (2006.01)

**C07K 14/415** (2006.01)

**A01H 5/00** (2006.01)

**A01H 4/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.07.2010 PCT/EP2010/059540**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.01.2011 WO11003850**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.07.2010 E 10730772 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.09.2016 EP 2451956**

54 Título: **Método para producir plantas fértiles a través de inducción de BBM durante la transformación**

30 Prioridad:  
**10.07.2009 WO PCT/EP2009/058860**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**15.03.2017**

73 Titular/es:  
**ENZA ZADEN BEHEER B.V. (50.0%)  
Haling 1E  
1602 DB Enkhuizen, NL y  
STICHTING DIENST LANDBOUWKUNDIG  
ONDERZOEK (50.0%)**

72 Inventor/es:  
**HEIDMANN, IRIS ALKE;  
BOUTILIER, KIMBERLY ANNE y  
DE LANGE, BRENDA JOHANNA MARIA**

74 Agente/Representante:  
**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 605 652 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Método para producir plantas fértiles a través de inducción de BBM durante la transformación

La presente invención se refiere a un método para producir una planta transgénica madura de pimiento dulce *Capsicum annuum*.

5 La transformación genética es una metodología usada el campo de las ciencias de la vida y, como tal, usada en varios organismos para muchos propósitos. Esta tecnología ha tenido y tiene importantes implicaciones en muchas áreas de investigación de las ciencias de la vida. Un aspecto de la tecnología es que puede usarse para identificar funciones de moléculas de nucleótidos individuales (p. ej. elementos genéticos y/o genes) o proteínas codificadas por tales moléculas de nucleótidos. El organismo modificado genéticamente resultante se puede usar en  
10 investigación básica o aplicada o ser usado en una aplicación industrial.

La transformación genética puede ser una potente tecnología en el campo de la ciencia de las plantas ya que permite la transferencia de una molécula de nucleótidos de interés a una especie vegetal receptora. Tal molécula de nucleótidos puede comprender promotores, genes, terminadores, represores o estimuladores del gen de la función de la proteína, etcétera.

15 La transformación genética se puede usar por ejemplo con la intención de estudiar los efectos de la adición de una proteína de interés a una planta receptora. En tales casos, se introduce un gen que codifica la proteína de interés, que es normalmente parte de una molécula de nucleótidos más grande, en una planta receptora.

Con el fin de obtener una planta modificada genéticamente, se puede aplicar un método que comprende transformación seguida de regeneración y posterior desarrollo del material vegetal regenerado, transformado en  
20 una planta transgénica madura. Tal método se puede aplicar satisfactoriamente solamente en especies vegetales que son sensibles tanto a la transformación y a la fase de regeneración como al desarrollo posterior adicional en una planta transgénica madura. Tales especies vegetales incluyen por ejemplo *Arabidopsis thaliana* o *Brassica napus*.

25 Durante la transformación se introduce una molécula de nucleótidos de interés en una célula vegetal. Durante la regeneración, se deja desarrollar el material vegetal transformado a partir de estructuras no definidas, como tejido calloso, en órganos vegetales, como estructuras tipo hoja, estructuras tipo brote o embriones somáticos, de tal manera que se pueda obtener de ella una planta transgénica madura.

La fase de transformación puede comprender poner en contacto una célula vegetal o material vegetal con una bacteria *Agrobacterium tumefaciens* que contiene un plásmido Ti (inductor de tumor) que tiene la molécula de  
30 nucleótidos de interés. El plásmido Ti comprende al menos un segmento de DNA que se transfiere a una planta huésped por *Agrobacterium tumefaciens*; el elemento T-DNA. El elemento T-DNA está flanqueado por repeticiones de DNA, las llamadas margen izquierdo y margen derecho. La ingeniería genética permite que se coloque una molécula de nucleótidos de interés entre los márgenes izquierdo y derecho del T-DNA del plásmido Ti. Durante el contacto de la célula vegetal o del material vegetal con la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*, se transfiere al  
35 menos el elemento T-DNA del plásmido Ti, que incluye la molécula de nucleótidos de interés, desde la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* hacia la célula vegetal en donde se integra de forma estable en el genoma nuclear o en el genoma de orgánulo, como de una mitocondria o un cloroplasto. También se pueden aplicar otros métodos de transformación al material vegetal.

40 Cuando se considera la regeneración adecuada desde un punto de vista macroscópico, la regeneración de células o tejidos vegetales se puede convertir en una masa amorfa de células (esto es, callo) a partir de la cual se puede desarrollar una estructura tipo brote o una estructura tipo hoja. Normalmente a partir de tales estructuras se puede desarrollar un tallo alargado, si es necesario bajo la influencia de hormonas vegetales adecuadas. Posteriormente, tales estructuras, si es necesario bajo la influencia de uno o más agentes inductores adecuados, iniciarán la formación de un sistema de raíces para desarrollar un sistema de raíces avanzado adecuado para experimentar un  
45 posterior desarrollo. Posteriormente, se puede trasplantar material vegetal de un adecuado estado de desarrollo de un ambiente *in vitro* a uno *ex vitro*, como en suelo, vermiculita, lana de roca o similares, en condiciones adecuadas que permitan la obtención de una planta transgénica madura. El procedimiento de regeneración puede comprender etapas adicionales o alternativas de este concepto general. Alternativamente, la regeneración puede transcurrir a través de la formación de embriones somáticos que se deben dejar crecer hacia plantas maduras.

50 Tal método de transformación y regeneración se aplica preferiblemente a tejidos vegetales somáticos jóvenes, células cultivadas como protoplastos u órganos como material de partida. Tales tejidos, como explantes de tejidos vegetales jóvenes o partes de material vegetal de plantas de semillero, comprenden células de grados variables de diferenciación o determinación. Probablemente debido a la población heterogénea de células de diferentes niveles o grados de diferenciación que están presentes en tales tejidos son responsables tales tejidos en particular de la  
55 fase inicial de un tratamiento de regeneración.

Solamente ciertas plantas o especies vegetales han demostrado ser sensibles a métodos de transformación y regeneración. Ha sido posible aplicar métodos existentes para transformar y regenerar tales plantas de una

manera relativamente sencilla. De forma contraria, se ha hecho evidente que otras plantas o especies vegetales no son sensibles a tales métodos de transformación y regeneración. Tales plantas no se regeneran de una forma adecuada y/o no se pueden hacer regenerar en absoluto en plantas maduras. Tales plantas, variedades de plantas o cultivos de plantas son llamadas "recalcitrantes" o "incompetentes de regeneración".

5 Se desconoce en gran medida qué factores moleculares o fisiológicos subyacentes son responsables o determinan si las plantas son o no recalcitrantes. Esto indica la actual necesidad de desarrollar métodos fiables de transformación y regeneración específicos de plantas que se puedan aplicar a una amplia variedad de especies vegetales. De hecho, solamente se han desarrollado métodos adecuados de transformación y regeneración para la producción eficiente de plantas transgénicas maduras para unas pocas especies vegetales o cultivos de especies.

10 WO 2005/075655 describe métodos y composiciones para modular el desarrollo vegetal. Se describen también las secuencias de nucleótidos y aminoácidos que codifican la Proteína del Desarrollo del Óvulo 2 (ODP2). Se pueden usar las secuencias en una variedad de métodos que incluyen modulación del desarrollo, vías de desarrollo, alteración del contenido de aceite en una planta, incremento de las eficiencias de transformación, modulación de la tolerancia al estrés, y modulación de la capacidad regeneradora de una planta.

15 EP 1 057 891 describe un gen obtenido durante la inducción de la embriogénesis de microesporas. La proteína codificada por este gen rinde células vegetales embriogénicas, y aumenta la capacidad regeneradora de la célula vegetal. También se describe la región reguladora de este gen y su uso para dirigir la expresión de un gen de interés dentro de una célula huésped adecuada.

20 La patente de EE.UU. 2008/301836 describe un método para la selección de polipéptidos factores de transcripción de plantas modificadas, polinucleótidos que los codifican, y métodos de producción de plantas transgénicas que tienen propiedades ventajosas, que incluyen resistencia biótica y tolerancia al estrés abiótico aumentadas, comparadas con las plantas de tipo salvaje o control.

25 Se ha observado y encontrado una cantidad de problemas diferentes que son insuperables cuando se someten plantas recalcitrantes a métodos de transformación y de regeneración seguidos de desarrollo en plantas maduras. Tales problemas comprenden la incapacidad de transformar una célula vegetal a partir de plantas vegetales o material vegetal sometidas. O, en caso de que se pueda lograr la transformación, puede que dicho material transformado no se desarrolle en una planta transformada madura. Las células o el material vegetal transformado puede regenerarse hasta una cierta etapa de desarrollo, exhibir comportamiento aberrante como crecimiento alterado o aberrante, terminación prematura del desarrollo, retraso severo en el desarrollo o desarrollo incorrecto.

30 También, se sabe que ocurre la formación de plantas falsas-positivas. Dicho material vegetal no transformado puede escapar de la presión de un agente de selección y regenerarse en una planta madura.

35 Además, se conocen los siguientes problemas con respecto a la aplicabilidad, fiabilidad e idoneidad del método: la reproducibilidad puede ser problemática; el resultado del método puede ser impredecible, la cantidad de brotes en regeneración, raíces o plántulas puede ser muy baja para aplicación adecuada en un entorno industrial; el método solamente se puede aplicar a una única especie de planta; el método puede ser inadecuado para aplicación de alto rendimiento o de rutina; el método puede depender de una cepa bacteriana específica para una aplicabilidad adecuada. Es evidente que dichos métodos no son adecuados para aplicaciones industriales económicas. Por tanto, sigue existiendo la necesidad de métodos eficientes y fiables para producir plantas transgénicas maduras que se puedan aplicar a especies vegetales recalcitrantes.

40 Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar un método para la obtención de una planta transgénica madura, en donde la planta es una planta recalcitrante y en donde el método comprende una fase de transformación y una fase de regeneración. Además, el objetivo de la invención es producir una planta transgénica, que se puede conseguir a través del método de la invención

45 El objetivo anterior, entre otros, es proporcionado mediante un método como se define en las reivindicaciones adjuntas.

50 Concretamente, la presente invención se refiere a un método para producir una planta transgénica madura de pimiento dulce *Capsicum annuum*, que comprende transformar y regenerar un célula vegetal o material vegetal, en donde la célula vegetal o el material vegetal se transforma con una molécula de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína BBM, en donde se induce la actividad de la proteína BBM durante la regeneración de la célula vegetal o del material vegetal transformado.

55 Durante la investigación que condujo a la invención se encontró que el material vegetal que se originaba a partir de varias plantas recalcitrantes, tales como pimiento dulce y petunia W138, se podrían hacer regenerar en plantas transgénicas maduras mediante la inducción de BBM durante la transformación y la regeneración, mientras que sin inducción de BBM durante estas etapas dichas plantas no se desarrollaron en plantas transgénicas maduras. En la técnica, las plantas recalcitrantes son plantas que en esencia no se regeneran y desarrollan en una planta transgénica madura cuando el material vegetal originario de tal planta se somete a un procedimiento adecuado de transformación y regeneración para plantas sensibles. La base de tales métodos es que el material vegetal transformado que está en contacto con un medio que comprende fitohormonas, preferiblemente auxina, citoquinina

o ácidos giberélicos sino también ácido abscísico, etileno o inhibidores de los mismos, permite la regeneración del material vegetal transformado como es el caso de las plantas sensibles. En esta memoria una planta recalcitrante es una planta que no se puede desarrollar en una planta transgénica madura en cualquiera de estas condiciones.

5 Muy pocas plantas recalcitrantes, especialmente las que pertenecen a especies vegetales económicamente importantes, cultivos o variedades, han sido sujeto de amplia investigación dirigida al desarrollo de un método adecuado para producir plantas transgénicas maduras que usa la regeneración. Teniendo en cuenta que las plantas recalcitrantes, como el pimiento dulce, son notorias por su incapacidad de regenerarse en plantas transgénicas maduras en combinación con la multitud de diferentes problemas que se encuentran al intentar transformar y regenerar material vegetal de tales plantas en plantas transgénicas maduras usando métodos en la técnica anteriores, es sorprendente la eficiencia de la presente invención.

10 Una ventaja de la presente invención es que aparentemente una célula vegetal o material vegetal de una planta recalcitrante de pimiento dulce *Capsicum annuum* se puede hacer que se desarrolle, asistida o no por la adición de uno o más agentes biológicamente activos, como una fitohormona o una sustancia que imita un efecto de una fitohormona, en una planta transgénica madura. Se puede añadir dicho agente biológicamente activo, cuando se usa, al medio en el que se cultiva la planta transformada para permitir que el material vegetal transgénico se desarrolle en una planta transgénica madura. La adición de dicho agente biológicamente activo a la célula vegetal o al material vegetal en el que no se indujo la actividad de BBM no permite que tal célula vegetal o material vegetal se regenere en una planta transgénica madura.

15 Otra ventaja de la presente invención incluye la posibilidad de controlar la temporalización de la actividad de la actividad de BBM durante las fases de transformación y/o regeneración. El ajuste de la actividad temporal de BBM permite la optimización de la calidad o cantidad de plantas transgénicas maduras que se pueden obtener a partir de plantas recalcitrantes.

20 Una ventaja adicional de la presente invención se refiere a la posibilidad de asegurar el desarrollo adecuado del material vegetal transformado a lo largo de etapas de desarrollo reproductivo. Impidiendo la expresión y/o actividad inapropiadas de la proteína BBM durante las etapas reproductivas del desarrollo de la planta, se pueden eludir o aliviar los problemas relacionados con la esterilidad parcial o completa.

25 En esta memoria la regeneración comprende el desarrollo de una célula vegetal transformada en un embrión somático, una estructura tipo-hoja o una estructura tipo-brote. En una fase posterior tal tejido vegetal puede desarrollarse además en una planta transgénica madura.

30 Así la presente invención permite por primera vez obtener de forma eficiente plantas transgénicas maduras a partir de material vegetal que se origina a partir de una planta recalcitrante mediante activación de BBM durante la transformación y la regeneración. En esta memoria se entiende por actividad de BBM el efecto de la expresión de la BBM transformada en los genes de transcripción de la planta huésped transformada. Como BBM es un factor de transcripción, su actividad comprende influir en la transcripción de uno o más genes diana BBM. Se puede lograr la activación de BBM permitiendo a BBM localizarse en el núcleo tras la inducción, pero también induciendo su transcripción o su traducción. Se concibe que la activación de BBM causa la inducción o represión de la transcripción de sus genes diana mediante la unión directa o indirecta de BBM a una secuencia de nucleótidos reguladora y/o de proteína. Independientemente del mecanismo subyacente de actividad de BBM, la consecuencia de la actividad inducida de una proteína BBM expresada a partir de un constructo de expresión es que el material vegetal que se origina a partir de una planta recalcitrante que se somete a transformación y regeneración puede desarrollarse en unas plantas transgénicas maduras.

35 En esta memoria, se entiende por "planta transgénica madura" una planta que ha alcanzado una etapa de desarrollo avanzada tal que la planta produce al menos un órgano reproductor, preferiblemente más de tales órganos, como una semilla que comprende fruta, en donde a partir de tal órgano reproductor se puede obtener una progenie viable. El término "planta madura" en esta memoria es intercambiable con el término "planta fértil". Tal órgano reproductor puede ser un órgano reproductor sexual, como una flor, u órgano reproductor vegetativo, como un tubérculo, estolón, rizoma, cormo, bulbillito o un bulbo. Es de particular interés una planta transgénica madura que se puede obtener según la presente invención a partir de la cual se puede obtener una progenie viable de un órgano reproductor como se describe en esta memoria.

40 En esta memoria una flor puede ser unisexual, esto es, que tiene ya sea al menos un órgano reproductor masculino (androceo) o al menos un órgano reproductor femenino (gineceo); o en esta memoria una flor puede ser bisexual, esto es que tiene al menos un órgano reproductor masculino y al menos un órgano reproductor femenino.

45 Una flor en esta memoria es preferiblemente fértil, pero puede contener también o polen funcional o células huevo funcionales. En el caso de una flor fértil, dicha flor lleva polen funcional y una o más células huevo funcionales, que pueden posteriormente dar lugar a una progenie viable. Una flor con polen funcional y una o más células huevo funcionales puede producir una o más semillas mediante auto-fertilización pero también mediante fertilización cruzada. En el caso de una flor que contiene ya sea polen funcional o células huevo funcionales, tal flor no produce semilla(s) por auto-fertilización pero puede producir semilla(s) por fertilización cruzada. Así, dicha flor puede ser

masculina-estéril o femenina-estéril. Una flor estéril masculina, sin embargo, se puede fertilizar por polen funcional a partir de otra flor. El polen de una flor estéril femenina se puede usar para fertilizar otra flor. La esterilidad masculina de dicha flor puede ser un resultado de una esterilidad masculina citoplasmática (CMS), autoincompatibilidad esporofítica, autoincompatibilidad gametofítica o cualquier otro sistema de esterilidad. Los términos biológicos anteriores se usan con sus significados conocidos en la técnica.

También se concibe como una posibilidad obtener un explante a partir de un material vegetal transformado primario del que se puede obtener una planta transgénica madura. Dicha planta transgénica madura obtenida de un explante de un transformante primario cae también dentro del significado de una planta transgénica madura según la presente invención y como un producto directamente obtenido a través del método de la presente invención.

El término “célula vegetal” en esta memoria se refiere a cualquier célula que se deriva de una planta o de material vegetal. También quiere decir un protoplasto o cualquier célula de una suspensión líquida o similar.

El término “material vegetal” en esta memoria se refiere a cualquier explante, trozo o corte derivado de cualquier estructura, tejido u órgano de una planta. Material vegetal en esta memoria se puede también referir a cualquier tejido u órgano de una planta. Dicho tejido u órgano vegetal del que deriva dicho explante, trozo o corte comprende un cotiledón, hipocótilo, epicótilo, semilla, callo, hoja, raíz, brote, flor, antera, polen, óvulo, célula huevo, fruto, meristemo, primordio, inflorescencia, peciolo, protoplasto, tejido sumidero, tejido fuente, plántula, órgano sumidero, órgano fuente, tubérculo, embrión zigótico, embrión somático o embriones derivados de dobles haploides de haploides. También se incluyen en este sentido cultivos celulares como cultivos de células individuales, suspensiones, cultivos androgénicos, cultivos ginogénicos. En particular, el término material vegetal se refiere a tejido derivado de semillero, como un cotiledón o un trozo del mismo.

El término “transformación” en esta memoria se refiere a un método de introducción de una molécula de nucleótidos, como un vector de expresión o constructo, dentro de una célula vegetal receptora. Dicho procedimiento de transformación se puede usar para elucidar la función de un gen o proteína u otro elemento genético, como un promotor, potenciador, terminador o similares. La molécula de nucleótidos se deriva preferiblemente de una planta o se basa en una secuencia de nucleótidos derivada de una planta. La molécula de nucleótidos se puede introducir en una célula vegetal mediante el uso de un vector bacteriano como *Agrobacterium tumefaciens* (véase por ejemplo Bent, 2000) u otra bacteria que sea adecuada para la transformación en plantas (véase por ejemplo Broothaerts et al., 2005). El procedimiento de transformación puede comprender también bombardeo con partículas, inyección mecánica u otras técnicas de transformación que son adecuadas para usar en la invención. Tales tecnologías son bien conocidas por el experto en la técnica y se pueden aplicar sin realizar habilidad ingeniosa para practicar la invención.

Se describen la célula vegetal o material vegetal que es de una planta seleccionada del grupo que comprende el género *Solanum*, *Petunia*, *Tulipa*, *Lilium*, *Crocus*, *Iris*, *Gladiolus*, *Spinacia*, *Beta*, *Chenopodium*, *Phaseolus*, *Pisum*, *Capsicum*, en particular una planta de la familia de las Solanaceas, en particular las especies *Solanum tuberosum*, *Petunia hybrida*, *Tulipa spp*, *Lilium ssp*, *Crocus, ssp*, *Iris ssp*, *Gladiolus ssp*, *Spinacea oleracea*, *Beta vulgaris*, *Chenopodium quinoa*, *Phaseolus vulgaris*, *Phaseolus coccineus*, *Pisum sativum* y *Capsicum annuum*, en particular una planta de pimiento dulce *Capsicum annuum*. Varios cultivares, variedades o tipos de estas especies de plantas y/o varias especies de plantas son notoriamente recalcitrantes y difíciles de transformar y/o regenerar en plantas transgénicas maduras.

Se describen tipos o variedades de patata recalcitrante (*Solanum tuberosum*), tipos o variedades de petunia (*Petunia hybrida*), como W138, y más en particular tipos o variedades de pimiento dulce (*Capsicum annuum*), los cuales, al menos en un caso de pimiento dulce, son considerados y conocidos por la persona experta en la técnica que son notoriamente recalcitrantes.

La especie *Capsicum annuum* se ha dividido en dos grupos según el sabor de los frutos, esto es, tipos de pimiento dulce (o suave) y tipos de pimiento picante (o chile). El grupo de tipos de pimiento dulce comprende plantas de pimiento que tienen frutos no picantes y dulces. Tales frutos tienen, a niveles más avanzados de madurez del fruto, bajos niveles de capsaicina (8-metil-N-vanillil-6-nonenamida) en el fruto. El grupo de pimiento dulce en esta memoria comprende variedades de California, morrón, tipo lamuyo, pimentón, pimentón de Hungría, pimentón de Nuevo Méjico, pimiento de calabaza, pimentón español, pimiento, de freír italiano, japonés dulce, Viejo arruga dulce y cubano (De Witt & Bosland, 1997).

El pimiento dulce es considerado un *Capsicum annuum* altamente recalcitrante. Se han comunicado las siguientes observaciones cuando se sometieron las plantas de pimiento dulce a un método que comprende transformación y regeneración; ausencia de formación de primordios de hoja a partir de callos; incapacidad de estructuras del tipo de hojas de dirigirse hacia la fase de regeneración; ausencia de brotes en tejidos regeneradores; fallo de los brotes de yema a alargarse; desarrollo de teratoma tipo brote a partir de brote de yemas; fallo de los meristemos apicales a alargarse; dominio apical reducido de brotes regeneradores; regeneración de brotes no-transgénicos a partir de callos crecidos bajo presión selectiva; fertilidad reducida de brotes regeneradores, incapacidad de un sistema de raíz apropiada a desarrollarse a partir de brotes transgénicos o crecimiento seriamente retardado de tejidos

vegetales u órganos. También se conoce la aparición de plantas falsas positivas, esto es, plantas no-transgénicas maduras que no contienen un gen que confiere resistencia necesario que permite a la planta crecer bajo presión selectiva. Se puede afirmar que la técnica anterior no muestra un método de transformación y regeneración adecuado, eficiente o fiable para el abastecimiento de plantas de pimiento dulce transgénicas maduras. La presente invención tiene la ventaja de que se proporciona un método para obtener plantas de pimiento dulce transgénicas maduras.

La aplicación del método según la invención conduce a la producción de plantas de pimiento dulce transgénicas maduras, en particular también a la producción de frutos de pimiento totalmente desarrollados y semillas viables a partir de estas plantas. Además, la presente invención se puede usar para la producción de semilleros de germinación que comprenden la secuencia de nucleótidos BBM exógena. Análisis de segregación de las plantas transgénicas maduras auto-fertilizadas demostraron que el transgén fue heredado por la progenie de la siguiente generación. La segregación mendeliana de la progenie de varias plantas transgénicas maduras se correspondió con la presencia de un locus único. La Tabla 4 presenta resultados del análisis de segregación. La presente invención produce así plantas de pimiento dulce transgénicas maduras que producen progenie viable que comprende la secuencia de nucleótidos transformada.

Las semillas de pimiento dulce transgénico, obtenidas a través del método de la presente invención, se depositaron con el número NCIMB 41732.

Se describe la proteína BBM o un homólogo funcional de la misma, que se caracteriza por tener al menos un 50%, 60%, 70%, preferiblemente 80%, más preferiblemente 90%, incluso más preferiblemente al menos 95% de identidad y lo más preferiblemente al menos 98% de identidad con la SEQ ID NO 1 o en donde la proteína BBM es la SEQ ID NO: 1. Se puede establecer si una proteína es un homólogo de BBM evaluando si la proteína de interés causa una expresión similar de un gen marcador acoplado al promotor de un gen diana BBM, al de la proteína BBM de la SEQ ID NO: 1. Tal gen diana comprende, por ejemplo, Factor de Despolimerización de Actina 9 (ADF9; GenelD: 829649, TAIR: AT4G34970).

Alternativamente, se puede transformar un gen candidato en una planta de pimiento dulce usando un vector de expresión que codifica una proteína BBM candidata cuyo vector de expresión produce actividad de transcripción nuclear inducible de dicha proteína BBM candidata. Tras la transformación en una célula vegetal de una planta de pimiento dulce, se dará el desarrollo del material vegetal en cuestión en una o más plantas transgénicas maduras según la invención. Recae bien dentro de las capacidades del experto establecer si un gen o proteína es un homólogo funcional de BBM según la invención. En una exploración inicial, el experto puede consultar herramientas biotecnológicas moleculares electrónicas contemporáneas y bases de datos proporcionadas por institutos como el NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) o cualquier otra de dicho instituto. Dichas herramientas y bases de datos proveen al experto de medios para evaluar rápidamente si hubiera cualquier indicación si algún gen desconocido o proteína podría ser un homólogo funcional de BBM. Tal indicación puede comprender información de una secuencia desconocida en relación a BBM con respecto a la conservación y clasificación evolutiva en clados relacionados o en el mismo clado; si la secuencia desconocida pertenece a una clase de genes o proteínas relacionados con BBM, como la familia AP2 que comprende ANT, PLT1, PLT2; compartir un dominio particular, como el dominio AP2; el número de tales dominios compartidos, un dominio AP2 único o repetido; nomenclatura de genes o proteínas, como secuencias denominadas tipo-BBM. Por consiguiente, solamente un número limitado de genes o proteínas estarían en una segunda etapa de investigación necesaria para ser transformados en una planta recalcitrante, en particular pimiento dulce, para confirmar si la secuencia de interés es un homólogo funcional BBM. Siguiendo este procedimiento, el experto en la técnica de biotecnología moderna sería por lo tanto capaz de establecer, sin carga excesiva, si un gen o proteína podría ser un homólogo funcional BBM.

El término "identidad de secuencia" se define en esta memoria como el número de aminoácidos idénticos en toda la longitud de la proteína BBM según la SEQ ID NO: 1, dividido por el número de aminoácidos de toda la longitud de la proteína y multiplicado por 100. Por ejemplo, una secuencia con 90% de identidad con la SEQ ID NO: 1 comprende en toda la longitud de secuencia de 579 aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 521 aminoácidos idénticos, como se ejemplifica por el siguiente cálculo:  $521/579 * 100 = 90\%$ .

BBM está conservada a lo largo de una variedad de diferentes especies, como *Brassica napus*, *Arabidopsis thaliana*, *Medicago trunculata*, *Glycine max*, *Zea mays*. Como se describe en esta solicitud, es posible usar un gen BBM de una planta de un taxón de las Crucíferas (o Brassicaceae) para obtener, mediante un método que comprende transformación y regeneración, una planta transgénica madura a partir de la distinta y distante familia de las Solanáceas. El nivel de conservación evolutiva probablemente representa a estas proteínas adecuadas para la aplicación del método sobre diferentes especies de plantas recalcitrantes, abarcando las Solanáceas, o incluso que van desde monocotiledóneas hasta dicotiledóneas.

Tabla 1.

número gi	especie de planta
gi: 21069055	Brassica napus
gi: 21069053	Brassica napus
gi: 58761187	Medicago trunculata
gi: 21069057	Arabidopsis thaliana Col 0
gi: 151936654	Arabidopsis thaliana C 24
gi: 46451393	Arabidopsis thaliana
gi: 9755766	Arabidopsis thaliana
gi: 195615496	Zea mays
gi: 195612040	Zea mays
gi: 21304227	Oryza sativa
gi: 189170271	Pennisetum squamulatum
gi: 189170265	Pennisetum squamulatum
gi: 189170267	Cenchrus ciliaris
gi: 189170269	Cenchrus ciliaris

Tabla 1: Números GI (Identificador GenInfo) de proteínas de varias especies de plantas que se parecen a BBM de SEQ ID NO: 1.

5 Se describe la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína BBM que está operativamente ligada a un elemento genético seleccionado del grupo que consiste en un activador de transcripción, un activador de transcripción o un sistema de localización nuclear.

10 Tales elementos genéticos permiten el control de la actividad de la proteína BBM para permitir una actividad espacial y/o temporal de la proteína BB6M. En esta memoria la actividad espacial quiere decir que se puede lograr actividad de BBM específica de un órgano o tejido. Una ventaja de usar tales elementos genéticos es que se puede prevenir la aparición de problemas relacionados con la expresión o actividad inapropiadas de la proteína BBM.

En una realización preferida la proteína BBM está operativamente ligada a un sistema de localización nuclear. En esta realización es posible controlar la actividad de BBM originando la proteína BBM::GR fusionada translacionalmente para migrar o translocarse al núcleo.

15 Cuando el elemento genético según la invención es un activador de transcripción, es posible regular la actividad de BBM a un nivel transcripcional. Tal sistema de inducción de la transcripción puede ser un sistema que comprende un promotor inducible por etanol o un promotor inducible por choque térmico. Se puede usar un activador de traducción, que se puede localizar en la secuencia 5'UTR o 3'UTR, para regular la actividad BBM mediante control de la traducción. Quedará claro para el experto qué sistemas se pueden usar para inducir actividad BBM según los elementos genéticos mencionados anteriormente. Otros sistemas apropiados incluyen un sistema inducible por estrógeno, un sistema inducible por PRP, un sistema inducible por UAS, cualquier sistema que comprenda VP16.

20 En una realización preferida de la presente invención la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína BBM está operativamente ligada a una secuencia de nucleótidos caracterizada por la SEQ ID NO: 2. El péptido codificado por esta secuencia de nucleótidos permite que se induzca la actividad de la proteína BBM cuando el material vegetal se pone en contacto con un medio que comprende dexametasona (DEX).

25 Según la presente invención, la célula vegetal o material vegetal transformado regenerador se pone en contacto con un medio que comprende un agente adecuado para la inducción de actividad de la proteína BBM.

Se describe el etanol como el agente que es adecuado para la inducción de la actividad de la proteína BBM. El etanol se puede usar para inducir la transcripción del gen exógeno BBM. También son adecuados otros sistemas

para la inducción de la transcripción. La actividad de BBM se puede también regular a otros niveles, como a nivel de traducción o post-traducción.

5 Según una realización en este aspecto, el vector de expresión codifica además uno o más marcadores seleccionables, una o más proteínas de interés y/o uno o más productos de transcripción de interés. Dichas proteínas de interés comprenden cualquier proteína que proporciona resistencia a cualquier patógeno de interés, pero también una proteína que es parte de una vía que conduce a la producción de vitaminas, nutrientes, azúcares, y similares.

10 Además se describen la planta transgénica madura o material de la misma, que se puede obtener mediante un método como se describió anteriormente, que comprende una secuencia de nucleótidos exógena que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína BBM y un elemento genético adecuado para permitir la inducción de actividad de la proteína BBM, en donde la planta transgénica madura es una planta recalcitrante. La planta transgénica madura es una planta de pimiento dulce *Capsicum annuum*.

15 La planta transgénica madura comprende una proteína BBM exógena, u homólogo funcional que se caracteriza por tener al menos 50%, 60%, 70% de identidad, preferiblemente al menos 80% de identidad, más preferiblemente al menos 90% de identidad, incluso más preferiblemente al menos 95% de identidad y lo más preferiblemente al menos 98% de identidad con la SEQ ID NO: 1 o en donde la proteína BBM exógena es la SEQ ID NO: 1. Preferiblemente, la planta transgénica madura comprende en su genoma una secuencia de nucleótidos exógena que codifica la proteína BBM.

20 En esta memoria, una secuencia de nucleótidos exógena es una secuencia de nucleótidos que se ha introducido en material vegetal a través de un procedimiento biotecnológico, como transformación. Una proteína exógena es una proteína que está codificada por una secuencia de nucleótidos exógena.

Según la invención, el elemento genético adecuado para permitir la inducción de actividad de la proteína BBM exógena seleccionado del grupo que consiste en un activador de transcripción, activador de traducción o preferiblemente un sistema de localización nuclear.

25 Una ventaja de la invención es que la actividad de la proteína BBM exógena se puede inducir, tanto de manera espacial como temporal, para permitir una adecuada actividad o expresión de la proteína BBM. Parece especialmente ventajoso que, además de la posibilidad de inducir transformación y/o regeneración, se puede reducir o anular la actividad de BBM exógena durante las etapas de desarrollo en donde la actividad BBM exógena puede tener efectos desfavorables y adversos. La actividad espacial de BBM exógena se puede controlar usando promotores específicos de tejido. Por ejemplo, el uso de un promotor que no es activo durante las etapas reproductivas del desarrollo vegetal puede prevenir problemas relacionados con la esterilidad. El uso de un promotor que es activo durante etapas de crecimiento y desarrollo de plántula puede ser preferido durante la regeneración del material vegetal transformado.

30 Los elementos genéticos según la invención están ligados operativamente al gen BBM exógeno para permitir una actividad adecuada de BBM exógena. Los elementos adecuados comprenden cualquier sistema inducible por choque térmico, sistema inducible por etanol, sistema inducible por estrógeno, sistema inducible por PRP, sistema inducible por UAS, cualquier sistema que comprende VP16.

35 Además se concibe posible controlar la actividad BBM por métodos basados en el uso de un represor dominante, un activador dominante, un constructo anti-sentido, un constructo de RNAi, un knock-out (con gen desactivado), u otros métodos que ordenan el mismo efecto de influir en la actividad BBM.

40 Una realización preferida de la invención se refiere al elemento genético adecuado que permite la inducción de la actividad de la proteína BBM que se caracteriza por la SEQ ID NO: 2. Este elemento genético puede estar operativamente ligado a la proteína BBM, lo que da como resultado una fusión de traducción. Tal ligazón operativa permite a la proteína localizarse en el núcleo de una célula transgénica a través del cual se permite la inducción de la actividad BBM. En esta realización, la activación de BBM exógena está mediada por el péptido codificado por la SEQ ID NO: 2 que permite que se induzca la actividad de la proteína BBM cuando el material vegetal se pone en contacto con un medio que comprende dexametasona.

45 Además, se describen la progenie, partes de plantas, semillas o clones de una planta transgénica madura. Tal progenie se puede obtener a partir de una planta transgénica madura por ejemplo mediante propagación asexual de tejidos u órganos. En ese caso, la progenie se puede obtener por métodos adecuados para propagar una célula, tejido, órgano o cualquier parte de la planta adecuada. Tal método puede comprender el clonaje de material vegetal por varios medios, injerto, propagación de cortes de hojas, enraizamiento de esquejes, u otros métodos adecuados de este tipo. Los métodos de propagación pueden comprender también tecnologías basadas en la preparación de gametos para obtener una progenie. Tales tecnologías comprenden la producción de progenie doble-haploide por ginogénesis o androgénesis. También concebidos para obtener progenie están métodos adecuados que comprenden cultivo de tejido vegetal o cultivo de célula vegetal.



También se considera posible ejercer la invención clonando un gen BBM en un constructo genético que comprende secuencias de nucleótidos que permiten que se escinda, se recombine o se pierda una secuencia de nucleótidos que codifica BBM del genoma de una célula vegetal. Tal sistema incluye por ejemplo el sistema Cre-Lox o el sistema FLP/FRT, pero puede también comprender otro sistema de recombinación adecuado.

- 5 Se observa además que la progenie transgénica y/o no transgénica se puede obtener a partir de una planta transgénica madura. Tal progenie se puede obtener por fertilización cruzada o por auto-fertilización de la planta madura permitiendo la segregación del transgén según leyes Mendelianas. Se puede obtener la progenie no transgénica por auto-fertilización de una planta transgénica madura que es heterocigota para el transgén o por cruzamiento de una planta transgénica madura con cualquier otra planta adecuada que no comprenda un transgén  
10 BBM a través del cual se pueda obtener una progenie no transgénica.

Se describe el uso de una planta o parte de la planta transgénica madura que se puede obtener según el método de la presente invención como un sistema de co-transformación.

- 15 En esta memoria se conciben algunas realizaciones; en una primera realización hay material vegetal de una planta que comprende un BBM inducible exógeno, como una planta de pimiento dulce T1 o superior, transformada con otro constructo de expresión que puede comprender un gen de interés. Esta planta T1 o superior puede ser heterocigota u homocigota para el transgén BBM inducible exógeno. En una segunda realización hay un material vegetal que se origina de una planta transformada recalcitrante no transgénica (y regenerada hacia una planta transgénica madura) con un constructo de expresión que comprende, además de la secuencia de nucleótidos que  
20 codifica una proteína BBM inducible, otra secuencia de nucleótidos que puede codificar uno o más genes de interés o uno o más elementos genéticos de interés. Una ventaja de esta estrategia es que la inclusión de una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína BBM inducible permite una transformación y regeneración eficientes libre de marcador como en esencia cada planta madura obtenida comprenderá el constructo BBM inducible y la secuencia de nucleótidos adicional de interés.

- 25 En una realización adicional, una célula o material vegetal recalcitrante no transgénico se transforma con un constructo de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína BBM inducible y un segundo constructo de expresión diferente que comprende una secuencia de nucleótidos adicional de interés. Preferiblemente, la célula vegetal o material vegetal se ponen en contacto simultáneamente con ambos constructos de expresión. Esta secuencia de nucleótidos adicional de interés puede o preferiblemente codifica una proteína adicional de interés. Una ventaja de estas realizaciones es que las especies de plantas recalcitrantes, p.  
30 ej. pimiento dulce, se pueden transformar y regenerar esencialmente con cualquier secuencia de nucleótidos o genes de interés. Tal secuencia de nucleótidos de interés se puede seleccionar de una secuencia de RNAi o secuencia anti-sentido dirigida a una secuencia de interés, una secuencia de sobreexpresión, secuencia de ganancia de función, o cualquier otra secuencia de interés.

- 35 Ambas realizaciones permiten obtener una planta transgénica madura, como el pimiento dulce, que comprende, además de la BBM exógena, cualquier otra molécula de nucleótidos de interés.

- La primera realización referida al sistema de co-transformación tiene una ventaja adicional en el sentido que se puede seleccionar primero una planta transgénica que comprende BBM exógena en base a un fenotipo o genotipo adecuado. Un fenotipo adecuado puede incluir una planta en desarrollo o creciendo suficiente o una planta que posee una fertilidad adecuada o cualquier otro fenotipo adecuado o preferido. Un genotipo adecuado puede referirse a la estabilidad del transgén, el nivel de expresión de BBM tal como el causado por un efecto de posición,  
40 la fuga del constructo, esto es, actividad inapropiada de BBM, el número de transgenes en una planta individual, el número de constructos presentes en un sitio de integración único en una planta individual (se puede insertar copias múltiples del constructo de T-DNA en un locus único) o cualquier otra propiedad adecuada o preferida.

- 45 La segunda realización relacionada con el sistema de co-transformación tiene una ventaja adicional en el sentido que permite obtener una planta recalcitrante que comprende, además de BBM exógena, cualquier otra secuencia de nucleótidos de interés, en un único tratamiento de transformación y regeneración.

Se observa especialmente en esta memoria que es posible usar protoplastos para dicha co-infección o co-transfección en ambas realizaciones.

- 50 Así, se proporciona un método para obtener una planta transgénica madura, que comprende la inducción de la actividad BBM en una célula vegetal transformada o en un material vegetal transformado durante la regeneración del mismo, en donde la célula vegetal o material vegetal comprende una molécula de nucleótidos exógena que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína BBM que está operativamente ligada a un elemento genético adecuado para permitir la inducción de la actividad de la proteína BBM, en donde la célula vegetal del material vegetal se deriva de pimiento dulce. Cuando se desee, la célula vegetal transgénica o el  
55 material vegetal transgénico se regenera en una planta transgénica madura. La célula vegetal o el material vegetal se puede derivar de un transformante T1 o superior. Esta planta es preferiblemente homocigota pero también puede ser heterocigota para el transgén BBM inducible.

Se puede lograr la regeneración poniendo en contacto la célula vegetal transformada o material vegetal con un medio que comprende un agente adecuado para la inducción de la actividad de la proteína BBM.

5 Como la planta T1 o superior comprende una proteína BBM de la que se puede inducir su actividad, la planta recalcitrante respectiva se hace competente de regeneración tras la activación de BBM. Esto abre la posibilidad de que la célula vegetal transformada o material vegetal se pueda transformar con otra molécula de nucleótidos que comprende otra secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos adicional de interés, en particular una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de interés, y regenerar este material vegetal en una planta transgénica madura. Esta segunda secuencia de nucleótidos de interés puede comprender también una secuencia RNAi o secuencia anti-sentido dirigida a una secuencia de interés, una secuencia de sobreexpresión, 10 una secuencia de ganancia de función, o cualquier otra secuencia de interés. Tener una planta recalcitrante competente de regeneración, debido a la presencia de una proteína BBM exógena cuya actividad se puede inducir, es en particular de interés para el pimiento dulce que ahora por primera vez puede ser transformado y regenerado eficientemente hasta la madurez, en teoría con cualquier secuencia de nucleótidos o genes de interés. En esta realización, el método se usa así como un sistema de co-transformación como se entiende en esta memoria.

15 Alternativamente, la regeneración de células vegetales o material vegetal que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína BBM inducible se puede usar para fines de multiplicación de plantas ya que plantas transgénicas que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína BBM exógena inducible desarrollan numerosos embriones somáticos cuando se ponen en contacto con un medio de cultivo que comprende un agente adecuado para la inducción de BBM como se entiende en esta memoria. Preferiblemente, este medio también comprende una cantidad adecuada de una citoquinina, como tidiazuron, zeatina o 6-bencilaminopurina, incluso cuando se desean más embriones somáticos. Ya que se encontró que el número de embriones somáticos distinguibles en la superficie de explantes de cotiledón excedía al menos 100, es posible aislar estos embriones y permitir que germinen y se desarrollen más en plantas transgénicas maduras. Este material vegetal que se puede multiplicar preferiblemente se deriva de explantes, en particular de explantes de 20 cotiledón.

Adicionalmente, se puede someter material o células de material vegetal madurando o creciendo derivados de embriones somáticos a otra ronda de multiplicación induciendo BBM durante la regeneración dando como resultado la producción de embriones somáticos de los mismos.

En esta solicitud se hace referencia a las siguientes figuras:

30 La Figura 1 presenta un árbol filogenético de proteínas BBM de varias especies vegetales.

La Figura 2 muestra un explante de 3 semanas de edad con formación de callo.

La Figura 3 muestra la formación de callo y SLS del control.

La Figura 4 muestra la formación de un embrión somático sobre SLS en explantes transformados con 35S::BBM:GR.

35 La Figura 5 muestra brotes alargándose.

La Figura 6 muestra un brote con raíces.

La Figura 7 muestra un tipo California rojo transgénico.

La Figura 8 muestra un tipo California amarillo transgénico.

La Figura 9 muestra semillas de plantas transgénicas.

40 La Figura 10 muestra la segregación de la descendencia en un medio que contiene Km.

La Figura 11 presenta los fenotipos de segregación de plantas transgénicas. La fila superior presenta plántulas resistentes a Km, la fila inferior presenta plántulas susceptibles a Km.

La Figura 12 presenta el porcentaje de callo, estructura tipo brote (SLS), y formación de brote de explantes cotiledonarios transformados ya sea con control o con 35S::BBM:GR.

45 La Figura 13 exhibe un gel de un resultado de PCR llevado a cabo en plantas de pimiento transgénicas. Línea: M, marcador molecular; P, plásmido de DNA 35S::BBM:GR; A, Arabidopsis no transgénica; A<sup>+</sup>, Arabidopsis transgénica; C, pimiento no transgénico; C1-4 pimientos dulces transgénicos independientes; C5-8 brotes de pimiento transgénico derivados del mismo explante.

La Figura 14 muestra la regeneración de un brote de petunia transgénica de origen W138.

50 La Figura 15 muestra la regeneración de un brote de petunia transgénica de origen W138.

La Figura 16 presenta la SEQ ID NO: 1.

La Figura 17 presenta la SEQ ID NO: 2.

La Figura 18 presenta la SEQ ID NO: 3.

5 La Figura 19 muestra la formación de embrión somático en el borde de un sitio de herida en la progenie T1 de un 35S::BBM:GR que comprende una línea transgénica de pimiento dulce, después de la inducción de actividad babyboom (explosión de la natalidad) de transcripción nuclear.

La presente invención se ilustra además por los siguientes ejemplos.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1

#### 10 Transformación genética del pimiento dulce con BBM

La transformación genética de plantas de pimiento dulce de la especie *Capsicum annuum* que comprende la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID: 2. Se usaron plantas de fenotípicamente y genotípicamente distintas variedades Fiesta, Ferrari y Spirit.

#### Crecimiento de plantas donantes

15 Se sembraron semillas esterilizadas de superficie de híbridos F1 Fiesta, Ferrari y Spirit (Enza Zaden, Holanda) en un medio MS de máxima resistencia (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con sacarosa al 2%, solidificado con Microagar (Duchefa) al 0,8%. Se cortaron cotiledones de 10 días en explantes de 3-10 mm y se pre-cultivaron en medio de co-cultivo (CCM) durante 1-2 días en condiciones de luz tenue a 23°C. CCM comprende medio R modificado suplementado con glucosa al 1,6% y ribósido de zeatina a 2mg/l, ácido indol-3-acético (IAA) a 0,1 mg/l, o Tidiazuron (TDZ) a 0,25 – 1mg/l, Dexametasona 10 µM y solidificado con Microagar al 0,7%. Se usaron una  
20 media de 200 explantes por constructo en 6-10 experimentos repetidos independientemente.

#### Crecimiento de *Agrobacterium tumefaciens*

25 La cepa *Agrobacterium tumefaciens* GV3101+pMP90 que lleva el 35S::BBM:GR (que comprende el promotor 35S que está ligado operativamente a la secuencia que codifica BBM (SEQ ID NO: 1) al que está fusionado traduccionalmente el Receptor de Corticoide (GR), 35S::BBM (que comprende el promotor 35S, ligado operativamente a la secuencia que codifica BBM (SEQ ID NO: 2)) o un plásmido control que lleva 35S::GUS, se crecieron en presencia de antibióticos apropiados, Rifampicina (100 mg/l), sulfato de Kanamicina (100 mg/l), y/o Gentamicina (25 mg/l) en 100 ml de medio YEB (extracto de levadura al 0,5%, extracto de carne de vacuno al 0,5%, sacarosa al 2%, pH 7,2) como un cultivo nocturno a 28°C. Antes de la transformación vegetal, se diluyó la  
30 suspensión de *Agrobacterium tumefaciens* a una DO660 de 0,3-0,4 con líquido CCM suplementado con acetosiringona (Sigma) recién preparada a 40 mg/l.

#### Transformación genética del material vegetal

35 Se añadió el cultivo diluido de *Agrobacterium tumefaciens* a los explantes pre-cultivados y se incubaron a temperatura ambiente durante 30-60 minutos. Los explantes se secaron y se co-cultivaron además en CCM suplementado con Acetosiringona a 40 mg/l durante 2-3 días en condiciones de luz tenue a 23°C antes de transferirse a medio selectivo que consiste en el CCM suplementado con sulfato de Kanamicina a 100 mg/l y Cefotaxima a 500 mg/l.

#### Regeneración del material vegetal transgénico

40 Se transfirieron los explantes a condiciones de luz completa en un régimen de 16/8 h día/noche a 23°C durante dos meses con un sub-cultivo después de cuatro semanas. Se transfirieron los explantes con estructuras tipo brote emergentes durante un periodo de cuatro semanas a medio de alargamiento (EM) que consiste en mezcla de macro- y micro-sales de medio MS (Murashige y Skoog 1962), vitaminas según medio B5 (Gamborg O.L. 1968), glucosa al 1,6%, inositol a 1 mg/l, sulfato de Adenina 20 mg/l, hidrolizado de Caseína a 200 mg/l, GA3 a 10 mg/l, BAP a 4 mg/l, tiosulfato de plata 30 µg, sulfato de Kanamicina a 100 mg/l, y Cefotaxima a 500 mg/l. Se transfirieron  
45 brotes alargados durante un periodo de dos meses a medio pre-enraizamiento (PRM), medio MS modificado suplementado con glutatión a 30 mg/l, sulfato de kanamicina a 69 mg/l, y Cefotaxima a 300 mg/l y después a medio de enraizamiento, que consiste en medio Rugini suplementado con sacarosa al 2%, Cefotaxima a 50 mg/l y Vancomicina, con o sin IAA a 1 mg/l. Se transfirieron brotes enraizados al invernadero para permitir que se produzca la semilla. Todos los productos químicos relacionados con el cultivo de tejidos fueron suministrados por  
50 Duchefa Biochemicals, Haarlem, Holanda.

Análisis de brotes Transgénicos

5 Se aisló DNA de hojas a través de un método de mini-preparaciones CTAB y se disolvió en 50 µl de TE (Tris 10 mM pH 8, EDTA 1 mM). Se diseñaron iniciadores específicos de BBM basados en las secuencias de cDNA publicadas (AF317904, y -905), BBMfw: gtaggytctctctmctcc, BBMrw: gggctgcaaatccttgataacca. Se usaron como controles DNA del plásmido transformado y una línea de Arabidopsis transgénica. La mezcla de PCR se usó según el protocolo del proveedor. Condiciones de PCR: 15 seg. 94°C; 30 seg. 48°C; 45 seg. 72°C; 35 ciclos. Los resultados se presentan en la Figura 13.

Análisis de la descendencia transgénica

10 Cada brote transgénico individual fue auto-polinizado y también cruzado con una planta de la línea donante original para analizar la herencia del transgén. Después de la cosecha las semillas se esterilizaron superficialmente y se sembraron en medio MS, sacarosa al 2%, microagar al 0,8%, y sulfato de kanamicina a 200 mg/l o sulfato de Paromicina a 100 ml/l. Se evaluó la segregación 4 semanas después de la siembra.

Resultados

15 En total, se co-cultivaron más de 10.000 explantes de los tres cultivares con el control o con el constructo BBM. Durante las tres primeras semanas de cultivo en medio selectivo todos los explantes aumentaron de tamaño y se hicieron visibles pequeños callos verde claro o blanquecinos. Después de dos semanas adicionales, se produjo la formación de callo y/o la formación directa de brote en la superficie cortada, dependiendo del tipo de citoquinina usada. En presencia de TDZ, los explantes formaron múltiples estructuras tipo brote (SLS) mientras el ribósido de zetaina indujo predominantemente callo y un número reducido de SLS (Fig. 2 y 3). En esta etapa, los explantes transformados con 35S::BBM:GR produjeron más SLS que el control. Después de la transferencia a medio EM solamente 35S::BBM:GR SLS proliferaron y formaron ya sea brotes o embriones somáticos en las hojas primarias dentro de las siguientes 3-4 semanas (Fig. 4 y 5 y Tabla 2). Se mejoraron todos, la germinación, el alargamiento y la formación de brotes apropiados después de la transferencia a PRM. La formación de raíz se produjo después de la transferencia de brotes alargados a un medio enraizante dentro de las dos semanas después de la transferencia. Seis meses después de la transformación, los brotes enraizados se transfirieron a bloques de lana de roca y se adaptaron a las condiciones del invernadero para la producción de semillas.

Tabla 2

	Ningún explante	Ningún SLS	% de SLS	Brotes enraizados
35S::BBM:GR	5.620	662	11,78	170
35S::BBM	1.128	11	0,98	0

La Tabla 2 presenta una comparación de la regeneración con dos constructos BBM.

30 Se produjeron brotes transgénicos de las transformaciones con el constructo 35S::BBM:GR pero ninguno con el control. Bajo las condiciones elegidas las transformaciones del control presentaron producción de callo más que estructuras tipo brote (SLS) o brotes (Fig. 12). De las tres líneas ensayadas, Fiesta presentó la mayor capacidad de regeneración (48%), seguido por Spirit (3,4%) y Ferrari (1,7%) (Tabla 3). Después de la adaptación a las condiciones del invernadero, las plantas crecieron rápidamente y florecieron pero se mantuvieron un 30% más cortas que las plantas control no transformadas. Se realizaron satisfactoriamente las autofecundaciones y los cruces mostrando que la fertilidad no se afectaba por el proceso de transformación y regeneración.

40 La iniciación de la embriogénesis somática dio como resultado la formación de múltiples brotes de plantas transgénicas (Fig. 5). En total, se generaron más de 20 plantas transgénicas independientes a partir de Fiesta y Ferrari derivadas de varios experimentos de transformación independientes. El análisis molecular por PCR sobre plantas T0 independientes derivadas del mismo explante mostró que todos los brotes son transgénicos y que la eficiencia de transformación global puede variar entre 0,5 y 1%, calculado a partir del número inicial de explantes usados por transformación.

El análisis de segregación mostró que el trasgén se heredaba según un patrón Mendeliano (Tabla 4).

Tabla 3

	Nº de explantes	Nº de brotes	%
Ferrari	886	15	1,7
Fiesta	1.304	626	48
Spirit	1.781	61	3,4

La Tabla 3 muestra los porcentajes de formación de brotes de diferentes variedades después de la transformación con 35S::BBM:GR.

Tabla 4

ID de la planta	Origen	nº sembrado	Km R	Km S	ratio	nº locus
1702	Fiesta	42	31	11	3:1	1
2559	Fiesta	100	74	24	3:1	1
2639	Fiesta	113	0	113	0:1	0
2647	Fiesta	78	0	78	0:1	0
2649	Fiesta	70	51	19	3:1	1
2650	Fiesta	50	32	14	3:1	1
2655	Fiesta	50	37	11	3:1	1
2656	Fiesta	63	48	15	3:1	1
2676	Fiesta	24	20	4	5:1	>1
2691	Fiesta	14	13	1	13:1	>1
2692	Fiesta	49	42	7	6:1	>1
2693	Fiesta	100	98	2	49:1	>1
2696	Fiesta	77	65	12	5:1	>1
2697	Fiesta	100	75	25	3:1	1
2700	Fiesta	100	82	18	5:1	>1
2831	Ferrari	79	69	10	7:1	>1
2832	Ferrari	65	54	11	5:1	>1
3041	Ferrari	100	75	25	3:1	1

La Tabla 4 presenta el análisis de segregación de la descendencia de plantas transgénicas maduras autofertilizadas crecidas en medio selectivo.

5 Discusión

El resultado muestra que usando un gen BBM sobre-expresado inducible, se pueden generar brotes de buena calidad de plantas de pimiento dulce transgénicas directamente o a través de embriogénesis somática y que el transgén se hereda a la siguiente generación.

10 Se ha estudiado intensivamente la inducción de la formación de embrión somático en especies y variedades de pimiento picante que conduce a la regeneración en plantas normales. En el pimiento dulce, sin embargo, fue posible la inducción de embriones somáticos pero los embriones carecen del meristemo apical y no se desarrollan

en plantas normales. Mediante activación del gen BBM durante el proceso de regeneración fue posible regenerar plantas de pimiento dulce fértiles.

#### Ejemplo 2

##### Transformación genética de Petunia recalcitrante W138 con BBM

- 5 La línea de Petunia W138 ha demostrado ser recalcitrante a la regeneración y la posterior producción de plantas transgénicas.

En un intento de obtener plantas de Petunia transgénicas maduras, se transformaron explantes de W138 usando un protocolo estándar para la transformación de petunia.

- 10 Se transformaron dos líneas de origen W138 (NC2676-10, NC2676-11) y una de origen W5 (293) con el constructo BBM inducible (35S::BBM:GR), o un constructo T-DNA control, en este caso que contiene el gen reportero GUS. Se obtuvieron callos resistentes a Kanamicina de todas las tres líneas con ambos constructos, con la mayor eficiencia para NC2676-11, seguido de 293. Los callos del constructo control presentaron una fuerte expresión GUS.

- 15 Aparecieron primero estructuras tipo brote (SLS) y primordios en la línea NC2676-11 seguido de las otras en el mismo orden, aunque se observó desarrollo y crecimiento solamente en callos transformados con 35S::BBM:GR (Fig. 14 y 15).

Al igual que en el pimiento dulce, la sobre-expresión de BBM lleva a la formación de brotes transgénicos en una planta recalcitrante.

#### Ejemplo 3

- 20 Análisis de la progenie de líneas 35S::BBM:GR

Se creció la progenie homocigota T1 de múltiples líneas 35S::BBM:GR *in vitro* en medio de co-cultivo que comprende además TDZ, DEX y/o TDZ y DEX o sin TDZ/DEX como un control.

- 25 El cultivo de explantes de cotiledón de líneas 35S::BBM:GR homocigotas reveló diferencias de desarrollo causadas por la proteína BBM inducida nuclear y no nuclear. En el borde del cotiledón donde ha sido transversalmente cortado se forman embriones somáticos (Fig. 19). Estos efectos no se observan en explantes de cotiledón crecidos en medio sin DEX.

- 30 Los resultados en esta memoria muestran que se puede usar la expresión de BBM exógena y controlada para producir brotes morfológicamente normales y de alta calidad de pimiento dulce transgénico. Tales embriones somáticos de hecho tenían una semejanza sorprendente con embriones cigóticos. De hecho, se pueden inducir un alto número (>100) de embriones somáticos en cotiledones de pimiento. La alta cantidad de tales embriones que se pueden identificar en explantes de pimiento es suficiente para permitir un factor de multiplicación de al menos 100 veces a alcanzar en la generación de plantas de pimiento dulce maduras en cultivo de tejidos. Este hallazgo también permite multiplicar plantas de pimiento dulce estériles masculinas sin la necesidad de usar una línea de mantenimiento.

- 35 Referencias

Bent AF. (2000) Arabidopsis in planta transformation. Uses, mechanisms, and prospects for transformation of other species. *Plant Physiol.* 124:1540-7.

Broothaerts W, Mitchell HJ, Weir B, Kaines S, Smith LM, Yang W, Mayer JE, Roa-Rodríguez C, Jefferson RA (2005) Gene transfer to plants by diverse species of bacteria. *Nature* 433:629-33.

- 40 De Witt and Bosland (1997) *Pepper of the world: an identification guide*. Ten Speed Press, Berkeley.

Gamborg O.L. MRA, Ojima K. (1968) Nutrient Requirement of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50

Murashige T, Skoog F (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para producir una planta de pimiento dulce *Capsicum annuum* transgénica fértil, dicho método comprende:
- 5 (a) transformar una célula vegetal de pimiento dulce *Capsicum annuum* con un vector de expresión que codifica una proteína babyboom (BBM), en donde dicho vector de expresión produce una actividad de transcripción nuclear inducible de dicha proteína babyboom (BBM);
- 10 (b) regenerar dicha célula vegetal de pimiento dulce *Capsicum annuum* transformada en estructuras tipo brote (SLS) en condiciones inductoras que dan como resultado una actividad de transcripción nuclear de dicha proteína babyboom (BBM), dichas condiciones inductoras comprenden poner en contacto dicha célula vegetal de pimiento dulce *Capsicum annuum* transformada con un medio que comprende un agente que produce dicha actividad de transcripción;
- 15 (c) cultivar dichas estructuras tipo brote (SLS) en una planta de pimiento dulce *Capsicum annuum* transgénico fértil en condiciones no inductoras que dan como resultado la ausencia substancial de actividad de transcripción nuclear de dicha proteína babyboom (BBM);
- 20 en donde dicha proteína babyboom (BMM) tiene al menos 70%, preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 90%, incluso más preferiblemente al menos 95%, y lo más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia a nivel de aminoácido con la SEQ ID NO: 1 en condiciones en que dicha proteína babyboom (BBM) tiene actividad de transcripción.
2. Un método según la reivindicación 1, en donde dicha actividad de transcripción nuclear inducible se proporciona mediante una secuencia de localización nuclear según SEQ ID NO. 2.
3. Un método según la reivindicación 2, en donde dicho agente es dexametasona.
4. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en donde dicho vector de expresión codifica además uno o más marcadores seleccionables, una o más proteínas de interés y/o uno o más productos de transcripción de interés.

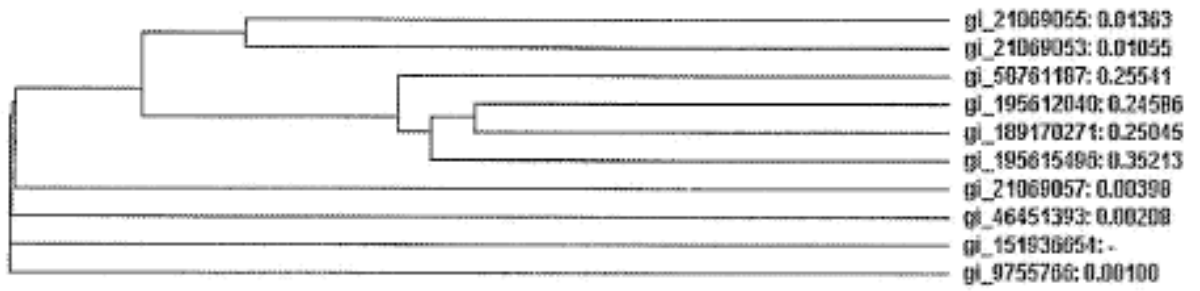


Figura 1



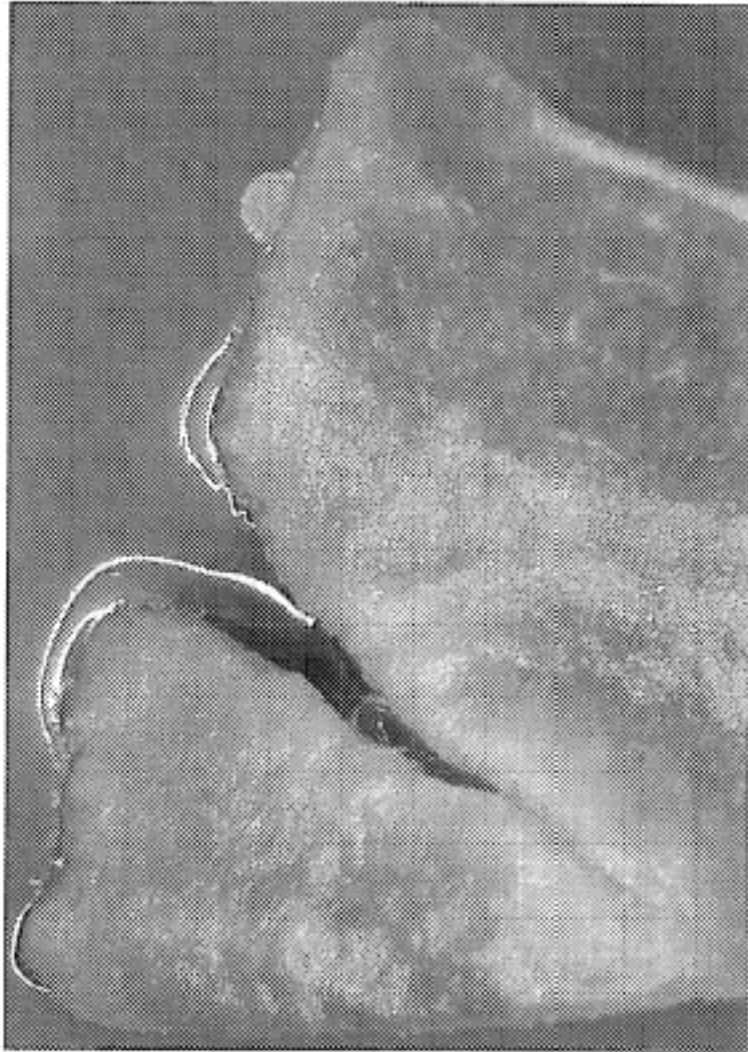


Figura 2

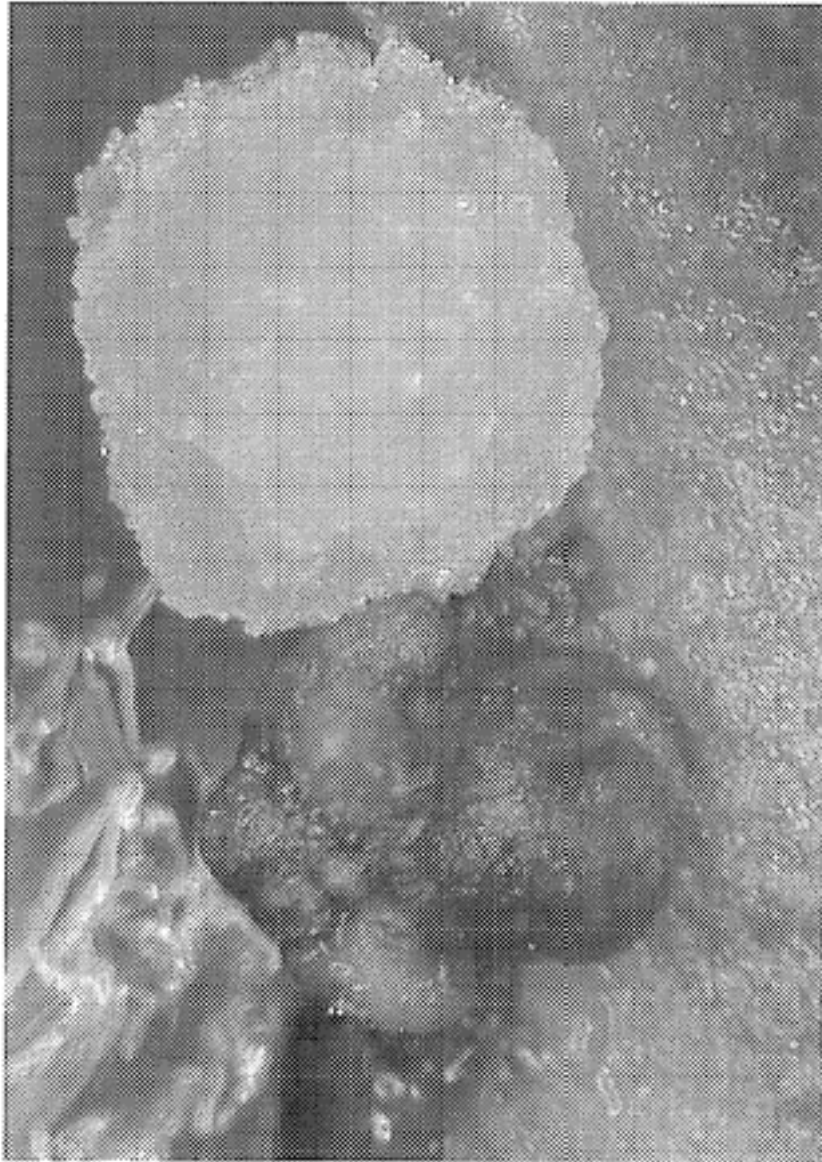


Figura 3



Figura 4

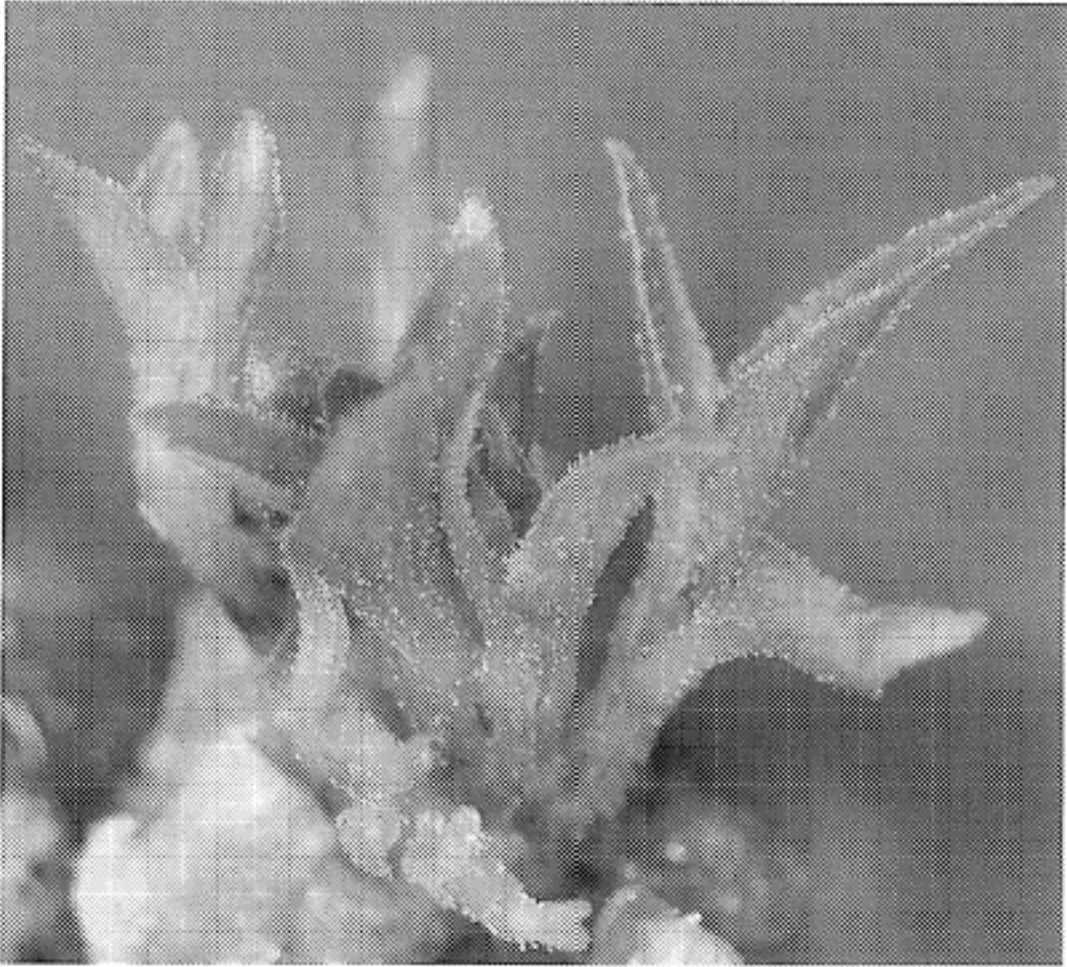


Figura 5

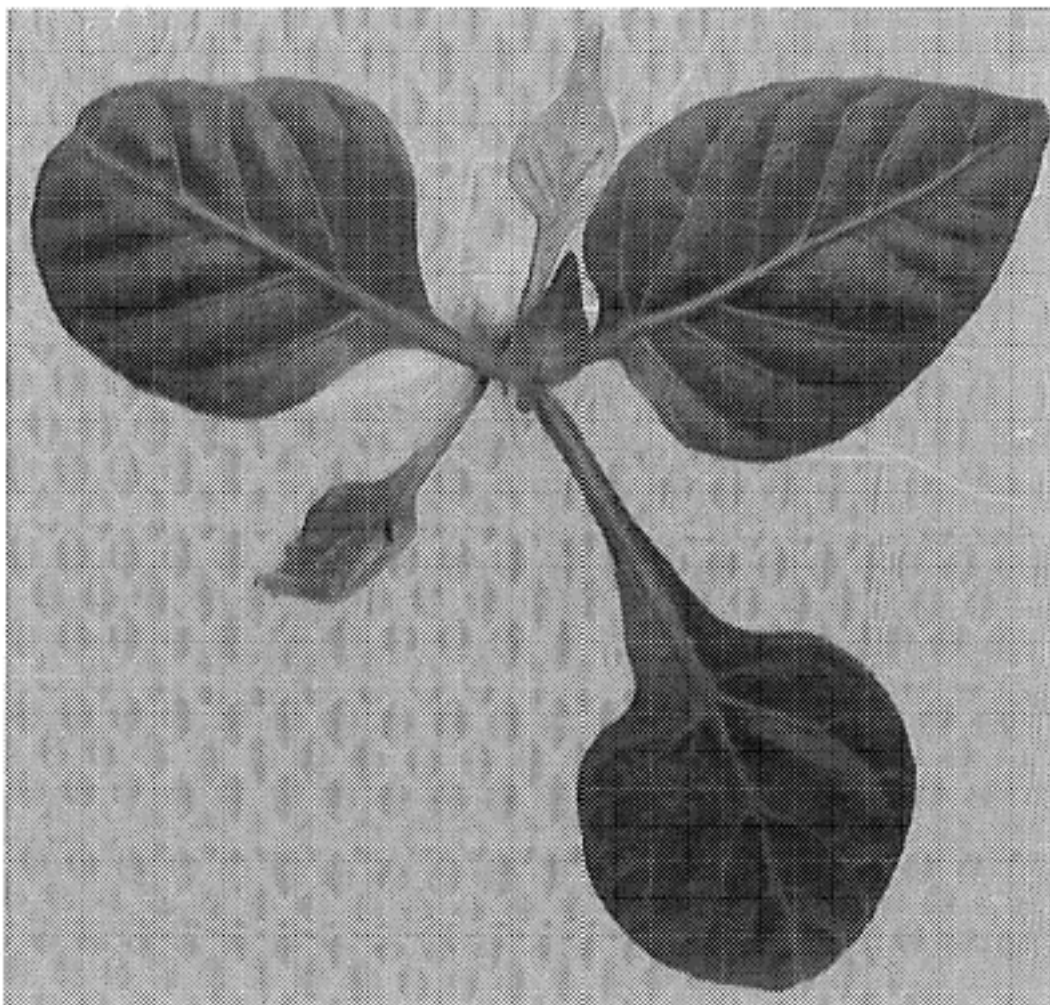


Figura 6



Figura 7





Figura 8

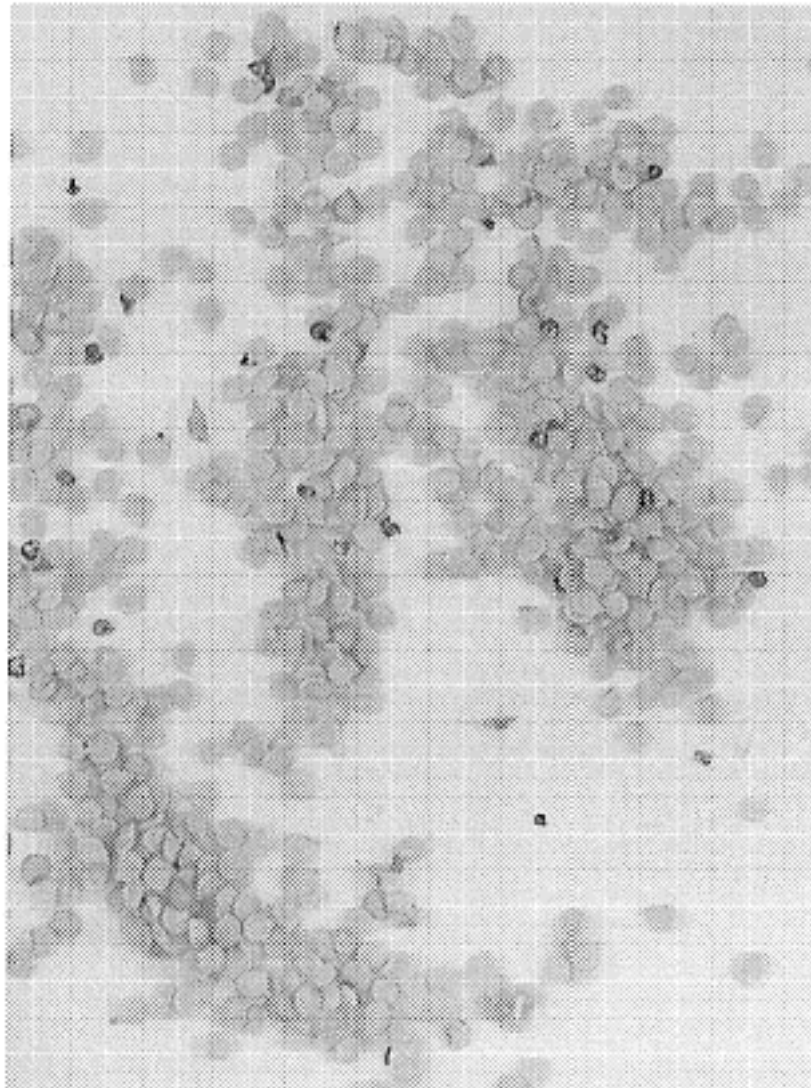


Figura 9



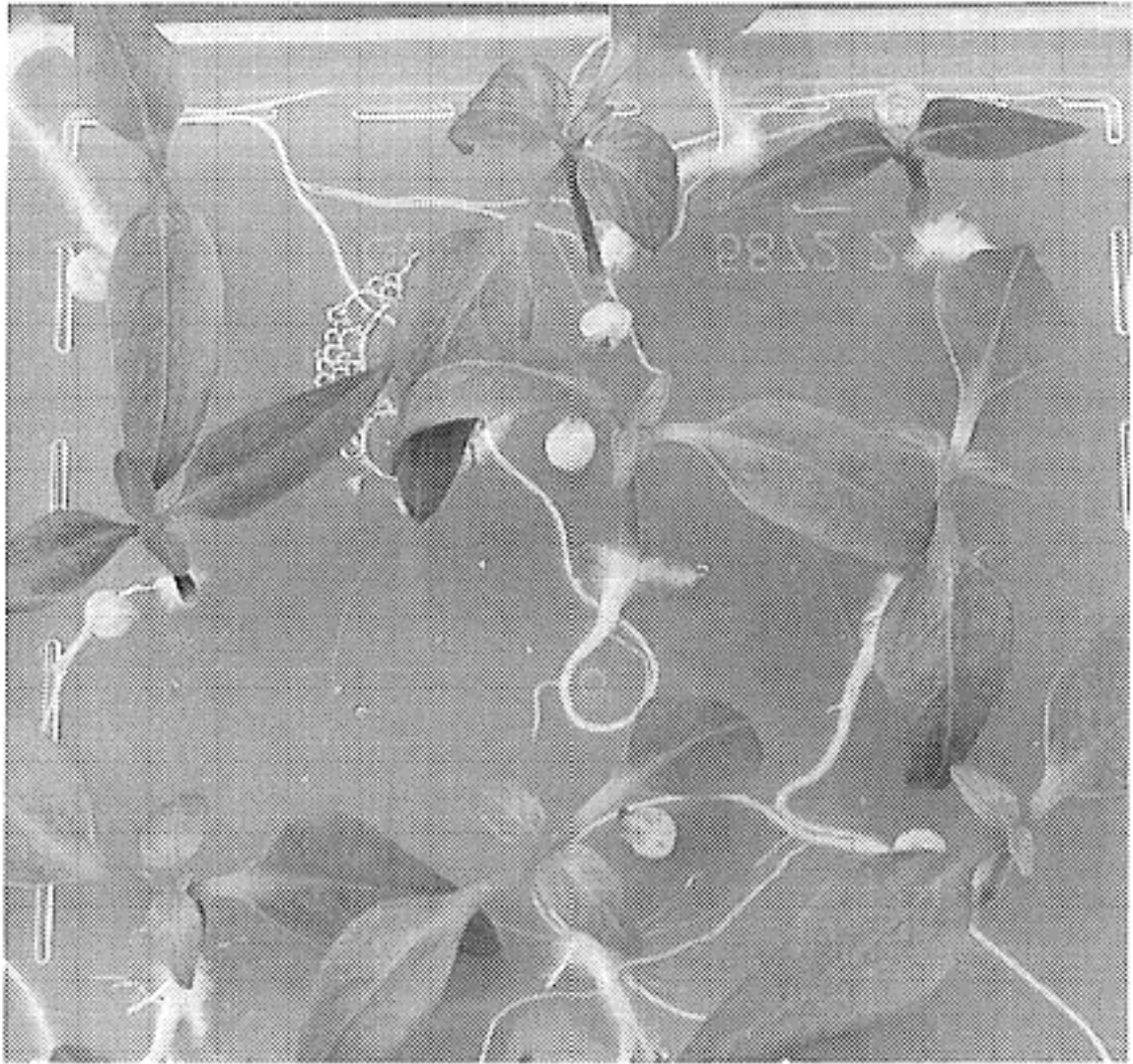


Figura 10

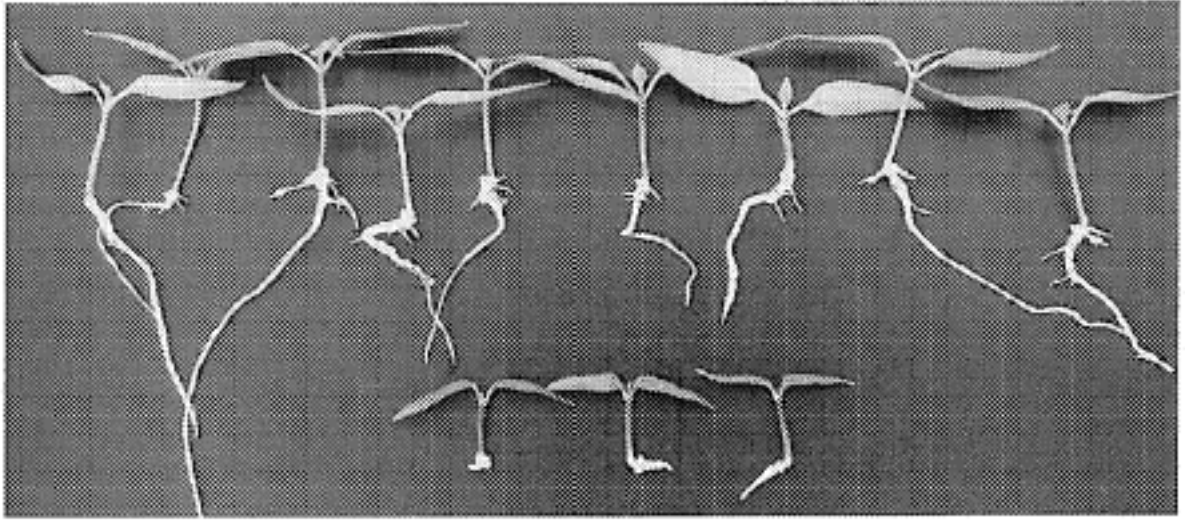


Figura 11

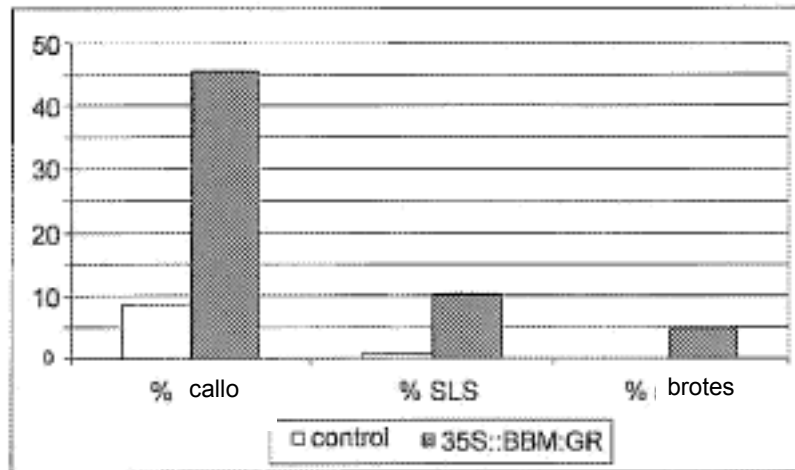


Figura 12

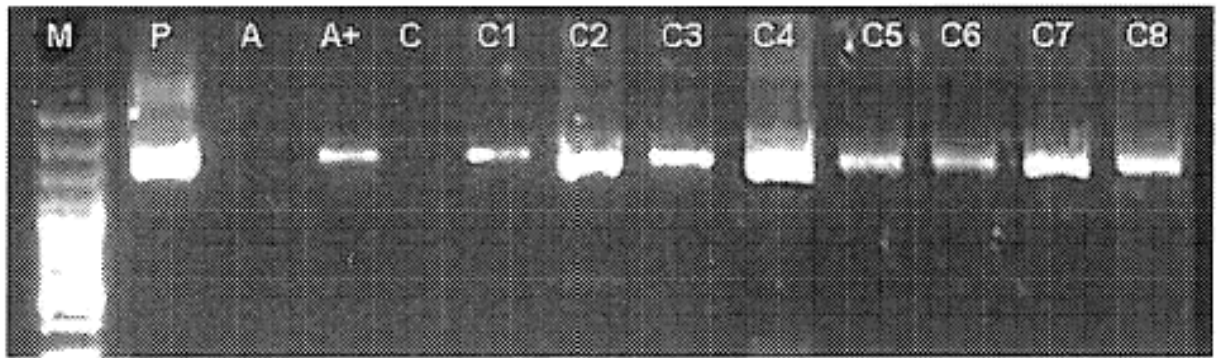


Figura 13

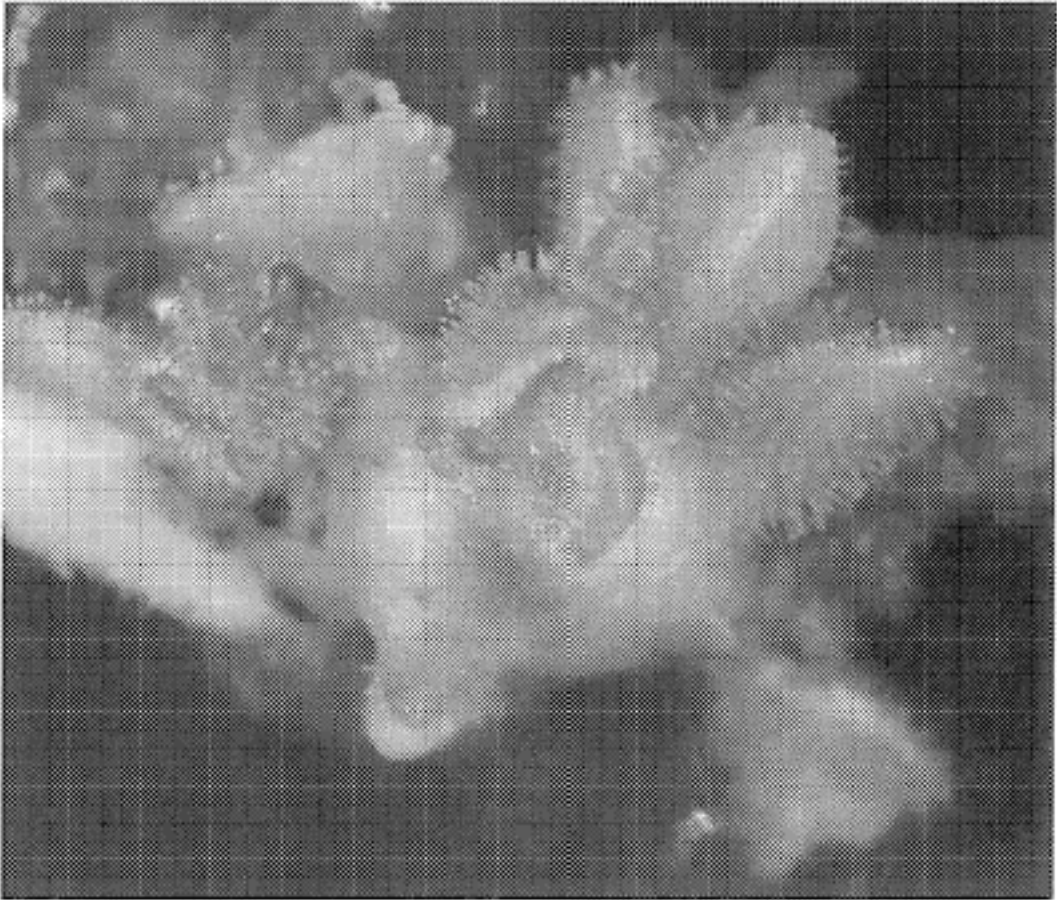


Figura 14

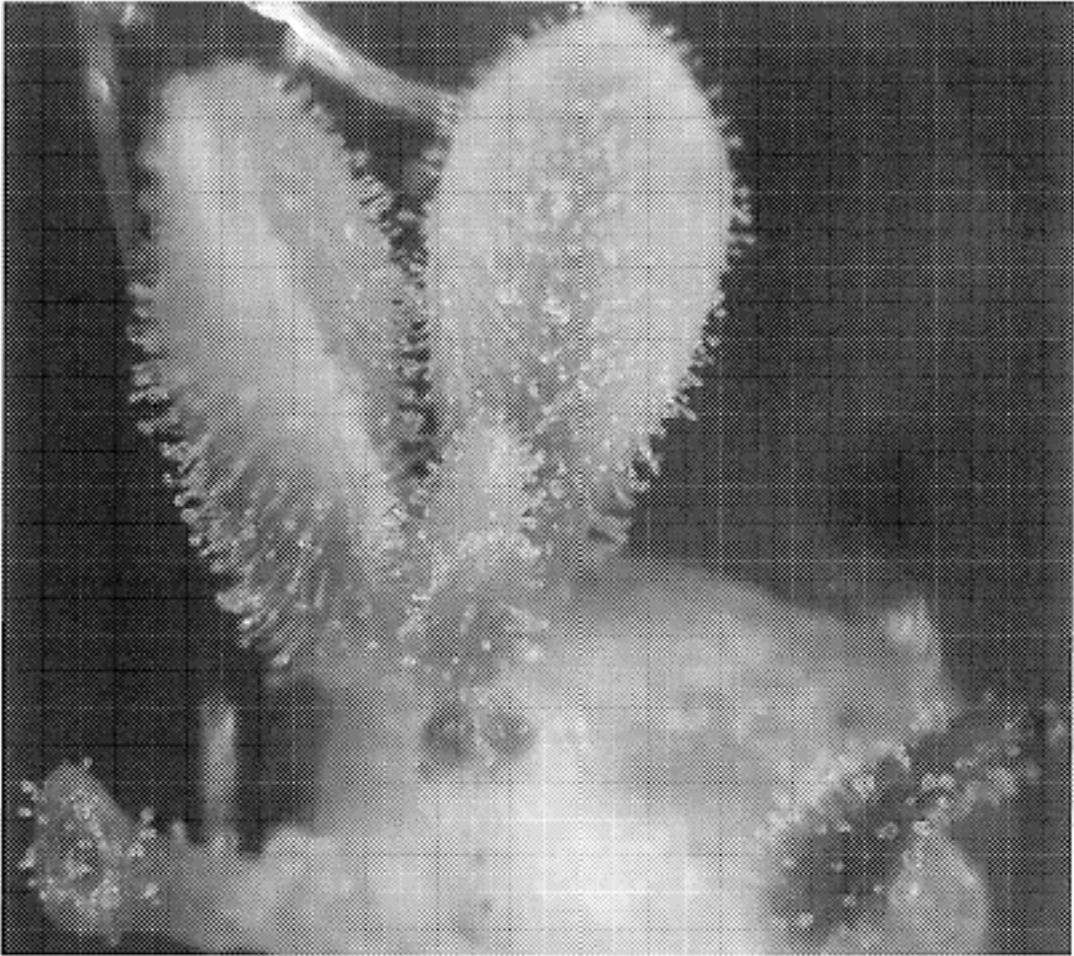


Figura 15

SEQ ID No:1

MNNNWLGFSLSPYEQNHHRKDVYSSTTTTVDVAGEYCYDPTAASDESSAIQTSFPSPFG  
VVVDAFTRDNNSHSRDWDINGCACNNIHNDEQDGPKLENFLGRTTTTIYNTNENVGDGSGS  
GCYGGGDGGGSLGLSMIKTWLRNQPVNDVNDQENGNAAKGLSLSMNSSTSCDNNNDSNN  
NVVAQGKTIDDSVEATPKKTIESFGQRTSIYRGVTRHRWTGRYEAHLWDNSCKREGQTRK  
GRQVYLGGYDKEEKAARAYDLAALKYWGTTTTTNFPMSEYEKEVEEMKHMTRQEYVASLR  
RKSSGFSRGASIYRGVTRHHQHGRWQARIGRVAGNKDLYLGTFGTQEEAAEAYDIAAIKF  
RGLTAVTNFDMNRYNVKAILESPLPIGSAAKRLKEANRPVPSMMMI SNNVSESENSASG  
WQNAAVQHHQGVDLSLLHQHQERYNGYYYNGGNLSSESARACFKQEDDQHHFLSNTQSLM  
TNIDHQSSVSDDSVTVCGNVVGYYGGYQGFAAPVNC DAYAASEFDYNARNHYYFAQQQQTQ  
QSPGGDFPAAMTNNVGSNMYHGEVAPFTTVWNDN

Figura 16

SEQ ID No:2

TCTACAAAGAAAAAATCAAAGGGATTCAAGCAAGCCACTGCAGGAGTCTCACAAAGACACT  
TCGGAAAATCCTAACAAAAACAATAGTTCCTGCTGCATTACCACAGCTCACCCCTACCTTG  
GTGTCACTGCTGGAGGTGATTGAACCCGAGGTGTTGTATGCAGGATATGATAGCTCTGTT  
CCAGATTCAGCGTGGAGAATTATGACCACACTCAACATGTTAGGTGGGCGTCAAGTGATT  
GCAGCAGTGAAATGGGCAAAGGCGATAACCAGGCTTCAGAACTTACACCTGGATGACCAA  
ATGACCCTGCTACAGTACTCATGGATGTTTCTCATGGCATTGCCCCTGGGTTGGAGATCA  
TACAGACAATCAAGTGGAAACCTGCTCTGCTTTGCTCCTGATCTGATTATTAATGAGCAG  
AGAATGTCTCTACCCTGCATGTATGACCAATGTAAACACATGCTGTTTGTCTCCTCTGAA  
TTACAAAGATTGCAGGTATCCTATGAAGAGTATCTCTGTATGAAAACCTTACTGCTTCTC  
TCCTCAGTTCCTAAGGAAGGTCTGAAGAGCCAAGAGTTATTTGATGAGATTCGAATGACT  
TATATCAAAGAGCTAGGAAAAGCCATCGICAAAAGGGAAGGGAACCTCCAGTCAGAACTGG  
CAACGGTTTTACCAACTGACAAAGCTTCIGGACTCCATGCATGAGGTGGTTGAGAATCTC  
CTTACCTACTGCTTCCAGACATTTTTGGATAAGACCATGAGTATTGAGTCCCAGAGATG  
TTAGCTGAAATCATCACTAATCAGATACCAAATATTCAAATGGAAATATCAAAAAGCTC  
CTGTTTCATCAAAAATGACTG

Figura 17



SEQ ID No:3

atgaataataactgggttaggcttttctctctctccttatgaacaaaatcaccatcgtaag  
gacgtctactcttccaccaccacaaccgctcgtagatgtcgccggagagtagtactgttacgat  
ccgaccgctgcctccgatgagttctcagccatccaaacatcgtttcccttctccctttggg  
gtcgtcgtcgtatgctttcaccagagacaacaatagtcactcccagagattgggacatcaat  
ggttgtgcatgcaataacatccacaacgatgagcaagatggaccaaagcttgagaatttc  
cttggccgcaccaccacgatttacaacaccaacgaaaacgcttgagatggaagtggaagt  
ggctgttatggaggaggagacgggtgggtggctcactaggactttcgatgataaagaca  
tggctgagaaatcaaccgctggataatggtgataatcaagaaaatggcaatgctgcaaaa  
ggcctgtccctctcaatgaactcatctacttcttgtgataacaacaacgacagcaataac  
aacgctgttgcccaaggaagactattgatgatagcgttgaagctacaccgaagaaaact  
attgagagttttggacagaggacgtctatataccgcggtgttacaaggcatcgggtggaca  
ggaagatatgaggcacatttatgggataatagttgtaaaagagaaggccaaacgcgcaaa  
ggaagacaagtttatttgggaggttatgacaaagaagaaaaagcagctagggttatgat  
ttagccgcactcaagtattggggaaccaccactactactaacttccccatgagcgaatat  
gaaaaagaggtagaagagatgaagcacatgacaaggcaagagtatggtgcctcactgccc  
aggaaaagtagtggtttctctcgtgggtgcatcgatttatcgtggagtaacaagacatcac  
caacatggaagatggcaagctaggataggaagagtcgccggtaacaaagacctctacttg  
ggaacttttggcacacaagaagaagctgcagaggcatacgcatttgcggccatcaaattc  
agaggattaaccgcagtgactaacttcgacatgaacagatacaacgcttaagcaatctc  
gaaagccctagtcttccctattggtagcgcgcaaaaacgctctcaaggaggctaaccgtccg  
gttccaagtatgatgatgatcagtaataacgtttcagagagtgagaatagtgctagcgg  
tggcaaaacgctgcggttcagcatcatcaggagtagatttgagcttattgcaccaacat  
caagagaggtacaatgggtattattacaatggaggaaacttgtcttcggagagtgctagg  
gcttgtttcaacaagaggatgatcaacaccatttcttgagcaacacgcagagcctcatg  
actaatatcgatcatcaaagttctgtttcggatgattcggttactgtttgtggaaatgtt  
gttggttatgggtggttatcaaggatttgcagccccgggtaactgagatgcctacgctgct  
agtgagtttgattataacgcaagaaaccattattactttgctcagcagcagcagaccag  
cagtcgccaggtggagattttccgcgccaatgacgaataatgttggctctaataatgat  
taccatggggaaggtgggtggagaagttgctccaacatttacagtttggaaacgacaattag

Figura 18

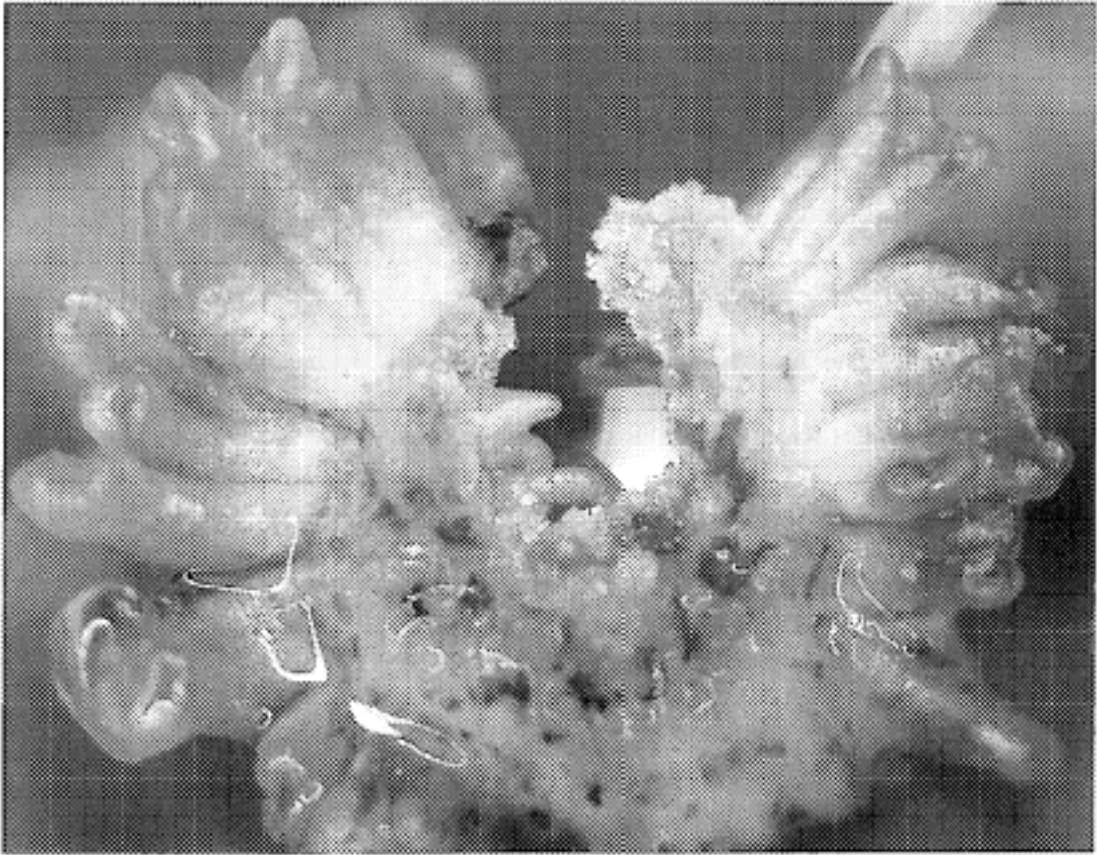


Figura 19