

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 654 583**

(51) Int. Cl.:
C12N 15/82
(2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.05.2011 PCT/EP2011/002279**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **16.02.2012 WO12019660**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.05.2011 E 11724948 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.12.2017 EP 2601295**

(54) Título: **Procedimiento de transfección de plantas**

(30) Prioridad:

**11.08.2010 EP 10008393
07.08.2010 EP 10008267**

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

14.02.2018

(73) Titular/es:

**NOMAD BIOSCIENCE GMBH (100.0%)
Türkenstr. 16
80333 München, DE**

(72) Inventor/es:

**GIRITCH, ANATOLI;
SYMONENKO, YURI;
HAHN, SIMONE;
TIEDE, DOREEN;
SHVARTS, ANTON, DR;
ROEMER, PATRICK y
GLEBA, YURI**

(74) Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 654 583 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

Procedimiento de transfección de plantas

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento para generar o alterar un rasgo en una planta cultivada en un campo. La invención también se refiere a un procedimiento de producción de una proteína de interés en una pluralidad de plantas en un campo. La invención también se refiere a un procedimiento para proteger las plantas de 10 un cultivo en un campo de una plaga.

Antecedentes de la invención

15 Los procedimientos actuales de modificación genética se basan en la modificación genética estable de especies de cultivo, que se demostró por primera vez en 1983 (Fraley et al 1983; Barton et al 1983) y se comercializa desde 1996. Aunque el procedimiento agrícola basado en la transformación genética estable de plantas es una realidad hoy día y es la base de nuevas prácticas muy satisfactorias, tiene múltiples limitaciones, siendo las principales la necesidad de mucho tiempo y los altos costes para el desarrollo de cultivos transgénicos. El consenso general entre 20 las compañías implicadas en la biotecnología vegetal es que los procedimientos de I+D necesitan, dependiendo de las especies de cultivo, entre 8 y 16 años, y el coste medio total se estima que está entre 100 y 150 millones de \$. Debido a estas limitaciones, después de más de 25 años desde el descubrimiento del procedimiento de transformación genética en plantas, solamente se han comercializado hasta ahora un rasgo manejable y en unas pocas especies de cultivo GM.

25 Se sabe que las células vegetales y las plantas completas también se pueden re-programar transitoriamente (es decir, sin una integración estable de nuevo material genético en el cromosoma de la planta), y los procedimientos transitorios, tales como infecciones víricas, son rápidos. Dichos procedimientos transitorios podrían permitir en principio una modificación muy rápida del metabolismo vegetal en favor de ciertos rasgos o productos que sean de interés para el usuario. Claramente, dichos procedimientos necesitan un vector ADN o ARN (un virus o una bacteria) 30 que se ha modificado para transfectar efectivamente y con seguridad la planta, siendo el efecto resultante la carencia de efectos secundarios no deseados. Los primeros intentos para utilizar vectores basados en virus de plantas han sido parcialmente satisfactorios y periten la transfección de plantas para la fabricación de proteínas recombinantes de alto valor tales como ciertos biofarmacéuticos (Gleba et al 2007, 2008; Lico et al 2008). El uso de virus para la manipulación de otros rasgos, tales como rasgos de entrada (por ejemplo, resistencia a herbicidas, 35 Shibolet et al 2001; Zhang y Ghabrial 2006) se habían descrito en la bibliografía, pero la transfección con virus introduce demasiados cambios no deseados en el huésped infectado por lo que este tipo de procedimiento transitorio no se dedicó más para introducir rasgos. Los procedimientos transitorios también se pueden construir alrededor de la capacidad de especies de *Agrobacterium* para transferir parte de su Ti plasmídico a eucariotas, en particular, la célula vegetal. El uso de la transfección basada en *Agrobacterium* es una base para modificaciones 40 genéticas tal como los protocolos de transformación genética y ensayos de transfección transitoria en el laboratorio. Las aplicaciones de la transfección basadas en *Agrobacterium* se han limitado también a la fabricación de proteínas recombinante, debido a que las condiciones de aplicación óptima tales como la infiltración al vacío de las plantas con las suspensiones bacterianas no se pueden utilizar a gran escala en el campo, mientras que la pulverización de las partes aéreas o el riego de las plantas con soluciones bacterianas da como resultado una proporciona 45 supuestamente muy pequeña de células vegetales transfectadas, y los estudios previos simplemente no afrontaban esta cuestión específica. La combinación de un suministro de *Agrobacterium* y el uso de un virus como mensajero secundario es un procedimiento que ha sido satisfactorio en la fabricación de proteínas recombinantes de alto valor incluyendo complejos biofarmacéuticos tales como anticuerpos IgG completos. Sin embargo, cuando se trata de 50 rasgos tales como rasgos de introducción o rasgos que necesitan una re-programación dirigida sutil del metabolismo de la célula vegetal, este procedimiento de magnifección tiene las mismas limitaciones que tienen los vectores víricos.

55 Hay un considerable conocimiento en el área del uso de microorganismos para controlar ciertos procedimientos que necesitan la interacción de microbios con las plantas, incluyendo el uso de microorganismos como *Lactobacillus* y levaduras de *Saccharomyces* para la fermentación de biomasa (preparación de alimentos, bebidas fermentados), para el biocontrol (cepas de *Agrobacterium*, *Myrothecium*), y el uso de cepas de *Rhizobium* para la fijación mejorada de nitrógeno. En los artículos y patentes de investigación en los que se han explorado los microorganismos como agentes de biocontrol, hay un cuerpo de conocimiento considerable de cómo se deberían aplicar células vivas en las superficies vegetales; en particular, se han llevado estudios que han identificado las condiciones de pulverización y adyuvantes (humectantes, adherentes, etc.) que se van a utilizar en las mezclas de pulverización. Los ejemplos de 60 dichas investigaciones son numerosas. Los siguientes artículos ejemplifican el estado de la técnica en esta área: Arguelles-Arias et al 2009; Nam et al 2009; revisado por Johnson 2009.

65 Existen cepas registradas de *Agrobacterium rhizogenes/radiobacter* que se han utilizado durante décadas para el control de la enfermedad de agallas de la corona en viñedos y huertos de árboles frutales. Existen dos cepas que se utilizan comercialmente, una es una cepa natural que alberga un plásmido (K84), y la otra, es una derivada

modificada genéticamente que se ha modificado mediante la eliminación del gen necesario para la transferencia del plásmido conjugado (K1026). (Kerr y Tate 1984; Vicedo et al 1993; Reader et al 2005; Kim et al 2006; revisado en Moore 1988).

5 El *Agrobacterium tumefaciens* y *A. rhizogenes* se han utilizado ampliamente en los laboratorios de investigación en todo el mundo para la transfección transitoria y la transformación genética estable de plantas. Estas aplicaciones se basan en la capacidad del *Agrobacterium* para transferir información genética a las células eucariotas. Muchas de las plantas modificadas genéticamente que se cultivan hoy día, tales como soja, canola y algodón, se han generado mediante la transformación genética mediada por *Agrobacterium*. La diferencia esencial entre la transformación transitoria y estable es que en el procedimiento de la transformación estable, el ADN suministrado por *Agrobacterium* se integra eventualmente en un cromosoma de la planta, y por lo tanto se hereda por la progenie de la planta. Dichos eventos de integración son raros incluso en los experimentos de laboratorio diseñados específicamente para producir contactos masivos entre las células vegetales y las bacterias; por lo tanto, se tienen que utilizar métodos de exploración selectiva específicos para la selección de transformantes estables. En consecuencia, el conocimiento acumulado en este dominio científico tiene un valor limitado para los interesados en los procedimientos transitorios que tienen que diseñarse de manera que tenga un carácter masivo y afecte a múltiples células del cuerpo de la planta.

La transfección transitoria, por otra parte, tiene en cuenta solo las primeras etapas del suministro de ADN dirigido por *Agrobacterium* en un núcleo de una célula vegetal, junto con el hecho de que dichas moléculas de ADN suministradas, si se diseñan apropiadamente para constituir una unidad de transcripción que alberga un promotor y terminador específicos de plantas y una parte codificante, se transcribirá en el núcleo incluso en ausencia de integración de dicho ADN en un cromosoma de la planta, resultando dicha expresión en una re-programación transitoria de una célula vegetal. Dicha re-programación se había conseguido primero anteriormente y se había desarrollado en una herramienta de laboratorio convencional para la evaluación rápida de diferentes experimentos genéticos. Mientras que hay un considerable cuerpo de conocimiento sobre la transferencia de ADN mediada por *Agrobacterium* en células vegetales, con la excepción de pocos casos, que la información se limita a experimentos a escala de laboratorio, y hasta ahora, había muy pocos intentos para desarrollar aplicaciones a escala industrial que implica *Agrobacterium* como vector de ADN. Una de las limitaciones de las aplicaciones de laboratorio es el hecho de que el suministro de ADN basado en *Agrobacterium* necesita ciertos tratamientos que son difíciles o imposibles de aplicar en campo abierto o a gran escala. En experimentos transitorios típicos, las células vegetales cultivadas o las partes de las plantas se tratan con un exceso de bacterias para proporcionar el máximo suministro. En los experimentos de investigación típicos, también se interesan en los niveles de expresión que no son viables económicamente si se hacen a escala industrial. En general, la investigación hecha en este dominio ha llevado a los inventores a la conclusión de que los parámetros que afectan seriamente la expresión transitoria son los que permiten el mejor acceso a la interacción de las agrobacterias a las células vegetales en un cuerpo de una planta. La mayoría de dichos estudios utiliza la infiltración al vacío, la inyección en las hojas de la planta o el tratamiento con tensioactivos, la herida de las superficies de las plantas, por ejemplo, con cuchillas de afeitar, o una combinación de los mismos. De hecho, el único grupo que está en desarrollo de un procedimiento de transfección basado en *Agrobacterium* para la producción de comercial de proteínas recombinantes que no implican una amplificación adicional (basada en virus) del ADN original, es el grupo de Medicago (D'Aoust et al 2008, 2009; Vezina et al, 2009) que se basa completamente en la infiltración al vacío como método de suministro. Sin embargo, debido a que se basa en una relación de gran exceso de bacterias respecto a células vegetales, los protocolos de laboratorio actuales se utilizaron para la transfección transitoria de plantas no tienen un valor tradicional serio, es decir, no se pueden replicar directamente a nivel industrial. Excepto en unos pocos casos (Vaquero et al, 1999, D'Aoust et al, 2008, 2009) tampoco se enfrentan cuantitativamente al problema de la eficacia del procedimiento de transfección transitoria. (Ejemplos de dicha investigación son múltiples, los inventores proporcionan una relación de solo unas pocas representativas: Li et al, 1992; Liu et al, 1992; Clough y Bent, 1998; De Buck et al, 1998, 2000; Chung et al, 2000; Yang et al, 2000; Zambre et al, 2003; Wroblewski et al, 2005; Lee y Yang, 2006; Zhao et al, 2006; Shang et al, 2007; Jones et al., 2009; Li et al, 2009; De Felippe y Weigel, 2010). Excepto en dos casos descritos posteriormente, no había intentos en la bibliografía para cuantificar la eficacia del procedimiento transitorio o para proporcionar el suficiente entendimiento que daría lugar a la explotación potencial del fenómeno comercialmente a gran escala.

Uno de los procedimientos que está en desarrollo ahora es la magnifección, un procedimiento que se basa en la infiltración al vacío de agrobacterias en las hojas de las plantas. El procedimiento de magnifección (marca registrada de Genetics GmbH as magnICON® y cubierto por varias patentes/solicitudes de patente) es un protocolo simple y escalable de manera indefinida para la expresión proteica heteróloga en plantas, que es carente de transformación genética estable de una planta, sino que se basa a su vez en la amplificación transitoria de vectores víricos suministrada en múltiples áreas del cuerpo de la planta (suministro sistémico) por *Agrobacterium* como precursor de ADN. Dicho procedimiento es en esencia una infiltración de plantas maduras completas con una suspensión diluida de agrobacterias que portan T-ADN que codifican replicones ARN víricos. En este procedimiento la bacteria asume las funciones (anteriormente víricas) de infección primaria y movimiento sistémico, mientras que el vector vírico proporciona la diseminación célula a célula (de corta distancia) amplificación y expresión proteica de alto nivel. La demostración inicial de la infección vírica se puede iniciar por suministro por agrobacterias de una copia de genoma vírico en una célula vegetal viene del trabajo pionero de Grimsley et al, 1986, en el que se suministró un virus ADN, y una primera infección por tmv, aunque muy ineficaz, un virus ARN citoplasmático suministrado como una copia de

ADN, vino del trabajo de Turpen et al 1993. Sin embargo, la tecnología actual es extremadamente eficaz y unas pocas plantas adultas de taba c o son suficientes para la optimización temprana de la construcción y la rápida producción de cantidades en miligramos a gramos de proteína recombinantes para la evaluación pre-clínica o clínica, o para la fabricación en el caso de vacunas individualizadas. La versión a gran escala (industrial) es 5 esencialmente la misma, pero se construye implicando vectores víricos completamente ensamblados (mejor que con pro-vectores que necesitan el ensamblaje *in planta*) y necesita aparatos para el suministro de *Agrobacterium* de alto rendimiento a las plantas completas por infiltración al vacío. El procedimiento se puede subir de escala pero es necesaria la inmersión de las partes aéreas de las plantas en la suspensión bacteriana al vacío (el procedimiento 10 implica invertir las plantas cultivadas en tiestos o en bandejas), un procedimiento que impone limitaciones a los volúmenes de biomasa que se pueden tratar de esta manera, o el rendimiento del procedimiento, de las maneras 15 que se pueden cultivar las plantas antes del tratamiento, y también acarrea ciertos costes que limitan el uso del procedimiento por los productos de alto coste, tal como solamente para biofarmacéuticos recombinantes. El procedimiento de magnificación es eficaz ya que permite la transfección de casi todas las células de las hojas en las plantas tratadas, o aproximadamente el 50 % de la biomasa aérea total de las plantas (siendo el resto los tallos y 20 peciolos). El procedimiento se ha optimizado de muchas maneras, en particular mediante la mejora de la liberación de replicones víricos mediante la optimización de la modificación post-traduccional de las transcripciones de ADN primarias (Marillonnet et al, 2005). Sin embargo, el procedimiento actual se ha construido completamente sobre 25 métodos de suministro bacteriano tales como la inyección en las hojas de la planta o la infiltración al vacío (por ejemplo, Simmons et al, 2009), hiriendo las hojas (Andrews y Curtis, 2005), o vertiendo las agrobacterias en el suelo (“agroinundación”, Ryu et al, 2004; Yang et al, 2008), mientras que dichos métodos no se pueden aplicar para el tratamiento en masa de las plantas en un campo (revisado en Gleba et al, 2004, 2007, 2008; Lico et al, 2008; los artículos originales incluyen Giritch et al. 2006; Marillonnet et al., 2004, 2005; Santi et al, 2006; y artículos ideológicamente similares de otros grupos de investigación - Voinnet et al, 2003; Sudarshana et al, 2006; Gao et al, 2006; Mett et al, 2007; Lindbo, 2007a,b; Plesha et al, 2007, 2009; Huang et al, 2006; Regnard et al 2009; Green et al, 2009; Shoji et al, 2009).

Se debería mencionar que aunque *Agrobacterium tumefaciens* y *A. rhizogenes* son vectores de ADN que se utilizan en la mayoría de los casos, hay otras especies de bacterias que pueden llevar a cabo una transferencia similar de ADN a las células vegetales (Broothaerts et al, 2005).

30 Los intentos para cuantificar el tratamiento con *Agrobacterium* en las plantas completas tras la infiltración al vacío se han llevado a cabo solo por pocos grupos de investigación. En los artículos de Joh et al, 2005, 2006, se ha concluido que las bacterias que se utilizan a la mayor densidad de 10^9 ufc/ml era la mejor (al contrario que 10^8 ufc/ml o 10^7 ufc/ml), según se mide por la expresión total de proteína recombinante. En los experimentos de Lindbo, 2007a, b, se 35 han obtenido resultados esencialmente similares que en el trabajo de los inventores, sin embargo, no han llevado a cabo el recuento de células transfectadas y las conclusiones se derivaron de los niveles de expresión proteica recombinante.

40 Los intentos para utilizar el tratamiento con *Agrobacterium* de plantas completas sin infiltración al vacío resultaron en un número muy bajo de células inicialmente transfectadas, limitando mucho de esta manera la aplicación práctica del procedimiento. Una forma de evitar esta limitación inicial que se desvela en la bibliografía es el uso de un mensajero secundario eficaz tal como un virus de plantas que permitiría la amplificación del procedimiento inicialmente ineficaz complementándolo con un movimiento sistémico y de célula a células basado en virus (Azhakanandam et al, 2007). El suministro de copias de ADN basado en *Agrobacterium* de virus de plantas o 45 vectores víricos de plantas se había descrito hace mucho tiempo (Grimsley et al, 1986, y para TMV - Turpen et al, 1993), y permite diseminar el replicón inicial suministrado a pocas células de la planta hacia el resto del cuerpo utilizando un procedimiento de infección vírica tal como el movimiento célula a células y el movimiento sistémico del virus. Dicho procedimiento tiene una utilidad práctica limitada para los fines de los inventores, debido a que la 50 infección vírica cambia drásticamente la actuación de la planta; todas las aplicaciones contempladas actualmente están en el área de fabricación de proteínas recombinantes en plantas (revisado por Gleba et al, 2007, 2008). Se debería señalar que el artículo citado de Azhakanandam et al, 2007 ni siquiera intenta cuantificar la eficacia de la transfección inicial y se basa en una cantidad muy alta de agrobacterias en el medio de transfección.

55 El documento WO 2006/003018 menciona que las Agrobacterias se podrían suministrar en el tejido vegetal utilizando un dispositivo de pulverización a alta presión para desplegar una mezcla de agrobacterias junto con un abrasivo en las plantas. Chen et al., Biotechnology for Biofuels, 2010, 3:9 describe un sistema de expresión genética transitoria de alto rendimiento para plántulas de mijo perenne, en los que, *inter alia*, se utiliza un tratamiento con “agitado con formación de vórtice - carburo de silicio – sonicación” de las plántulas.

60 Partiendo de la técnica anterior, es un objetivo de la presente invención proporcionar un procedimiento eficaz de transfección transitoria de plantas de manera que sea aplicable a muchas plantas que se cultivan en un campo de cultivo. También es un objetivo de la invención proporcionar un procedimiento de alteración de un rasgo en las plantas cultivadas en un campo de cultivo. Notablemente, es un objetivo de la invención proporcionar un procedimiento eficaz que permita una transfección de plantas utilizando *Agrobacterium* a gran escala sin necesidad 65 de la aplicación de diferencias de presión para introducir *Agrobacterium* en el espacio intercelular de las plantas.

Sumario de la invención

En consecuencia, la presente invención proporciona lo siguiente:

5 (1) Un procedimiento de generación o alteración de un rasgo de una planta, que comprende
 (i) cultivar dicha planta hasta un estado de crecimiento deseado;
 (ii) expresar en dicha planta, una proteína o un ARN capaz de generar o alterar dicho rasgo, que comprende
 10 la pulverización de las partes aéreas de dicha planta con una suspensión acuosa que contiene células de una cepa de *Agrobacterium* y al menos un abrasivo suspendido en dicha suspensión.
 comprendiendo dicha cepa de *Agrobacterium* una molécula de ADN que comprende una construcción de ácido nucleico que contiene una secuencia de ADN de interés, codificando dicha secuencia de ADN de interés dicha proteína o dicho ARN, como se define adicionalmente en la reivindicación 1.

15 (2) Un procedimiento de producción de una proteína de interés en una planta, que comprende
 (i) cultivar dicha planta hasta un estado de crecimiento deseado;
 (ii) expresar, en dicha planta, dicha proteína de interés, que comprende la pulverización de las partes aéreas de dicha planta con una suspensión acuosa que contiene células de una cepa de *Agrobacterium* y al menos
 20 un abrasivo suspendido en dicha suspensión,
 comprendiendo dicha cepa de *Agrobacterium* una molécula de ADN que comprende una construcción de ácido nucleico una secuencia de ADN de interés, codificando dicha secuencia de ADN de interés dicha proteína de interés, como se define adicionalmente en la reivindicación 2.

25 (3) Un procedimiento de protección de cultivos vegetales en un campo de una plaga, que comprende
 (i) cultivar dichas plantas en el suelo de dicho campo;
 (ii) determinar, en un estado de crecimiento de las plantas deseado, la infestación de al menos una de dichas plantas por una plaga;
 30 (iii) expresar, en dichas plantas, una proteína o ARN que es perjudicial para la plaga determinada en la etapa previa, que comprende la pulverización de las partes aéreas de dichas plantas con una suspensión acuosa que contiene células de una cepa de *Agrobacterium* y al menos un abrasivo suspendido en dicha suspensión,
 comprendiendo dicha cepa de *Agrobacterium* una molécula de ADN que comprende una construcción que contiene una secuencia de ADN de interés unida operativamente a un promotor, codificando dicha secuencia de ADN de interés dicha proteína o dicho ARN, como se define adicionalmente en la reivindicación 3.

35 (4) El procedimiento de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (3), donde dicha suspensión acuosa contiene dichas células de dicha cepa de *Agrobacterium* en una concentración de como mucho $2,2 \times 10^7$, preferentemente como mucho $1,1 \times 10^7$, más preferentemente como mucho $4,4 \times 10^6$, más preferentemente de como mucho $1,1 \times 10^6$ ufc/ml de dicha suspensión.
 (5) El procedimiento de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (4), donde dicho abrasivo es un vehículo inorgánico particulado para polvos humectables, tales como sílice o carburo de silicio.
 (6) El procedimiento de acuerdo con (5), donde dicha suspensión acuosa contiene dicho abrasivo en una cantidad de entre 0,02 y 2, preferentemente entre 0,05 y 1 y más preferentemente entre 0,1 y 0,5 % por peso de dicha suspensión.
 40 (7) El procedimiento de acuerdo con (5) o (6), donde el tamaño medio de partícula del abrasivo añadido a la suspensión está entre 0,1 y 30, preferentemente entre 0,1 y 10, más preferentemente entre 0,5 y 10, y más preferentemente entre 0,5 y 5 μm .
 (8) El procedimiento de acuerdo con uno cualquiera de (5) a (7), donde el abrasivo tiene un valor D90 de como mucho 40 μm , preferentemente como mucho 30 μm ; y donde el abrasivo no contiene partículas que tengan un tamaño por encima de 45 μm , preferentemente no mayor de 40 μm .

45 (9) El procedimiento de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (8), donde el adyuvante de la pulverización es un tensioactivo de silicio orgánico.
 (10) El procedimiento de acuerdo con (9), donde el tensioactivo de silicio orgánico es un heptametiltrisiloxano modificado con un polialquilenóxido.
 (11) El procedimiento de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (10), donde dicha construcción de ácido nucleico está flanqueado por una secuencia limítrofe de T-ADN al menos en un lado, que permite la transferencia de dicha construcción de ácido nucleico en las células de dicha planta.

50 (12) El procedimiento de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (11), donde dicha construcción de ácido nucleico codifica un vector de replicación vírica que codifica dicha proteína de interés, siendo incapaz dicho vector de replicación vírica del movimiento sistémico en dicha planta.
 (13) El procedimiento de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (11), donde dicha secuencia de ADN de interés está unido operativamente unido a un promotor activo en las células vegetales.
 (14) El procedimiento de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (13), donde dicha planta es una planta

55 dicotiledónea.

(15) El procedimiento de acuerdo con (14), donde dicha planta es el tabaco u otras especies del género *Nicotiana*, remolacha azucarera u otras especies del género *Beta*, tomate, patata, pimienta, soja, alfalfa, guisante, judías, canola u otras especies del género *Brassica*, algodón.

5 (16) El procedimiento de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (13), donde dicha planta es una planta monocotiledónea.

(17) El procedimiento de acuerdo con (16), donde dicha planta es el arroz, maíz, trigo, cebada, avena, mijo, sorgo.

(18) El procedimiento de acuerdo con (2), donde dicha proteína es una celulasa que se utiliza en la sacarización de celulosa o polímeros de hemi-celulosa.

10 También describe del uso de un material inorgánico particulado para la transfección transitoria en plantas. En dicho uso, las plantas pueden pulverizar con una suspensión acuosa que contiene células de *Agrobacterium* y el material inorgánico particulado.

15 Se describe adicionalmente un procedimiento de transfección de una planta, que comprende la pulverización de las partes aéreas de dicha planta con una suspensión acuosa que contiene al menos un abrasivo en dicha suspensión, seguido por la pulverización de dichas partes aéreas de dicha planta con una suspensión acuosa que contiene células de una cepa de *Agrobacterium* que comprende una molécula de ADN que comprende una construcción de ácido nucleico que contiene una secuencia de ADN de interés. Dicha secuencia de ADN de interés puede codificar una proteína o ARN que se va a expresar en dicha planta.

20 Además, se describe un procedimiento de transfección de una planta con una construcción de ácido nucleico o una secuencia de ADN de interés, que comprende la pulverización de dicha planta tal como las partes aéreas de dicha planta con una suspensión acuosa que contiene células de una cepa de *Agrobacterium*, comprendiendo dicha cepa de *Agrobacterium* una molécula de ADN que comprende una construcción de ácido nucleico que contiene una secuencia de ADN de interés; donde dicha suspensión acuosa contiene dichas células de dicha cepa de *Agrobacterium* en una concentración de como mucho $2,2 \times 10^7$, preferentemente como mucho $1,1 \times 10^7$, más preferentemente como mucho $4,4 \times 10^6$, más preferentemente como mucho $1,1 \times 10^6$ ufc/ml de dicha suspensión; y donde dicha suspensión comprende adicionalmente un adyuvante de pulverización agrícola, preferentemente un tensioactivo no iónico o un agente humectante.

25 Los inventores de la presente invención han encontrado una manera para aumentar fuertemente la probabilidad de conseguir la transfección de una planta por *Agrobacterium*. Los inventores han descubierto que la adición de un material particulado insoluble en las suspensiones acuosas de *Agrobacterium* aumenta fuertemente la eficacia de transfección que se consigue por pulverización de las partes aéreas de la planta con la suspensión. La alta eficacia conseguida permite por primera vez la transfección de plantas con suspensiones de *Agrobacterium* a gran escala tal como en los campos agrícolas, de esta manera se pueden evitar los métodos de infiltración engorrosos que utilizan diferencias de presión. La invención también permite la transfección de plantas que hasta ahora no eran adecuadas para la transformación por pulverización con suspensiones de *Agrobacterium*.

40 Descripción de las figuras

45 La Fig. 1 muestra esquemáticamente vectores utilizados en los ejemplos. RB y LB se mantiene para los bordes derecho e izquierdo del T-ADN. P35S: promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, O: amplificador traduccionnal omega; Tnos: terminador de la nopalina sintasa; Tocs: terminador ocs.

La Fig. 2A y B representan vectores víricos basados en TMV con capacidad de movimiento célula a célula. Pact2: promotor del gen de actina2 de *Arabidopsis*; o: extremo 5' de TVCV (virus de aclaramiento de la vena del tulipán); RdRp: fase de lectura abierta (ORF) de la ARN polimerasa dependiente de ARN del cr-TMV (tobamovirus que infecta crucíferas); MP: ORF de la proteína de movimiento de cr-TMV; N: región 3' no traducida de cr-TMV; Tnos o nos: terminador de la nopalina sintasa; SP: péptido de señal; los segmentos blancos que interrumpen los segmentos grises en las ORF de RdRp y MMP indican los intrones insertados en estas ORF para aumentar la probabilidad de la formación de replicones ARN en el citoplasma de las células vegetales, que se describe en detalle en el documento WO2005049839.

50 La Fig. 3 representa vectores basados en TMV que carecen de capacidad de movimiento célula a célula. Una mutación puntual en la ORF de MP da lugar a un cambio de fase (fs) que evita la traducción correcta de MP.

La Fig. 4A y B representa los vectores basados en PVX (virus X de la patata) con capacidad de movimiento célula a célula. PVX-pol: ARN polimerasa de pendiendo de ARN de PVX; CP: ORF de proteína de revestimiento; 25 K, 12 K y 8 juntos indica los módulos de bloqueo genético triple de 25 kDa, 12 kDa y 8 kDa del PVX; N: región no traducida 3' de PVX.

55 La Fig. 5A y B representa vectores basados en PVX con eliminación de la secuencia codificante de la proteína de revestimiento incapacitada para ambos movimientos sistémico y de célula a célula.

La Fig. 6 son fotografías que muestran la fluorescencia de GFP 4 dpi (días post inoculación) bajo la luz uv debido a la expresión de GFP tras sumergir las hojas de plantas de *Nicotiana benthamiana* durante 1 minuto en cultivos agrobacterianos diluidos que contienen un 0,1 % por peso del tensioactivo Silwet L-77 como se describe en el Ejemplo 2. Los números 10^{-2} y 10^{-3} muestran el factor de dilución de los cultivos agrobacterianos de una noche de DO = 1,5 a 600 nm y por lo tanto indican una dilución de 100 veces y 1000 veces, respectivamente. Se

indican los vectores que se utilizan y se pueden asociar con el vector apropiado que se muestra en las Fig. 1 a 5. Vector transcripcional 35S-GFP+P19 que expresa GFP bajo el control del promotor 35S y se co-expresa con el supresor de silenciamiento P19 (pNMD293); los vectores víricos TMV (fsMP)-GFP y PVX (Δ CP)-GFP que carecen de capacidad de movimiento célula a célula (pNMD570 y pNMD620, respectivamente). El porcentaje de células que expresan GFP (indicado) se contó después del aislamiento de protoplastos de la mitad izquierda del limbo de la hoja.

5 La Fig. 7 muestra fotografías de protoplastos aislados para el recuento de células que expresan GFP. Los protoplastos que expresan GFP aislados después de sumergir hojas de *Nicotiana benthamiana* en una suspensión agrobacteriana (DO600 = 1,5, factor de dilución 10^{-3}). El vector vírico basado en TMV (fsMP)-GFP-TMV que carece de capacidad de movimiento células a células (pNMD570), 0,1 % de Silwet, inmersión de 1 min, se aislaron los protoplastos a los 4 dpi.

10 Fig. 8. Influencia de la concentración de Silwet L-77 y densidad de cultivo agrobacteriano sobre la eficacia de transfección después de sumergir hojas de *Nicotiana benthamiana* en suspensión agrobacteriana (DO600 = 1,5, factores de dilución 10^{-2} y 10^{-3}). El vector transcripcional 35S-GFP+P19 que expresa GFP bajo el control del promotor 35S y que se co-expresa con el supresor de silenciamiento P19 (pNMD293). Concentración de Silwet 0,1 % y 0,05 %, 10 s de inmersión, 8 dpi.

15 Fig. 9. Influencia de la concentración de Silwet L-77 y densidad de cultivo agrobacteriano sobre la eficacia de transfección después de sumergir hojas de *Nicotiana benthamiana* en suspensión agrobacteriana (DO600 = 1,5, factores de dilución 10^{-2} y 10^{-3}). El vector vírico TMV (fsMP)-GFP – basado en TMV que carece de la capacidad de movimiento célula a célula (pNMD570). Concentración de Silwet 0,1 % y 0,05 %, 10 s de inmersión, 8 dpi. Se hizo un recuento de las células que expresan GFP después del aislamiento de protoplastos de la mitad izquierda del limbo de la hoja.

20 Fig. 10. Influencia de la concentración de Silwet L-77 y densidad de cultivo agrobacteriano sobre la eficacia de transfección después de sumergir hojas de *Nicotiana benthamiana* en suspensión agrobacteriana (DO600 = 1,5, factores de dilución 10^{-2} y 10^{-3}). El vector vírico PVX (Δ CP)-GFP – basado en PVX que carece de la capacidad de movimiento célula a célula (pNMD620). Concentración de Silwet 0,1 % y 0,05 %, 10 s de inmersión, 8 dpi. Se hizo un recuento de las células que expresan GFP después del aislamiento de protoplastos de la mitad izquierda del limbo de la hoja.

25 Fig. 11. Comparación de las tasas de transfección que se consiguen por inmersión y pulverización de *Nicotiana benthamiana* en/con suspensiones agrobacterianas. Se indican los factores de dilución y las tasas de transfección. La concentración de Silwet-77 era del 0,1 % por peso. El cultivo agrobacteriano (pNMD570, vector vírico basado en TMV que carece de la capacidad de movimiento célula a célula) se cultivó a DO600 = 1,5 y se diluyó 100 veces (10^{-2}) en tampón para infiltración suplementado con 0,1 % de Silwet-77. Duración de inmersión 10 s. Las fotos se tomaron a los 8 dpi. Se calculó el porcentaje de células que expresaban GFP después del aislamiento de los protoplastos de la mitad izquierda del limbo de la hoja.

30 La Fig. 12 muestra fotografías de la expresión de GFP después del suministro de agrobacterias diluidas a *Nicotiana benthamiana* pulverizando con tensioactivo. Vector vírico basado en TMV con capacidad de movimiento célula a célula (TMV-GFP, pNMD560); suspensiones agrobacteriana de DO600 = 1,5 se diluyeron por factores de dilución 10^{-2} y 10^{-3} como se indica; 0,1 % de Silwet L-77, se tomaron las fotografías a los 8 dpi.

35 La Fig. 13A muestra los resultados de los experimentos de transfección infiltrando (utilizando una jeringa sin aguja) diferentes plantas con diluciones de 100 veces (factor de dilución 10^{-2}) de DO600 = 1,5 de cultivos agrobacterianas. Las suspensiones utilizadas para la pulverización contenían un 0,1 % por peso de Silwet L-77 como se describe en el Ejemplo 3. Para cada caso, la misma hoja se muestra bajo luz normal y bajo luz uv que muestra la expresión de GFP. Los círculos discontinuos indican el área de hoja tratado. Los números cercanos al área de hoja tratado indican la cepa/vector que se utiliza de la siguiente manera:

40 A) Infiltración por jeringa. Vectores: 1 – TMV (fsMP)-GFP (pNMD570); 2 – TMV (MP)-GFP pNMD560); 3- PVX (Δ CP)-GFP (pNMD620); 4 – PVX (CP)-GFP (pNMD630); 5 – 35S-GFP + P19 (pNMD293). Los cultivos agrobacterianos se cultivaron hasta una DO600 = 1,5 y se diluyeron 100 veces; se tomaron las fotografías a los 8 dpi.

45 B) De manera similar a A, sin embargo la transfección se llevó a cabo por infiltración al vacío. Vector: PVX (CP)-GFP (pNMD630). Los cultivos agrobacterianos se cultivaron hasta una DO600 = 1,5 y se diluyó 100 veces; se tomaron las fotografías a los 43 dpi.

50 Fig. 14. Exploración del vector de expresión óptimo utilizando infiltración por jeringa con miembros de las familias Asteraceae, Chenopodiaceae, Cucurbitaceae y Malvaceae. Los números indican las cepas/vectores utilizados de la siguiente manera: 1-TMV (fsMP)-GFP (pNMD570); 2-TMV (MP)-GFP (pNMD560); 3-PVX (Δ CP)-GFP pNMD620); 4-PVX (CP)-GFP (pNMD630); 5-35S-GFP + P19 (pNMD293). Factor de dilución de cultivos agrobacterianos (DO600 = 1,5-1,7): 10^{-2} ; las fotografías se tomaron a los 8 dpi.

55 La Fig. 15 muestra factores que aumentan la transfección agrobacteriana: acetosiringona (AS). Vectores: 1-TMV (fsMP)-GFP (pNMD570); 2-TMV (MP)-GFP (pNMD560); 3-PVX (Δ CP)-GFP (pNMD620); 4-PVX (CP)-GFP (pNMD630); 5-35S-GFP + P19 (pNMD293). Dilución de cultivos agrobacterianos (DO600 = 1,5 – 1,7): 10^{-2} . Para el tratamiento con AS, se añadieron 200 μ M de acetosiringona (AS) a la suspensión agrobacteriana 2 horas antes de la transfección. Para la comparación, las hojas transfectadas con las suspensiones que no contenían AS también se muestran (no AS).

Fig. 16. Fotografías que muestran la expresión de GFP bajo luz ultravioleta de distintas especies de *Nicotiana* después de pulverizar plantas completas con suspensiones agrobacterianas diluidas 1000 veces de DO600 = 1,0. Se utilizaron vectores víricos basados en PVX con capacidades de movimiento célula a célula y sistémico (PVX (+CP)-GFP, pNMD600). Las suspensiones pulverizadas contenían un 0,1 % por peso de Silwet L-77. Se tomaron las fotografías 12 dpi.

La Fig. 17 muestra la expresión de GFP después del suministro de agrobacterias diluidas a plantas de espinaca y remolacha sumergiéndolas con tensioactivo. Se utilizaron un vector transcripcional así como vectores víricos basados en PVX y TMV sin capacidad de movimiento célula a célula. Se cultivaron los cultivos agrobacterianos a DO600 = 1,5 y se diluyeron 1:100; 0,1 % de Silwet L-77, inmersión durante 10 s. Se tomaron las fotografías a los 12 dpi.

La Fig. 18 muestra la expresión después del suministro de agrobacterias diluidas a plantas de tomate *Lycopersicon esculentum* por pulverización en presencia de tensioactivo. El vector que se utilizó era PVX (CP)-GFP (pNMD630). El factor de dilución del cultivo agrobacteriano (DO600 = 1,5): 10^{-2} , 0,1 % de Silwet L-77, 200 μ M de acetosiringona; se tomaron fotografías a los 14 dpi.

La Fig. 19 muestra la expresión de GFP después del suministro de agrobacterias diluidas a plantas de uchuva *Physalis peruviana* pulverizando con tensioactivo. Vector PVX (CP)-GFP (pNMD630). Dilución de cultivo agrobacteriano (DO600 = 1,5): 10^{-2} , 0,1 % Silwet L-77, 200 μ M de acetosiringona; se tomaron las fotografías a los 14 dpi.

La Fig. 20 muestra una comparación entre la transfección por infiltración utilizando una jeringa y la pulverización. Los números indican la cepa de *Agrobacterium*/vector utilizados. El suministro de agrobacterias diluidas a las hojas de algodón *Gossypium hirsutum* L. utilizando la infiltración con jeringa y pulverización con suspensiones agrobacterianas. Los cultivos agrobacterianos (cepa ICF320) se cultivaron hasta la DO600 = 1,7-2,0, diluidos por un factor de 10^{-2} con un tampón para infiltración, e incubados con 200 μ M de acetosiringona durante 2 horas antes de su uso. Para la pulverización, las suspensiones agrobacterianas se suplementaron adicionalmente con 0,1 % de Silwet L-77.

Infiltración: 1- TMV (fsMP)-GFP (pNMD570); 2-TMV (MP)-GFP (pNMD560); 3-PVX (Δ CP)-GFP (pNMD620); 4-PVX (CP)-GFP (pNMD630); 5-35S-GFP+P19 (pNMD293).

Pulverización: TMV (MP)-GFP (pNMD560).

Se utilizaron plantas de *Nicotiana benthamiana* como control positivo.

La Fig. 21 muestra la expresión de GFP en las hojas de algodón *Gossypium hirsutum* L. infiltradas con una suspensión de agrobacterias que alberga los vectores víricos y transcripcionales.

A) SDS-PAGE con tinción por Coomasie; B) Transferencia de Western hibridada con anticuerpo anti-GFP (1:3000), Anticuerpo secundario: anti-ratón-HRP (1:5000). Las calles eran las siguientes:

- 1- hojas de *N. benthamiana* no infectadas;
- 2- hojas de algodón no infectadas;
- 3- hojas de col roja no infectadas;
- 4- proteína marcadora (Fermentas, nº SM0671);
- 5-TMV (fsMP)-GFP (pNMD570) en *Nicotiana benthamiana*;
- 6-TMV (fsMP)-GFP (pNMD570) en algodón;
- 7-TMV (fsMP)-GFP (pNMD560) en algodón;
- 8-PVX (Δ CP)-GFP (pNMD620) en algodón;
- 9-PVX (CP)-GFP (pNMD630) en algodón;
- 10-35S9-GFP + P19 (pNMD293) en algodón;

Se hirvieron 100 mg de material foliar en 600 μ l de 1 x tampón de Laemmli que contenía beta-mercaptoetanol; se cargaron alícuotas de 2,5 μ l en el gel.

La Fig. 22 muestra la expresión de GFP después del suministro de agrobacterias en hojas de *Beta vulgaris vulgaris* L. utilizando la pulverización con tensioactivo; influencia de acetosiringona y abrasivo. Vector: PVX (CP)-GFP (pNMD630). Las células agrobacterianas se incubaron con 200 μ M de acetosiringona durante 2 horas antes de la pulverización. Para el tratamiento abrasivo se añadió un 0,3 % de carborundo (mezcla de carburo de silicio de F800, F1000 y F1200 partículas, Mineraliengrosshandel Hausen GmbH, Telfs, Austria) a la suspensión agrobacteriana. El factor de dilución de agrobacterias de DO600 = 1,4: 10^{-2} . Las hojas con puntos de expresión de GFP se indican a la derecha.

La Fig. 23 muestra la expresión después del suministro de agrobacterias diluidas a las plantas de diferentes especies pulverizando con tensioactivo y abrasivo. Vectores: TMV (MP)-GFP (pNMD600) y PVX (CP)-GFP (pNMD630), factor de dilución del cultivo agrobacteriano (DO600 = 1,5): 10^{-2} , un 0,1 % de Silwet L-77, un 0,3 % de carburo de silicio.

La Fig. 24 muestra la expresión después de triples tratamiento posteriores de plantas *Nicotiana benthamiana* con agrobacterias que albergan vectores víricos. La inmersión de las hojas se llevó a cabo con un intervalo de 7 días en el orden:

5 A) PVX (ΔCP)-GFP, PVX (CP)-dsRED, TMV (MP)-GFP;
 B) TMV (fsMP)-GFP, PVX (CP)-dsRED, PVX (CP)-GFP;
 C) PVX (ΔCP)-GFP, TMV (MP)-dsRED, PVX (CP)-GFP;
 D) TMV (fsMP)-GFP, PVX (CP)-dsRED, TMV (MP)-GFP;
 E) TMV (fsMP)-GFP, TMV (MP)-dsRED, TMV (MP)-GFP;
 F) PVX (ΔCP)-GFP, TMV (MP)-dsRED, TMV (MP)-GFP;
 G) TMV (fsMP)-GFP, PVX (CP)-dsRED, TMV (MP)-GFP;
 H) PVX (ΔCP)-GFP, PVX (CP)-dsRED, TMV-GFP.

10 Tratamientos únicos:

I) TMV (fsMP)-GFP; J) PVX (ΔCP)-GFP; K) TMV (MP)-GFP; L) PVX (CP)-GFP; M) TMV (MP)-dsRED y N) PVX (CP)-dsRED.

15 Fig. 25. Análisis de expresión de GFP en plantas de *Nicotiana benthamiana* pulverizadas con suspensiones agrobacterianas (factor de dilución 10⁻²) que albergan vectores TMV (MP)-GFP (pNMD600) y PVX (CP)-GFP (pNMD630)

20 A) plantas de *Nicotiana benthamiana* transfectadas por pulverización, fotografías tomadas a los 15 dpi.

B) SDS-PAGE con tinción de Coomasie; 12 % de gel, condiciones reductoras. Hojas de plantas de *N. benthamiana* transfectadas por pulverización que expresan GFP se recolectaron a los 15 dpi. El material vegetal se extrajo con 6 volúmenes de 1 x tampón de Laemmli que contenía beta-mercaptopropano. Despues de calentar a 95 °C, se cargaron alícuotas de 10 µl en el gel.

25 L-Proteína marcadora (Fermentas, nº SM0671);

1-TMV (MP)-GFP, planta 1;

2- TMV (MP)-GFP, planta 2;

3- TMV (MP)-GFP, planta 3;

4- PVX (MP)-GFP, planta 1;

5- PVX (MP)-GFP, planta 2;

6- PVX (MP)-GFP, planta 3;

U- tejido foliar de *N. benthamiana* no infectado.

7- TMV (MP)-GFP, planta infiltrada al vacío;

8- PVX (MP)-GFP, planta infiltrada al vacío.

35 RbcL- RUBISCO subunidad grande.

Fig. 26. SDS-PAGE con tinción Coomasie para el análisis del interferón alfa-a humano (Hu-IFN-αA) y Klip27-Mini-Insulina expresados en plantas de *Nicotiana benthamiana* pulverizadas con suspensiones agrobacterianas de vectores víricos basados en TMV capaces de movimiento célula a célula.

40 A) vectores Hu-IFN-αA: pNMD38 y pNMD45, factor de dilución 10⁻² del cultivo agrobacteriano, recolectando a los 12 dpi.

45 L - proteína marcadora (Fermentas, nº SM0671);

1 - pNMD38, infiltración con jeringa;

2 - pNMD38, pulverización, hoja 1;

3 - pNMD38, pulverización, hoja 2;

4 - pNMD38, pulverización, hoja 3;

5 - pNMD45, pulverización, hoja 1;

6 - pNMD45, pulverización, hoja 2;

7 - pNMD45, pulverización, hoja 3;

U – tejido foliar de *N. benthamiana* no infectado.

55 B) Klip27-Mini-Insulina: pNMD331, factores de dilución 10⁻² y 10⁻³ de cultivo agrobacteriano, recolectado a los 12 dpi.

60 L- Proteína marcadora (Fermentas, nº SM0671);

1- pNMD331, infiltración por jeringa, dilución 10⁻³;

2- pNMD331, pulverización, dilución 10⁻³;

3- pNMD331, infiltración con jeringa, dilución 10⁻³.

El material vegetal se extrajo con 6 volúmenes de 1 x de tampón Laemmli que contenía beta-mercaptopropano. Se separaron alícuotas de 10 µl en un 15 % de gel de poliacrilamida en condiciones reductoras.

65 Fig. 27. Expresión de celulasa en plantas de *N. benthamiana* conseguida por la pulverización de cultivos agrobacterianos diluidos que albergan vectores TMV capaces de movimiento célula a célula (7 y 10 dpi). Las

plantas de *N. benthamiana* se inocularon con diluciones de 10^{-2} (panel superior) y 10^{-3} (panel inferior) de cultivos de *Agrobacterium* (DO600 = 1,3) con jeringa sin aguja o por pulverización con un 0,1 % de Silwet L-77. Los niveles proteicos de fusiones de celulasa se analizaron en extractos en bruto utilizando SDS-PAGE con tinción Coomasie.

5 Para los extractos en bruto, se molieron 50 mg de material vegetal (muestras agrupadas de 3 hojas independientes) recolectadas 10 dpi en nitrógeno líquido, extraído con 5 vol. de 2 x de tampón Laemmli y se desnaturalizaron a 95 °C durante 5 min. Se analizaron 7,5 μ l de cada muestra por SDS-PAGE AL 10 % y tinción con Coomasie.

10 L - Proteína marcadora (Fermentas, nº SM0671);
 1 - tejido foliar de *N. benthamiana* no infectado;
 2 - exocelulasa E3 de *Thermobifida fusca* dirigida al apoplasto;
 3 - exoglucanasa 1 (CBH I) de *Trichoderma reesei* dirigida al apoplasto;
 15 4 - b-glucosidasa BGL4 de *Humicola grisea* dirigida a los cloroplastos;
 5 - b-glucosidasa BGL4 de *Humicola grisea* expresada en el citosol;
 6 - b-glucosidasa BGL4 marcada con His de *Humicola grisea*;
 7 - exocelulasa E3 de *Thermobifida fusca* dirigida a los cloroplastos;
 8 - endoglucanasa E1 de *Acidothermus cellulolyticus* dirigida a apoplastos.

20 Fig. 28. Inducción de biosíntesis de antocianina en hojas de *Nicotiana tabacum* mediante la expresión transitoria por infiltración de factor de transcripción MYB de antocianina 1 (ATN1) de *Lycopersicon esculentum* (AAQ55181). 7 dpi, Cultivo de *Agrobacterium* (DO600 = 1,4) factor de dilución 10^{-2} .

25 Fig. 29 Cambios morfológicos en plantas de *Nicotiana benthamiana* causados por la expresión transitoria del gen de la isopentenil transferasa (ipt) suministrado por pulverización con la agrobacteria diluida que alberga el vector transcripcional que contiene la secuencia codificante de ipt bajo el control del promotor 35S. El cultivo de *Agrobacterium* (DO600 = 1,4) se diluyó por un factor de 10^{-2} y suplementado con 0,1 % de Silwet L-77; las fotografías se tomaron a los 45 dpi.

30 A) Constitución de plantas transfectadas. ipt – Las plantas se pulverizaron con un cultivo agrobacteriano diluido (construcción pNMD460); control – plantas pulverizadas con tampón de transfección que no contiene agrobacterias.
 B) Hojas de plantas transfectadas. Arriba: hojas de plantas pulverizadas con un tampón de transfección que no contienen agrobacterias. Abajo: hojas de plantas pulverizadas con cultivo agrobacteriano diluido (construcción pNMD460).

35 Fig. 30. La expresión transitoria de endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* después de la pulverización con cultivos agrobacterianos diluidos que albergan los vectores de expresión basados en PVX correspondientes protege las plantas de *Nicotiana benthamiana* del daño por alimentación de larvas de gusanos del tabaco Manduca sexta. Las plantas se pulverizaron con cultivos de agrobacteria (DO600 = 1,4-1,7) diluidos por un factor de 10^{-2} y suplementado con un 0,1 % de Silwet L-77. Dos semanas más tarde, 3 larvas de 3º estadio larvario se alimentaron con cada planta. Se tomaron fotografías en 2 semanas después del inicio de la alimentación.

40 Fig. 31. Fenotipos de *N. benthamiana* que expresa transitoriamente defensina MsrA2 y GFP mediante vectores basados en TMV con capacidad de movimiento de célula a célula (pNMD1071 y pNMD560, respectivamente). Se llevó a cabo la inoculación con *Pseudomonas* a los 3 días post inoculación con *Agrobacterium*. Se tomaron fotografías a los 4 días post inoculación con *Pseudomonas*. La inoculación de las hojas con *Agrobacterium* y *Pseudomonas* se llevaron a cabo utilizando jeringas sin aguja.

45 Fig. 32 muestra la expresión de GFP después del suministro de agrobacterias en hojas de berenjena *Solanum melongena* L. utilizando la pulverización con tensioactivo (un 0,1 % de Silwet L-77); influencia del abrasivo. Vector: PVX (CP)-GFP (pNMD630). Las células agrobacterianas (cepa ICF320) se incubaron con 200 μ M de acetosiringona durante 2 horas antes de la pulverización. Para el tratamiento abrasivo, se añadió un 0,3 % de carborundo (mezcla de partículas de carburo de silicio de F800, F1000 y F1200, Mineraliengrosshandel Hausen GmbH, Telfs, Austria) a la suspensión agrobacteriana. El factor de dilución de agrobacterias de DO600 = 1,3: 10^{-2} . Se tomaron fotografías a los 19 dpi. El número de los puntos que expresan GFP se dan a la derecha.

50 La Fig. 33 muestra la expresión de GFP después de suministrar agrobacterias a hojas de pimienta *Capsicum annuum* L. cv Feher Gelb utilizando pulverización con tensioactivo (un 0,1 % de Silwet L-77); acción sinérgica de acetosiringona y abrasivo. Vector: PVX (CP)-GFP (pNMD630). Las células de Agrobacteria (cepa ICF320) se incubaron con 200 μ M de acetosiringona durante 2 horas antes de la pulverización. Para el tratamiento con abrasivo se añadió un 0,3 % de carborundo (mezcla de partículas de carburo de silicio de F800, F1000 y F1200, Mineraliengrosshandel Hausen GmbH, Telfs, Austria) a la suspensión agrobacteriana. Factor de dilución de agrobacterias de DO600 = 1,4: 10^{-2} . Las fotografías se tomaron a los 18 dpi. El número de puntos de expresión de GFP se da a la derecha.

55 La Fig. 34 representa la expresión de GFP después del suministro de agrobacterias a hojas de patata *Solanum tuberosum* L. cv Mirage utilizando infiltración al vacío y pulverización con tensioactivo (un 0,1 % de Silwet L-77); comparación con infiltración al vacío y pulverización. Vector: PVX (CP)-GFP (pNMD630). Las células agrobacterianas (cepa ICF320) se incubaron con 200 μ M de acetosiringona durante 2 horas antes de la pulverización. Factor de dilución de agrobacterias de DO600 = 1,5: 10^{-2} . Se tomaron las fotografías a los 14 dpi.

La Fig. 35 muestra la expresión de GUS después del suministro de agrobacterias a hojas de colza *Brassica napus* L. utilizando infiltración con jeringa y pulverización con tensioactivo (un 0,1 % de Silwet L-77). Vector: 35S-GUS+35S-P19 (pNMD1971) Las células agrobacterianas (cepa EHA105) se incubaron con 200 μ M de acetosiringona durante 2 horas antes de la pulverización. Factor de dilución de agrobacterias de DO600 = 1,3: 10^{-1} y 10^{-2} . Infiltración con jeringa: 1:10 $^{-1}$ dilución de cultivo agrobacteriano; 2: 10^{-2} dilución del cultivo agrobacteriano. Para la pulverización, se utilizó la dilución del cultivo agrobacteriano 1:10 $^{-1}$. Las fotografías de las hojas infiltradas y pulverizadas se tomaron a los 5 y 13 dpi, respectivamente.

La Fig. 36 representa la expresión de GUS después del suministro de agrobacterias a hojas de cebolla *Allium* cepa cv Stuttgarter Riesen pulverizadas con agrobacterias utilizando tensioactivo (un 0,1 % de Silwet L-77). Las células agrobacterianas (cepas EHA105 y GV3101) se incubaron con 200 μ M de acetosiringona durante 2 horas antes de la pulverización. Vectores: 35S-GUS+35S-P19 (pNMD1971) y promotor de actina de arroz -GUS+35S-P19 (pNMD2210). Factor de dilución de agrobacterias de DO600 = 1,3: 10^{-1} . Se tomaron las fotos a los 11 dpi.

La Fig. 37 muestra el fotoblanqueamiento por silenciamiento genético de fiteno desaturasa (PDS) en hojas de *Nicotiana benthamiana* después del suministro mediado por *Agrobacterium* de construcciones PVX que albergan el fragmento de secuencia codificante de PDS en una orientación antisentido; comparación de infiltración con jeringa y pulverización con surfactante (un 0,1 % de Silwet L-77). Vector: PVX (CP)-antiPDS (pNMD050); cepa de *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101. Factor de dilución de agrobacterias de DO600 = 1,5: 10^{-2} . Se tomaron fotografías a los 21 dpi y 140 dpi.

La Fig. 38 muestra el efecto de la expresión transitoria de flagelina en la infección de *Nicotiana benthamiana* por *Pseudomonas*. A) Las hojas de plantas de *Nicotiana benthamiana* infectadas con *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a. B) Los síntomas de la enfermedad se cuentan como el número de lesiones necróticas (que se ven como puntos oscuros) por hoja. 1- la planta se pulverizó preliminarmente con una suspensión de agrobacterias (cepa ICF320) que albergaba el vector PVX (CP) que proporciona la expresión de la fusión traduccional de flagelina de longitud completa (YP236536) de *Pseudomonas syringae* pv *syringae* B728a con el péptido de señal de α -amilasa apoplástica de cebada (pNMD1953); 2- las plantas pulverizadas preliminarmente con células de agrobacterias (cepa ICF320) sin ningún vector que contenga T-ADN.

Descripción detallada de la invención

En la invención, se utilizan agrobacterias para transfecir plantas con una secuencia o construcción de interés pulverizando con suspensiones acuosas que contienen células de una cepa de *Agrobacterium*. La cepa de *Agrobacterium* puede pertenecer a las especies de *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes* que se utilizan comúnmente para la transformación y transfección de plantas y que se conoce por el experto a partir de conocimiento general. La cepa de *Agrobacterium* comprende una molécula de ADN que comprende construcciones nucleicas que contienen una secuencia de ADN de interés. La secuencia de ADN de interés codifica una proteína o un ARN que se va a expresar en las plantas. La construcción nucleica está presente normalmente en T-ADN de plásmidos Ti para la introducción de la construcción nucleica en las células vegetales por el sistema secretor de la cepa de *Agrobacterium*. En al menos un lado o en ambos lados, la construcción de ácido nucleico está flanqueado por una secuencia limítrofe de T-ADN para permitir la transfección de dichas plantas y la introducción en las células de dicha planta con dicha secuencia de ADN de interés. En la construcción de ácido nucleico, la secuencia de ADN de interés está presente de manera que sea expresable en las células vegetales. Para este fin, la secuencia de ADN de interés es, en dicha construcción de ácido nucleico, normalmente bajo el control de un promotor activo en células vegetales. Ejemplos de la secuencia de ADN de interés son una secuencia de ADN que codifica un replicón vírico o un ARN de replicón vírico o un gen que se va a expresar. El gen puede codificar un ARN de interés o una proteína de interés que se va a expresar en las células vegetales. También los replicones víricos normalmente codifican un ARN o una proteína de interés que se va a expresar en plantas. La construcción de ADN puede comprender, además de la secuencia de ADN de interés, otras secuencias tales como las secuencias reguladoras de la secuencia de ADN de interés. La transferencia genética mediada por *Agrobacterium* y los vectores para la misma son conocidas por el experto en la técnica, por ejemplo, a partir de las referencias citadas en la introducción o de los libros de texto sobre biotecnología en plantas tales como Slater, Scott y Fowler, Plant Biotechnology, segunda edición, Oxford University Press, 2008.

En realizaciones en las que se desea la fuerte expresión de un proteína o ARN o en las que la acumulación de ácidos nucleicos víricos en grandes cantidades en las células vegetales y los posibles efectos sobre la salud de la planta no es un problema, la construcción de ácido nucleico puede codificar un vector vírico replicante que se puede replicar en células vegetales. Con el fin de replicarse, el vector vírico contiene un origen de replicación que se puede reconocer por una ácido nucleico polimerasa presente en las células vegetales, tales como la polimerasa vírica expresada por el replicón. En el caso de los vectores víricos ARN, los replicones pueden formarse por transcripción bajo el control de un promotor de plantas, a partir de la construcción de ADN después de que este último se haya introducido en el núcleo de la planta. En el caso de los replicones víricos ADN, los replicones víricos se pueden formar por recombinación entre dos sitios de recombinación que flanquean la secuencia codificante del replicón vírico en la construcción de ADN, por ejemplo como se describe en los documentos WO00/17365 y WO 99/22003. Si los replicones víricos se codifican por la construcción de ADN, se prefieren replicones víricos ARN. El uso de replicones víricos ADN y ARN se han descrito extensamente en la bibliografía al menos durante los últimos 15 años. Algunos ejemplos son las siguientes publicaciones de patente de Icon Genetics: WO2008028661, WO2007137788, WO 2006003018, WO2005071090, WO2005049839, WO02097080, WO02088369, WO02068664. Un ejemplo de

los vectores víricos ADN son los que se basan en geminivirus. Para la presente invención, se prefieren vectores víricos o replicones basados en virus ARN de plantas, sobre todo basados en virus ARN de cadena sencilla en sentido plus. Ejemplos de dichos vectores víricos son el virus del mosaico del tabaco (TMV) y virus potex X (PVX) que se utilizan en los ejemplos. Los vectores víricos basados en potexvirus y los sistemas de expresión se describen en el documento EP2061890. Se describen muchas otros replicones víricos de plantas en las publicaciones de patente mencionadas anteriormente.

5 La suspensión acuosa que se utiliza para la pulverización en el procedimiento de la invención puede tener una concentración de células de *Agrobacterium* de como mucho $1,1 \times 10^9$ ufc/ml, que se corresponde aproximadamente un cultivo de *Agrobacterium* en medio LB de una densidad óptica a 600 nm de 1. Debido a la alta eficacia de transfección que se consigue en la invención, se van a utilizar concentraciones mucho más bajas, que permiten el tratamiento de muchas plantas como campos de cultivo completos sin la necesidad de grandes fermentadores para la producción de *Agrobacterium*. Por lo tanto, la concentración es preferentemente como mucho de $2,2 \times 10^7$ ufc/ml, más preferentemente como mucho $1,11 \times 10^7$ ufc/ml, más preferentemente de $4,4 \times 10^6$ ufc/ml. En una realización, la concentración es como mucho de $1,1 \times 10^6$ ufc/ml de la suspensión. Para evitar la determinación de las concentraciones celulares en términos de ufc/ml, las concentraciones de suspensiones agrobacterianas se evalúan frecuentemente midiendo la densidad óptica aparente a 600 nm utilizando un espectrofotómetro. En este caso, la concentración de $1,1 \times 10^7$ ufc/ml corresponde con una densidad óptica calculada de 600 nm de 0,01, por lo que la densidad óptica calculada se define por una dilución de 100 veces con agua o tampón de una suspensión que tiene una densidad óptica de 1,0 a 600 nm. De manera similar, las concentraciones de $4,4 \times 10^6$ ufc/ml y $1,1 \times 10^6$ ufc/ml se corresponden con una densidad óptica calculada a 600 nm de 0,004 y 0,001, respectivamente, por lo que las densidades ópticas calculadas se definen por una dilución de 250 veces o 1000 veces, respectivamente, con agua o tampón de una suspensión que tiene una densidad óptica de 1,0 a 600 nm.

10 25 El abrasivo que se utiliza en la invención es un material particulado que esencialmente es insoluble en la suspensión acuosa de células de *Agrobacterium*. Se cree que el abrasivo debilita, notablemente si se utiliza junto con un agente humectante, la superficie del tejido vegetal tal como las hijas, y facilita de esta manera la penetración de las células de *Agrobacterium* en el espacio intercelular del tejido vegetal. Como resultado, aumenta la eficacia de transfección.

15 30 El material particulado que se va a utilizar como abrasivo de la invención puede ser un material de vehículo que se utiliza comúnmente como vehículos en un polvo humectable (WP) de las formulaciones pesticidas. En el contexto de los polvos humectables, también se hace referencia a estos vehículos en el campo de las formulaciones de pesticidas como "cargas" o "cargas inertes". Las formulaciones de los polvos humectables son parte del conocimiento general en el campo de la protección de plantas. Se hace referencia al libro PESTICIDE 35 SPECIFICATIONS, "Manual for Development and Use of FAO and WHO Specifications for Pesticides", editado por la organización mundial de la salud (OMS) y la Organización de Agricultura y Alimentación de los Estados Unidos, Roma, 2002, ISBN 92-5-104857-6. Las formulaciones de polvos humectables para la protección de plantas se describen por ejemplo en los documentos EP 1810569, EP1488697, EP1908348 y EP0789510. El abrasivo puede ser un material mineral, normalmente un material inorgánico. Ejemplos de dichos materiales de vehículo son tierra 40 de diatomeas, talco, yeso, carbonato cálcico, bentonita, yeso ácido, atapulgita, zeolita, sericita, sepiolita o silicato cálcico. También es posible utilizar cuarzo en polvo tal como el polvo de cuarzo de alta pureza descrito en el documento WO02/087324. Ejemplos preferidos son sílice, tal como sílice hidrófila pirógena y precipitada, y carbonato. Las propiedades abrasivas de diluyentes o cargas tales como la sílice que se utilizan en polvos humectables se conocen (véase "Pesticide Application Methods" por G.A. Matthews, tercera edición, Blackwell 45 Science, 2000, en la página 52 del mismo).

Como productos comerciales de materiales inorgánicos particulados para su uso como abrasivos de la invención, se pueden mencionar la sílice hidrófila Sipernat™ 22S y Sipernat™ 50 S, fabricadas por Evonic Degussa. Otros productos son "Hi-Sil™ 257", una sílice sintética, amorfa, hidratada producida por PPG Industries Taiwan Ltd. o "Hubersorb 600™", un silicato de calcio sintético, fabricado por Huber Corporation. Una sílice comercial de tamaño sub-micrométrico es Hi-Sil™ 233 (PPG Industries) que tiene un tamaño de partícula de aproximadamente 0,02 µm.

50 55 El abrasivo puede tener un tamaño medio de partícula entre 0,01 y 40, preferentemente entre 0,015 y 30, más preferentemente entre 0,05 y 30, incluso más preferentemente entre 0,1 y 30, incluso más preferentemente entre 0,1 y 20, incluso más preferentemente entre 0,5 y 20, y más preferentemente entre 1,0 y 16 µm. En otra realización el tamaño de partícula medio está entre 0,015 y 1 o entre 0,02 y 0,5 µm. El tamaño medio de partícula es el volumen medio del tamaño de partícula que se puede medir por difracción láser utilizando un Mastersizer™ de Malvern Instruments, Ltd. Con el fin de evitar la obstrucción de las boquillas de pulverización, el tamaño máximo de partícula de las partículas más grandes contenidas en el abrasivo debería ser como mucho de 45 µm, preferentemente como mucho 40 µm, que se puede determinar por cribado. Esta condición se considera cumplida, si el resto de la criba 60 está por debajo del 1,5 % por peso (siguiendo el ISO 3262-19). El abrasivo puede tener un valor de D90 de como mucho 40 µm, preferentemente como mucho 30 µm, medido por difracción láser como se ha descrito anteriormente. Normalmente, los tamaños de las partículas se refieren a los tamaños de partículas primarias.

65 65 El contenido del abrasivo en la suspensión acuosa de la invención puede estar entre 0,01 y 3, preferentemente entre 0,02 y 2, más preferentemente entre 0,05 y 1 e incluso más preferentemente entre 0,1 y 0,5 % por peso de dicha

suspensión.

La suspensión acuosa que se utiliza en la invención contiene un adyuvante de pulverización agrícola. El adyuvante de pulverización es un tensioactivo. El tensioactivo tiene múltiples ventajas en la presente invención. Reduce la tensión de superficie del agua de la suspensión acuosa y hace la superficie círea de las hojas de las plantas más permeables a las agrobacterias. Mejora adicionalmente la estabilidad de la suspensión y reduce la deposición del abrasivo en la suspensión. Los surfactantes que se utilizan en la presente invención son surfactantes no iónicos y los ejemplos de surfactantes incluyen los siguientes (A). Estos se pueden utilizar de manera única o en combinación.

10 (A) Tensioactivos no iónicos: Una medición que se utiliza frecuentemente para describir tensioactivos es el HLB (equilibrio hidrófilo/lipófilo). El HLB describe la capacidad del tensioactivo para asociarse a compuestos hidrófilos y lipófilos. Los tensioactivos con un equilibrio HLB alto se asocia mejor con compuestos hidrosolubles que con compuestos solubles en aceite. En el presente documento, el valor de HLB debería ser de 12 o mayor, preferentemente al menos 123. Como surfactantes no iónicos, son más preferidos en la presente invención los tensioactivos de silicio orgánico tales como heptametiltrisiloxano modificado con un polialquilenóxido son los más preferidos de la presente invención. Un producto comercial es el adyuvante de pulverización Silwet L-77™ de GE Advanced Materials.

15 (A-1) Tensioactivos tipo polietilenglicol: ejemplos de tensioactivos tipo polietilenglicol incluyen el éter de polietilen alquilo (C-12-18), aducto de óxido de etíleno de alquil naftol, éter de fenil polioxietileno (mono o di) alquilo (C8-12), producto de condensación de formaldehído de éter de fenil polioxietileno (mono o di) alquilo (C8-12), éter de fenil polioxietileno (mono, di o tri) fenilo, éter de fenil polioxietileno (mono, di o tri) bencilo, éter de fenil polioxietileno (mono, di o tri) estirilo, un éter de fenil polioxipropileno (mono, di o tri) estirilo, un polímero en bloque polioxietileno polioxipropileno, un éter de polímero en bloque polioxietileno polioxipropileno, un éter de polímero en bloque fenil polioxietileno polioxipropileno de alquilo (C8-12), éter de polioxietileno bisfenilo, éster del ácido de resina de polioxietileno, monoéster de polioxietileno de ácido graso (C12-18), monoéster de polioxietileno de ácido graso (C12-18), diéster de polioxietileno de ácido graso (C12-18), éster de polioxietileno sorbitan de ácido graso (C12-18), aducto de óxido de etíleno de éster glicerol de ácido graso, aducto de óxido de etíleno de aceite de ricino, aducto de óxido de etíleno de aceite de ricino endurecido, aducto de óxido de etíleno amina de alquilo (C12-8) y aducto de óxido de etíleno de amida de ácido graso (C12-18);

20 (A-2) Tensioactivos tipo alcohol polivalente: ejemplos de tensioactivos tipo alcohol polivalente incluyen éster glicerol de ácidos grasos, éster poliglicerina de ácidos grasos, éster pentaeritritol de ácido graso, éster sorbitol de ácido graso (C12-18), éster sorbitan de ácidos grasos (C12-8), éster sacarosa de ácido graso, alquil éter de alcohol polivalente, y amida alcanol de ácidos grasos.

25 (A-3) Tensioactivos de tipo acetileno: ejemplos de tensioactivos tipo acetileno incluyen acetilenglicol, alcohol de acetileno, aducto óxido de etíleno de acetilenglicol y aducto óxido de etíleno de alcohol de acetileno.

30

35

Los tensioactivos anteriores se pueden utilizar únicamente o en combinación con dos o más tensioactivos. De manera notable, los tensioactivos de silicona orgánica se pueden combinar con otros tensioactivos. La concentración de tensioactivos en la suspensión acuosa de la invención se puede ensayar fácilmente llevando a cabo experimentos de pulverización comparativos, de manera similar a como se hacen en los ejemplos. Sin embargo, en general, la concentración total de tensioactivos puede estar entre 0,025 y 0,5 % por volumen, preferentemente entre 0,025 y 0,2 % por volumen de dicha suspensión. Como la densidad de los tensioactivos está cerca en general de 1,9 g/ml, la concentración de tensioactivos total está entre 0,25 y 5,0 g, preferentemente entre 0,25 y 2,0 g por litro de dicha suspensión (incluyendo el abrasivo). Si los tensioactivos anteriores de silicona orgánica tal como heptametiltrioxano modificado con polalquilenóxido, la concentración del tensioactivo de silicona orgánica en la suspensión agrobacteriana que se utiliza para la pulverización pueden estar entre 0,05 y 0,5 % por volumen, preferentemente entre 0,05 y 0,2 % por volumen. De manera alternativa, la concentración del tensioactivo de silicona orgánica en la suspensión agrobacteriana que se utiliza para la pulverización se puede definir que está entre 0,5 y 5,0 g, preferentemente entre 0,5 y 2,0 g por litro de dicha suspensión.

50 Con el fin de mejorar las propiedades físicas de la suspensión acuosa, es posible añadir ácido silícico (sílice) de tamaño sub-micrométrico altamente dispersado o polímeros porosos tales como condensado de urea/formaldehído (Pergopak™). De manera notable cuando el tamaño medio de partícula del abrasivo está entre 0,1 y 30 μm , o en uno de los sub-intervalos preferidos de este intervalo que se dio anteriormente, es posible añadir una sílice de tamaño sub-micrométrico altamente dispersado a la suspensión. En este caso, la sílice de tamaño sub-micrométrico es una sílice que tiene un tamaño de partícula medio de entre 0,01 y 0,5 μm , preferentemente entre 0,02 y 0,5 μm , más preferentemente entre 0,02 y 0,1 μm . El ácido silícico altamente dispersado tal como Hi-Sil™ 233 (PGG Industries) puede contribuir a las propiedades abrasivas de la suspensión acuosa (véase Jensen et al., Bull. Org. Mond. Sante, Bull. Wld Hlth Org. 41 (1969) 937-940). Estos agentes se pueden incorporar en una cantidad de 1 a 10
55 g por litro de la suspensión de la invención.
60

65 Posibles aditivos adicionales para la suspensión agrobacteriana son sustancias tampón para mantener el pH de la suspensión que se utiliza para la pulverización en un pH deseado, típicamente entre 7,0 y 7,5. Además, se pueden añadir sales solubles inorgánicas tales como el cloruro sódico para ajustar la fuerza iónica de la suspensión. También puede estar contenido en la suspensión un caldo nutritivo tal como el medio LB.

La suspensión acuosa se puede producir de la siguiente manera. En un método, la cepa de *Agrobacterium* que se va a utilizar en el procedimiento de la invención se inocula en un medio de cultivo y se cultiva hasta una alta concentración celular. Se pueden inocular cultivos más grandes con pequeños volúmenes de medio de cultivo altamente concentrado para la obtención de grandes cantidades de medio de cultivo. Las agrobacterias se cultivan 5 generalmente hasta que la concentración celular que se corresponde a una DO de 500 nm de al menos 1, normalmente de aproximadamente 1,5. Dichas suspensiones agrobacterianas altamente concentradas se diluyen entonces para conseguir la concentración celular deseada. Para la dilución las suspensiones agrobacterianas altamente concentradas se utiliza agua. El agua puede contener un tampón. El agua puede contener adicionalmente 10 un tensioactivo de la invención. De manera alternativa, las suspensiones agrobacterianas concentradas pueden diluirse en agua, y cualquiera de los aditivos tales como el tensioactivo y las sustancias tampón opcionales se añaden después o durante el procedimiento de dilución. El abrasivo se puede añadir antes, durante o después de la dilución. Sin embargo se prefiere agitar la suspensión durante la adición del abrasivo para dispersar uniformemente 15 el abrasivo en la suspensión agrobacteriana. La etapa de dilución de la suspensión agrobacteriana concentrada puede llevarse a cabo en el depósito de pulverización del pulverizador utilizado para pulverizar las suspensiones diluidas.

El pulverizador que se va a utilizar en el procedimiento de la presente invención depende principalmente del número 20 de plantas o el área que se va a pulverizar. Para una o un pequeño número de plantas que se van a pulverizar, se pueden utilizar los pulverizadores de bomba como los que se emplean ampliamente en la casa o en jardinería. Estos pueden tener volúmenes de depósito de pulverización de entre 0,5 y 2 litros. Para aplicaciones a media escapa, se 25 pueden utilizar pulverizadores hidráulicos operados manualmente tales como los pulverizadores de mochila operados con una palanca o los pulverizadores de compresión utilizados manualmente. Sin embargo, la transfección de alto rendimiento que se alcanza en la invención tiene su más completo potencial en la transfección de muchas plantas tal como las plantas cultivadas en un campo de cultivo o en un invernadero. Para este fin, se pueden utilizar 30 los pulverizadores hidráulicos operados con un motor tal como los pulverizadores hidráulicos montados en un tractor con barras de pulverización. Las técnicas de aplicación aérea que utilizan helicópteros o aviones también son posibles para grandes campos. Todos estos tipos de pulverizadores se conocen en la técnica y se describen por ejemplo en el libro "Pesticide Application Methods" por G.A. Matthews, tercera edición, Blackwell Science, 2000. Con el fin de asegurar una suspensión homogénea en los depósitos de pulverización de los pulverizadores, se pueden 35 agitar los pulverizadores de tamaño pequeño y medio a intervalos regulares o continuamente durante la pulverización. Los grandes pulverizadores tales como los pulverizadores montados en un tractor se deberían equipar con un agitador en el depósito de pulverización.

Considerando la presencia de las células agrobacterianas y el abrasivo en las suspensiones que se van a pulverizar, 40 los pulverizadores que se utilizan en la invención deberían producir una pulverización con un tamaño de gota de al menos una pulverización fina. También se pueden utilizar pulverización media y pulverización gruesa en la clasificación de pulverización que se utiliza en el libro mencionado anteriormente de G. A. Matthews, página 74. El propósito principal de la pulverización de la invención es humedecer el tejido vegetal con la suspensión. Por lo tanto, el tamaño de gota exacto no es crítico. Sin embargo, la eficacia de transfección se puede mejorar adicionalmente 45 mejorando la pulverización de las superficies de las plantas con una presión aumentada.

En el procedimiento de la invención, al menos se pulverizan partes de planta. En una realización importante, se 45 pulverizan las plantas que crecen en el suelo o en un campo, es decir, plantas que no se cultivan en tiestos móviles o contenedores. Dichas plantas no se pueden dar la vuelta y sumergirlas en la suspensión agrobacteriana para la infiltración al vacío. Al menos se pulverizan partes de la planta tales como las hijas. Preferentemente, se pulverizan la mayoría de las hojas y las plantas completas.

La presente invención se utiliza para la transfección transitoria de plantas con una secuencia de ADN de interés. El 50 término "transitoria" significa que los métodos de no selección se utilizan para seleccionar células o plantas transfectadas con la secuencia de ADN de interés en el fondo de células o plantas no transfectadas que utilizan, por ejemplo agentes marcadores y genes marcadores genéticos capaces de detoxicar los agentes marcadores. Como resultado, el ADN transfectado no se introduce establemente en general en el ADN cromosómico de la planta. En vez de eso, los métodos transitorios utilizan el efecto de la transfección de muchas de las plantas transfectadas.

55 La invención se utiliza en general para la transfección de plantas multicelulares, notablemente, plantas mayores. Se pueden transfectar plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas, aunque se prefieren las plantas dicotiledóneas. Las plantas para su uso en la presente invención incluyen cualquier especie de planta dando preferencia a las especies de cultivo importantes agronómica y horticulturalmente. Las plantas de cultivo comunes para su uso en la presente invención incluyen alfalfa, cebada, judías, canola, frijoles, algodón, maíz, trébol, loto, lentejas, altramuz, mijo, avena, 60 guisantes, cacahuetes, arroz, centeno, trébol dulce, girasol, guisante de olor, soja, híbrido de sorgo, judía de riñón, frijol terciopelo, algarroba, trigo, wisteria y plantas de nueces. Las especies de plantas preferidas para la práctica de la invención incluyen, pero no se restringe a, Gramineae, Compositeae, Solanaceae y Roseaceae representativas.

65 Las especies preferidas adicionalmente para su uso en la presente invención son plantas de los siguientes géneros: *Arabidopsis*, *Agrostis*, *Allium*, *Antirrhinum*, *Apium*, *Arachis*, *Asparagus*, *Atropa*, *Avena*, *Bambusa*, *Brassica*, *Bromus*, *Browaalia*, *Camellia*, *Cannabis*, *Capsicum*, *Cicer*, *Chenopodium*, *Chichorium*, *Citrus*, *Coffea*, *Coix*, *Cucumis*,

Cucurbita, Cynodon, Dactylis, Datura, Daucus, Digitalis, Dioscorea, Elaeis, Eleusine, Festuca, Fragaria, Geranium, Glycine, Helianthus, Heterocallis, Hevea, Hordeum, Hyoscyamus, Ipomoea, Lactuca, Lens, Lilium, Linum, Lolium, Lotus, Lycopersicon, Majorana, Malus, Mangifera, Manihot, Medicago, Nemesia, Nicotiana, Onobrychis, Oryza, Panicum, Pelargonium, Pennisetum, Petunia, Pisum, Phaseolus, Phleum, Poa, Prunus, Ranunculus, Raphanus, Ribes, Ricinus, Rubus, Saccharum, Salpiglossis, Secale, Senecio, Setaria, Sinapis, Solanum, Sorghum, Stenotaphrum, Theobroma, Trifolium, Trigonella, Triticum, Vicia, Vigna, Vitis, Zea, y el Olyreae, el Pharoideae y otros.

5 En una realización, el procedimiento de la invención se puede utilizar para producir una proteína de interés en una planta o en muchas plantas cultivadas en un campo. Para este fin, las plantas se pueden pulverizar con la suspensión agrobacteriana en un estado de crecimiento de las plantas deseado. Si el principal objetivo es alcanzar los niveles de expresión más alto posible seguido por la recolección de las plantas para obtener el material vegetal que contiene altas cantidades de la proteína, se pueden utilizar vectores víricos, ya que en general dan los niveles de expresión más altos.

10 15 En otra realización, el procedimiento de la invención se utiliza para generar o alterar un rasgo en una planta tal como un rasgo de introducción. En esta realización, la expresión excesiva de una proteína o ARN de interés puede no desearse para evitar los efectos perjudiciales sobre la salud de la planta. Para tales realizaciones, los vectores no replicantes (a los que también se hace referencia como "vectores transcripcionales"), es decir, se prefieren vectores que carecen de origen de replicación funcional reconocido por una polimerasa de ácido nucleico presente en las células vegetales. Un ejemplo de dicha realización es la expresión de moléculas hormonales como mensajeros secundarios en células vegetales. En el ejemplo de la Fig. 29, los inventores demostraron el suministro de isopentenil transferasa, enzima clave de la biosíntesis de citocinina, en células de *Nicotiana benthamiana* pulverizando con la agrobacteria diluida que alberga un vector transcripcional que contiene la secuencia codificante de ipt bajo el control de un promotor 35S. Se observaron los cambios morfológicos de las plantas transfectadas causados por la sobre-producción de citocinina (Fig. 29). Otra aplicación de la invención es la expresión de ARN, por ejemplo, para la interferencia de ARN, en el que la señal de interferencia puede diseminarse en la planta a partir de las células que expresan la señal a otras células. Un ejemplo es el direccionamiento de ADN vírico no deseado en las plantas como se describen en Pooggin en Nat. Biotech. 21 (2003) 131. Un ejemplo de oncogén de silenciamiento que se puede adaptar a un sistema transitorio se describe en Escobar et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 (2001) 13437-13442. La Fig. 37 muestra el fotoblanqueamiento por silenciamiento genético de fiteno desaturasa (PDS) en hojas de *Nicotiana benthamiana*. Un ejemplo adicional es el control de plagas de insectos coleópteros mediante interferencia de ARN similar a como se describe en Baum et al., Nat. Biotech. 25 (2007) 1322-1326 que se puede adaptar al procedimiento transitorio de la invención por transfección transitoria de las plantas infestadas por la plaga con un ADN de interés que codifica y expresa el dsARN. Los métodos adicionales aplicables al procedimiento transitorio de la invención son los descritos en Huang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103 (2006) 14302-14306; Chuang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97 (2000) 4985-4990. En el experimento los resultados que se muestran en la Fig. 38, la expresión de flagelina protege una planta de los síntomas de enfermedad producidos por *Pseudomonas syringae*.

40 45 50 55 60 Adicionalmente, el procedimiento de la invención permite la alteración en un momento deseado rasgos relativo a la regulación del tiempo de floración o formación de frutos tales como la tuberización en patatas (Martinez-Garcia et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99 (2002) 15211-15216) o la regulación de la ruta de flavonoides utilizando un factor de transcripción (Deluc et al., Plant Physiol. 147 (2008) 2041-2053). La floración se puede inducir por la expresión transitoria de la proteína Fr florigen móvil (Zeevaart, Current Opinion in Plant Biology 11 (2008) 541-547; Corbesier et al., Science 316 (2007) 1030-1033). Los frutos partenocápicos en los tomates pueden producirse a gran escala utilizando la invención y el método descrito por Pandolfini et al., BMC Biotechnology 2 (2002). Aplicaciones adicionales de la invención están en el contexto de la alteración del desarrollo de fibras de algodón mediante factores de transcripción MYB como se describe en Lee et al., Annals of Botany 100 (2007) 1391-1401 o la activación de genes de planta defensivos (Berger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 (1996) 12053-12058). Los inventores demostraron que la expresión transitoria de defensina MsrA2 en hojas de *Nicotiana benthamiana* disminuye significativamente los síntomas de infección por *Pseudomonas* (Fig. 31).

La invención también proporciona un procedimiento de protección de plantas de cultivo en un campo contra una plaga. En dicho procedimiento, se puede determinar la infestación de al menos una de las plantas de una pluralidad de plantas que crecen en un huerto o un campo. Debido a la rapidez del procedimiento de la invención la expresión de una proteína o ARN perjudicial para la plaga se tiene que producir solo si se determina la infestación por la plaga. Por lo tanto, la expresión fuerte y constitutiva de las toxinas para la plaga o el dsARN para el ARN incluso en ausencia de un riesgo de infestación no es necesaria. La expresión transitoria de endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* después de la pulverización con cultivos agrobacterianos diluidos que albergan los vectores de expresión basados en PVX correspondientes las plantas de *Nicotiana benthamiana* del daño por alimentación de larvas del gusano del tabaco *Manduca sexta* (Fig. 30).

Ejemplos

La invención se describe adicionalmente a continuación a modo de ejemplos. La invención sin embargo no se limita a estos ejemplos. Los ejemplos 1, 2 y 5 a 9 son ejemplos de referencia.

5 **Ejemplo de referencia 1: Determinación de concentración celular de *Agrobacterium* en cultivos líquidos en términos de unidades formadoras de colonias (ufc)**

10 La concentración de células de *Agrobacterium* en suspensión líquida en términos de unidades formadoras de colonias por ml (ufc/ml) de las suspensiones líquidas se puede determinar utilizando el siguiente protocolo. Las células de la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* ICF 320 transformadas con la construcción pNMD620 se cultivaron en 7,5 ml de medio LBS líquido que contenía 25 mg/l de kanamicina (AppliChem, A1493) y 50 mg/l rifampicina (Carl Roth, 4163.2). El cultivo bacteriano se incubó a 28 °C con agitado continuo. La absorbancia o densidad óptica del cultivo bacteriano expresado en unidades de absorbancia (AU) se controló en alícuotas de 1 ml del cultivo utilizando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm (DO600). La concentración celular estimada como el número de unidades formadoras de colonias por mililitro de cultivo líquido (ufc/ml) se puede analizar a valores de DO600 de 1; 1,3; 1,5; 1,7 y 1,8. Para este fin se diluyeron alícuotas de 250 µl de cultivo líquido en medio LBS para alcanzar un volumen final de 25 ml (dilución 1:100), 2,5 ml de cada dilución de 1:100 se mezclaron con 22,5 ml de LBS para conseguir una dilución de 1:1000. Se prepararon diluciones de 1:100, 1:1000, 1:10.000; 1:100.000, 20 1:1.000.000; 1:10.000.000 y 1:100.000.000 de manera similar. Se diseminaron alícuotas de las últimas tres diluciones en medio LBS sobre agar solidificado suplementado con 25 mg/l de kanamicina y 50 mg/l de rifampicina (250 µl de cultivo bacteriano por placa de 90 mm de diámetro). La plantación de alícuotas para cada dilución se llevó a cabo por triplicado. Después de dos días de incubación a 28 °C, las colonias bacterianas se contaron en cada placa. La colocación en placas de las diluciones de 1:1.000.000 y 1:10.000.000 daba como resultado unos pocos cientos y pocas docenas de colonias por placa, respectivamente. Hasta cierto punto como la dilución de 25 1:100.000.000 proporcionaba solo unas pocas colonias por placa, esta dilución no se utilizó para el cálculo de la concentración celular. La concentración celular se estimó de acuerdo con la fórmula: ufc/ml = 4 x número de colonias por placa x factor de dilución.

30 Para las concentraciones de transformación celular según se mide por las mediciones de absorbancia a 600 nm (en medio LB) y en términos de unidades formadoras celulares, se utiliza la siguiente relación en el presente documento: una DO600 de 1,0 corresponde con $1,1 \times 10^9$ ufc/ml.

Medio LBS (líquido)

35 1 % de peptona de soja (hidrolizado papico de harina de soja; Duchefa, S1330)
0,5 % de extracto de levadura (Duchefa, Y1333)
1 % de cloruro sódico (Carl Roth, 9265.2)
disueltos en agua, y el pH se ajusta a un pH de 7,5 con 1 M de NaOH (Carl Roth, 6771.2)

40 Para preparar el medio LBS sólido, el medio LBS líquido se suplementó con 1,5 % de agar (Carl Roth, 2266.2) El medio se procesó en autoclave a 121 °C durante 20 min.

Ejemplo 1: Vectores utilizados en los siguientes ejemplos

45 En este estudio los inventores utilizaron vectores transcripcionales convencionales basados en un promotor 35S CaMV así como replicones víricos basados en PVX y TMV con o sin capacidad de movimiento célula a célula.

50 Todos los vectores de transcripción se crearon basándose en pICBV10, un vector binario derivado de pBIN19 (Marillonnet et al., 2004, 2006). Contenían dos casetes de expresión insertados con los bordes derecho e izquierdo de la misma región T-ADN (Fig. 1). Para la clonación del vector de expresión pNMD293, se crearon dos construcciones intermedias (pNMD280 y pNMD033). El pNMD280 contenía el casete de expresión que comprende en orden secuencias el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CAMV), amplificador traduccional omega del virus del mosaico del tabaco, secuencia codificante del supresor de silenciamiento P19 del virus del achaparramiento del tomate (TBSV) (nº de registro de GenBank CAB56483.1) y terminador del gen de octopina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens* insertado entre los bordes de T-ADN derecho e izquierdo. Para hacer posible la siguiente etapa de clonación, se introdujeron dos sitios de restricción, EcoRI y SphI, entre el borde derecho de T-ADN y la secuencia promotora 35S. La construcción pNMD033 contenía el casete de expresión entre los bordes de T-ADN derecho e izquierdo flanqueado por los sitios de restricción EcoRI y SphI y comprendido por el promotor 35S, amplificador traduccional omega, secuencias codificantes de proteína de gelatina fluorescente verde y terminador del gen de octopina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*, enumerados en orden secuencial. Para la clonación de la construcción de pNMD293, se extirpó el casete de expresión de GFP de la construcción pNMD033 utilizando las enzimas de construcción EcoRI y SphI y se transfirió en el vector pNMD280 alineado con las mismas restrictas. Resultando la construcción pNMD293 que contenía dos casetes de expresión insertadas entre los bordes T-ADN derecho e izquierdo. Un casete de expresión adyacente al borde derecho comprendía el promotor 35S CAMV, potenciador traduccional omega, secuencias codificantes de proteína fluorescente verde y el terminador nos

(enumerados en orden secuencial). Casete de expresión adyacente al borde izquierdo contenía un promotor 35S seguido por el amplificador traduccional omega, secuencia codificante del supresor de silenciamiento P19 y el terminador ocs. Todas las otras construcciones se crearon basándose en un vector pNMD293, sustituyendo la secuencia codificante de GFP con las secuencias codificantes amplificadas por PCR de otros genes de interés

5 utilizando los sitios de restricción Ncol y BamHI para la clonación. Los genes de interés introducidos en la construcción del vector de transcripción que codificaban sGFP, con proteína fluorescente verde (GFP) modificada a partir de gelatina de *Aequorea victoria* (nº de registro de GenBank EF30489) pNMD293; DsRED, proteína fluorescente roja de coral de arrecife de *Discosoma* sp. (nº de registro de GenBank AF168419.2) pNMD1380); el factor de floración SP3D del tomate (nº de registro de GenBank AY186735) (pNMD421); Locus de floración T (FT) de *Arabidopsis* (nº de registro de GenBank BAA77839) (pNMD655); regulador brassinosteroide DWARF4 de *Arabidopsis* (NM_114926) (pNMD440); isopentenil transferasa (IPT), enzima clave de la biosíntesis de citocinina en la cepa C58/ATCC33970 de *Agrobacterium tumefaciens* (nº de registro de GenBank AE007871.2) (pNMD460).

10 Los vectores basados en TMV con capacidad de movimiento célula a célula (Fig. 2) se crearon basándose en los vectores descritos en Marillonnet et al. (2006). Se empleó la construcción pNMD035 como vector de clonación por la inserción consecutiva de secuencias codificantes de genes de interés utilizando los sitios de clonación Bsal. Dando como resultado construcciones que contenían, en orden secuencial, un fragmento del promotor de actina 2 de *Arabidopsis* (ACT2) (nº de registro GenBank AB026654); el extremo 5' de TVCV (nº de registro GenBank BRU03387, pares de bases 1-5455) y un fragmento de cr-TMV [nº de registro GenBank Z29370, pares de bases 20 5457-5677, conteniendo ambos 16 inserciones de intrón]; un gen de interés; región 3' no traducida de cr-TMV (3' NTR; nº de registro GenBank Z29370), y el terminador de nopalina sintasa (nos). El fragmento completo se clonó entre los bordes izquierdo y derecho del T-ADN del vector binario. Los genes de interés en estas construcciones que codificaban GFP (pNMD560), dsRED (pNMD580), interferón alfa-a humano son señal dirigida al apoplastro de la amilasa de arroz (pNMD38), klp27-mini-insulina con señal dirigida al apoplastro de amilasa de arroz (pNMD330), 25 taumatina 2 de *Taumatococcus danielii* (pNMD700), β-glucosidasa BGL4 de *Humicola grisea* (pNMD1200), exocelulasa E3 de *Thermobifida fusca* (pNMD1160), exoglucanasa 1 (CBH 1) de *Trichoderma reesei* (pNMD1180), defensina Rs-AFP2 de *Rafanus sativus* (pNMD1061), defensina MsrA2 (un derivado sintético de dermaseptina B1 de la rana *Phylomedusa bicolor*) (pNMD1071), densina MB39 (cecropina modificada de mariposa *Cecropia Hyalophora cecropia*) (pNMD1280), defensina plectasina del hongo *Pseudoplectania nigrella* (pNMDxxxx).

30 30 Los vectores basados en TMV que carecen de capacidad de movimiento célula a células eran idénticos a los vectores basados en TMV correspondientes con capaces del movimiento de célula a célula con una excepción de mutación puntual en la secuencia codificante de MP que da lugar al cambio de fase de lectura abierta que distorsiona la traducción de MP (Fig. 3). La clonación de estas construcciones se llevó a cabo utilizando pNMD661 como vector de clonación.

35 Para la clonación de la mayoría de los vectores basados en PVX con capacidad de movimiento célula a célula y sistémico, se utilizó el vector de clonación pNMD670. Las construcciones resultantes contenían, en orden secuencial, el promotor 35S de CaMV, las secuencias codificantes de ARN polimerasa dependiente de ARN, 40 proteína de revestimiento, módulos triples de bloqueo genético que comprendían las proteínas 25 kDa, 12 kDa, y 8 kDa, el gen de interés y la región 3' no traducida. El fragmento completo se clonó entre los bordes izquierdo y derecho del T-ADN del vector binario (Fig. 4) otro grupo de construcciones basadas en PVX tenían una estructura similar con diferencia en la posición CP, que se insertaba entre la polimerasa PVX y el triple bloqueo genético (por ejemplo, el pNMD600).

45 45 Los vectores basados en PVX con eliminación de la secuencia codificante de la proteína de revestimiento estaban incapacitados para el movimiento tanto célula a célula como sistémico. La clonación de estas construcciones se llevaron a cabo utilizando el pNMD694 como vector de clonación. Este tipo de vectores contenía en orden secuencial, el promotor 35S CaMV, secuencias codificantes de ARN polimerasa dependiente de ARN, módulo triple de bloqueo genético, el gen de interés y la región 3' no traducida entre los bordes izquierdo y derecho del T-ADN del vector binario (Fig. 5).

50 **Ejemplo 2: Las agrobacterias diluidas se pueden suministrar a *Nicotiana benthamiana* utilizando tensioactivo por pulverización**

55 55 Los inventores han demostrado que las plantas de *Nicotiana benthamiana* se pueden transfectar por pulverización de las plantas con cultivos agrobacterianos diluidos que contienen tensioactivo (Fig. 6). Para evaluar los parámetros que tienen influencia en la transfección y optimizar la eficacia de transfección, los inventores utilizaron la inmersión de hojas de *Nicotiana benthamiana* en suspensión agrobacteriana. Esta estrategia permite las mediciones exactas y facilita el ensayo de múltiples versiones del experimento. Los cultivos agrobacterianos de una noche (DO600 = 1,5) se diluyeron 1:100 y 1:1000 (factores de dilución 10^{-2} y 10^{-3} , respectivamente) en 10 μ M de tampón MES (pH 5,5) que contenía 10 mM de sulfato magnésico y suplementado con el tensioactivo Silwet L-77. Se ensayaron tres tipos de construcciones que proporcionaban la expresión de GFP: 1) vectores transcripcionales, 2) replicones víricos basados en TMV y 3) replicones víricos basados en PVX (Fig. 6). Los vectores víricos utilizados en estos experimentos se incapacitaron para el movimiento tanto sistémico como célula a células. Proporcionaron la expresión del gen indicador solo en las células transfectadas con el T-ADN. Se hizo el recuento de células que

expresaban GFP después del aislamiento de los protoplastos foliares (Fig. 7). Dependiendo de la concentración de la suspensión agrobacteriana e independientemente del tipo de vector, se transfecaron un total del 2-8 % de células foliares como resultado de la transferencia de T-ADN mediada por *Agrobacterium* cuando se utilizaba un 0,1 % por volumen de Silwet L-77 y un tiempo de inmersión de 1 min.

5 Para encontrar la concentración óptima de tensioactivo, los inventores ensayaron con un 0,1 % y un 0,05 % de Silwet L-77 en los experimentos de inmersión. Para los tres tipos de vectores, la eficacia de transfección proporcionada por el uso de un 0,1 % de Silwet era significativamente mayor en comparación con la concentración de 0,05 % (Fig. 8-10).

10 La inmersión durante 10 s de hojas de *Nicotiana benthamiana* en una suspensión agrobacteriana diluida suplementada con un 0,1 % de Silwet proporcionaba tasas de transfección cercanas a la eficacia del pulverizado con la misma suspensión (Fig. 11). En ambos casos, la eficacia de transfección era mayor para las hojas con desarrollo más antiguo. La tasa de transfección variaba desde 1,4 a 3,7 % para la inmersión y desde 1,1 a 1,7 % para la pulverización a una dilución 1:100 del cultivo agrobacteriano. En la dilución 1:1000 la variación era 0,2-1,1 % para la inmersión y de 0,1-0,6 % para la pulverización.

15 El Silwet L-77 que se utiliza en todos los ejemplos del presente documento se adquirió en Kurt Obermeier GmbH & Co. KG (Bad Berleburg, Alemania). El fabricante es GE Silicones, Inc., USA. El Silwet L-77 que se utiliza es un producto de silicona orgánica compuesto por un 84,0 % de heptametiltrisiloxano modificado con polialquilenóxido (CAS-nº 27306-78-1) y un 16 % de aliloxi-polietilen-glicolmetil éter (CAS-nº 27252-80-8). Todas las concentraciones de contenido de Silwet L-77 que se da en los ejemplos o figuras se refieren a este producto comercial.

20 **Ejemplo 3: Las agrobacterias diluidas se pueden suministrar a otras especies por pulverización utilizando tensioactivo y abrasivo**

25 Los inventores ensayaron el número de especies vegetales utilizando la transfección agrobacteriana con la pulverización y tensioactivo. En primer lugar, los inventores exploraron cada especie en cuanto al vector de expresión óptimo. Para este fin se infiltraron las hojas de las plantas utilizando una jeringa sin aguja con diluciones 30 1:100 de DO = 1,5 de cinco cultivos agrobacterianos que albergaban los vectores transcripcionales de la expresión de GFP: 1) vector transcripcional 35S-GFP + P19 (pNMD293), 2) vector vírico basado en TMV capaz del movimiento célula a célula TMV(MP)-GFP (pNMD560), 3) vector vírico basado en TMV incapaz de movimiento célula a célula TMV(fsMP)-GFP (pNMD570), 4) vector vírico basado en PVX capaz de movimiento tanto sistémico como célula a célula PVX(CP)-GFP (pNMD630) y 5) vector vírico basado en PVX incapacitado para el movimiento tanto sistémico como célula a célula PVX(ΔCP)-GFP (pNMD620). En algunos casos se llevó a cabo la infiltración al vacío.

35 Los inventores demostraron que la eficacia de la transcripción mediada por *Agrobacterium* para varias especies de Solanaceae incluyen *Nicotiana benthamiana* (los cinco vectores), tabaco *Nicotiana tabacum* (los cinco vectores), tomate *Lycopersicon esculentum* (vectores transcripcionales y basados en PVX), pimienta *Capsicum annuum*, uchuva *Physalis peruviana*, berenjena *Solanum melongena*, patata *Solanum tuberosum* (todos con vectores basados en PVX) (Fig. 13).

40 Se demostró la transfección mediada por *Agrobacterium* para la lechuga *Lactuca sativa* de la familia Asteraceae (vector transcripcional), remolacha *Beta vulgaris* de la familia Chenopodiaceae (los cinco vectores), calabacín *Cucurbita pepo* de la familia Cucurbitaceae (vector transcripcional), y algodón *Gossypium hirsutum* de la familia Malvaceae (los cinco vectores) (Fig. 14).

45 El tratamiento de células agrobacterianas con acetosiringona (200 µM, 2 horas) aumentaba significativamente la eficacia de transfección de varias especies de plantas incluyendo el tomate, berenjena y calabacín (Fig. 15).

50 Basándose en los datos de infiltración, se ensayó la pulverización con suspensiones agrobacterianas diluidas en cuanto a número de especies vegetales. La eficacia de suministro de agrobacterias diluidas (10^{-3}) pulverizando con suspensiones que contenían un 0,1 % de Silwet se demostró en varias especies de *Nicotiana* (*Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana debne*, *Nicotiana excelsior*, *Nicotiana exigua*, *Nicotiana marítima* y *Nicotiana simulans*) como se muestra utilizando PVX con capacidad para movimiento sistémico y célula a célula en la Fig. 16.

55 El suministro de agrobacterias a otras especies incluidas en las familias Solanaceae, Chenopodiaceae, Amaranthaceae, y Aizoaceae se demostró por inmersión en suspensión agrobacteriana y pulverización con y sin abrasivo utilizando vectores transcripcionales así como vectores TMV y PVX con y sin capacidad de movimiento célula a célula (Fig. 17-21). La lista de especies transfecadas satisfactoriamente incluye la espinaca *Spinacea oleracea* de la familia Amaranthaceae (vectores transcripcionales y basados en PVX), variedades de remolacha *Beta vulgaris* de la familia Chenopodiaceae (vectores víricos basados en PVX y basados en TMV) (Fig. 17), tomate *Lycopersicon esculentum* (vector basado en PVX) (Fig. 18), uchuva *Physalis peruviana* y patata *Solanum tuberosum* (Fig. 34) (vector basado en PVX) (Fig. 19) de la familia Solanaceae, algodón *Gossypium hirsutum* de la familia Malvaceae (vector basado en TMV) (Fig. 20). La expresión de GFP en tejido de algodón después de la transfección agrobacteriana se confirmó utilizando transferencia de Western hibridada con anticuerpos específicos de GFP (Fig.

21).

Utilizando el gen GUS como un indicador, la transfección satisfactoria por pulverización con la suspensión agrobacteriana se consiguió en *Brassica napus* de la familia *Brassica* (Fig. 35). Se creó la construcción pNMD1971 basándose en el plásmido pNMD293 sustituyendo la secuencia de GFP con la secuencia de beta-glucuronidasa (GUS) de *Escherichia coli* (P05804) que contenía el 7º intrón del gen PSK7 de *Petunia hybrida* (AJ224165).

La transfección eficaz de plantas que utilizan la pulverización con suspensión agrobacteriana diluida se demostró también en especies de monocotiledóneas. La Fig. 36 muestra la transfección de plantas de cebolla *Allium cepa* después de la pulverización con la suspensión agrobacteriana suplementada con un 0,1 % de Silwet L-77. La construcción pNMD2210 se creó basándose en el plásmido pNMD1971 sustituyendo el promotor 35S en el casete de expresión de GUS con el promotor actina 2 (Act2) del arroz *Oryza sativa* (EU155408).

En todos los ejemplos descritos en el presente documento, se llevó a cabo la pulverización con depósitos de bomba de pulverización con un volumen nominal de 500 o 1000 ml (Carl Roth, nº 0499.1 y nº 0500.1) basado en bombeo directo manual o con un pulverizador a presión con un volumen de 1,25 l (Gardena, nº 00864-20) aprovechando el aumento de presión para bombear. Las plantas se pulverizaron hasta humedecer las hojas completamente. Los pulverizadores se agitaban de tiempo en tiempo para asegurar la homogeneidad de la suspensión que se iba a pulverizar, sobre todo si las suspensiones contenían un abrasivo.

20 **Ejemplo 4: Transfección de plantas utilizando suspensiones de *Agrobacterium* que contienen un abrasivo**

El carborundo utilizado en estos experimentos era una mezcla de carborundo (carburo de silicio) de partículas F800, F1000 y F1200 de Mineraliengrosshandel Hausern GmbH, Telfs, Austria. Según el proveedor, tiene unos diámetros de superficie medios de 6,5, 4,5 y 3 μm , respectivamente. El 97 % por peso de las partículas de F800, F1000 y F1200 tiene un diámetro de superficie menor de 14, 10 y 7 μm , respectivamente. El 94 % por peso de las partículas tienen un diámetro de superficie mayor de 2, 1, y 1 μm , respectivamente. Se mezclaron F800, F1000 y F1200 en cantidades por peso iguales. Se añadió un 0,3 % (p/v) del carborundo mezclado en las suspensiones agrobacterianas suplementadas con 0,1 % de Silwet L-77 y se utilizaron para pulverizar las plantas utilizando los pulverizadores descritos en el ejemplo 3.

Los resultados que se muestran en las Fig. 32, 22 y 33 demostraban que el uso del abrasivo aumenta significativamente la eficacia de transfección. La pulverización de plantas de berenjena *Solanum melongena* con la suspensión agrobacteriana que contenía un 0,3 % de carborundo (carburo de silicio SiC) proporcionaba un aumento de 2 veces de eficacia de transfección (Fig. 32). En el caso de remolachas rojas, el mismo tratamiento con abrasivo resultaba en un aumento de 15 veces de eficacia de transfección (Fig. 22). De manera reseñable, el uso de un abrasivo era un factor decisivo que permitía la transfección de plantas de pimienta pulverizando con la suspensión agrobacteriana; la combinación de un tratamiento abrasivo con activación de las células agrobacteriana con acetosiringona aumentaba adicionalmente la eficacia de transfección (Fig. 32). La lista de especies transfectadas utilizando la pulverización con tensioactivo y abrasivo incluyen también la Mangel-wurzel, otra variedad de Beta vulgaris, espinaca de Nueva Zelanda *Tetragonia expansa* de la familia Aizoaceae, pimienta *Capsicum annuum* y berenjena *Solanum melongena* de las Solanaceae (Fig. 23).

45 **Ejemplo 5: Se puede repetir el tratamiento con agrobacterias: múltiples tratamientos posteriores**

Los inventores llevaron a cabo múltiples tratamientos posteriores de plantas de *Nicotiana benthamiana* con agrobacterias diluidas. Para este fin se sumergieron las hojas en suspensiones diluidas de *Agrobacterium* que albergaban las siguientes construcciones: pNMD570 (TMV(fsMP)-GFP sin capacidad de movimiento célula a célula), pNMD560 (TMV(MP)-GFP con capacidad de movimiento célula a célula), pNMD580 (TMV(MP)-DsRED con capacidad de movimiento célula a célula), pNMD620 (PVX(ΔCP)-GFP sin capacidad de movimiento célula a célula, pNMD600 (PVX(CP)-GFP con capacidad de movimiento célula a célula y sistémico) y pNMD610 (PVX(CP)-DsRED con capacidad de movimiento célula a célula y sistémico). Después de la transfección, estos vectores formaban puntos fluorescentes que se diferenciaban en color y tamaño (Fig. 24). Los inventores llevaron a cabo la transfección por inmersión de cada hoja ensayada con 3 cultivos diferentes y con intervalos de 7 días entre las transfecciones. Para cada una de las ocho combinaciones de vector ensayados todas las transfecciones con *Agrobacterium* eran satisfactorias, no se observó un efecto de silenciamiento particular (Fig. 24).

60 **Ejemplo 6: La pulverización con agrobacterias pueden suministrar replicones víricos capaces del movimiento célula a célula**

Los inventores demostraron que la pulverización de plantas de *Nicotiana benthamiana* con diluciones 1:100 y 1:1000 de suspensiones agrobacterianas proporciona el suministro eficaz de replicones víricos capaces del movimiento célula a célula, que abría como resultado la alta expresión de los genes de interés, comparale con la expresión que se alcanzaba utilizando la infiltración de agrobacterias. Esto se demostró para la GFP (Fig. 25), interferón alfa-a humano y klp27-mini-insulina (Fig. 26), y varias celulatas incluyendo la exocelulasa E3 de *Thermobifida fusca*, exoglucanasa 1 (CBH I) de *Trichoderma reesei*, β -glucosidasa BLG4 de *Humicola grisea* y la exocelulasa E3 de

Thermobifida fusca (Fig. 27).

Ejemplo 7: Las agrobacterias se pueden utilizar para suministrar factores de transcripción como mensajeros secundarios

5 Los inventores demostraron la inducción de biosíntesis de antocianina en hojas de *Nicotiana tabacum* infiltradas con suspensión agrobacteriana que alberga un vector vírico basado en PVX que proporciona la expresión de MYB antocianina 1 (ANT1) de *Lycopersicon esculentum* (Fig. 28).

10 **Ejemplo 8: Las agrobacterias se pueden utilizar para suministrar ARNi como mensajero secundario**

Los inventores han demostrado el fotoblanqueamiento de hojas de *Nicotiana benthamiana* producido por el silenciamiento del gen de la fiteno desaturasa (PDS) después de la pulverización de las hojas con una suspensión agrobacteriana que albergan el vector vírico basado en PVX que contenía el fragmento de la secuencia codificante de PDS en orientación anti-sentido (Fig. 37). Para generar esta construcción (pNMD050), se insertó un fragmento de 298-624 pb del ADNc de fiteno desaturasa (PDS) de *Nicotiana benthamiana* (EU165355) en el vector de clonación pNMD640 en una orientación anti-sentido utilizando los sitios Bsal.

15 **Ejemplo 9: Las agrobacterias se pueden utilizar para suministrar MAMP (Patrones Moleculares Asociados a Microbios) como mensajeros secundarios**

20 Los inventores demostraron la reducción de número de lesiones necróticas producidas por la infección por *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* en hojas de *Nicotiana benthamiana* después de la pulverización preliminar de plantas con la suspensión agrobacteriana que albergaba el vector basado en PVX que proporciona la expresión del gen de flagelina de *Pseudomonas* (pNMD1953) (Fig. 38). Para crear el plásmido pNMD1953, se sustituyó la secuencia codificante de GFP en la construcción pNMD630 con la secuencia que comprende el fragmento que codifica el péptido de señal del apoplasto del gen de la alfa-amilasa (AMY3) de la cebada (*Hordeum vulgare*) (FN179391) fusionado en fase con la secuencia que codifica la flagelina de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (YP236536). Se inocularon cuatro plantas de *Nicotiana benthamiana* con diluciones 1:1000 de *Agrobacterium* (DO₆₀₀ = 1,3) por pulverización. A los 6 dpi de los cultivos de *Agrobacterium*, todas las plantas se inocularon con *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728 a 1 x 10⁵ ufc/ml por pulverización. A los 7 dpi de las *Pseudomonas*, se valoraron los síntomas de la enfermedad por recuento de los puntos necróticos en dos hojas de cada planta. El número de puntos necróticos producidos por la infección de *Pseudomonas* por hoja se presenta como la media de cada 2 hojas de las 4 plantas.

25 35 La lista de secuencias posterior contiene las siguientes secuencias de nucleótidos:

40 SEQ ID NO: 1: Región TNA de la región de T-ADN de pNMD280
 SEQ ID NO: 2: Región TNA de la región de T-ADN de pNMD033
 SEQ ID NO: 3: Región TNA de la región de T-ADN de pNMD035
 SEQ ID NO: 4: Región TNA de la región de T-ADN de pNMD661
 SEQ ID NO: 5: Región TNA de la región de T-ADN de pNMD670
 SEQ ID NO: 6: Región TNA de la región de T-ADN de pNMD694
 SEQ ID NO: 7: Región TNA de la región de T-ADN de pNMD1971
 SEQ ID NO: 8: Región TNA de la región de T-ADN de pNMD2210
 SEQ ID NO: 9: Región TNA de la región de T-ADN de pNMD050
 SEQ ID NO: 10: Región TNA de la región de T-ADN de pNMD1953

Referencias

50 1. Andrews, L. B. & Curtis, W. R. (2005). Comparison of transient protein expression in tobacco leaves and plant suspension culture. *Biotechnol Prog* 21, 946-52.
 2. Arguelles-Arias, A., Ongena, M., Halimi, B., Lara, Y., Brans, A., Joris, B. & Fickers, P. (2009). *Bacillus amyloliq-uefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. *Microb Cell Fact* 8, 63.
 55 3. Azhakanandam, K., Weissinger, S. M., Nicholson, J. S., Qu, R. & Weissinger, A. K. (2007). Amplicon-plus targeting technology (APTT) for rapid production of a highly unstable vaccine protein in tobacco plants. *Plant Mol Biol* 63, 393-404.
 4. Barton, K. A., Binns, A. N., Matzke, A. J. & Chilton, M. D. (1983). Regeneration of intact tobacco plants containing full length copies of genetically engineered T-DNA, and transmission of T-DNA to R1 progeny. *Cell* 32, 1033-43.
 60 5. Baum, J. A., Bogaert, T., Clinton, W., Heck, G. R., Feldmann, P., Ilagan, O., Johnson, S., Plaetinck, G., Munyikwa, T., Pleau, M., Vaughn, T. & Roberts, J. (2007). Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nat Biotechnol* 25, 1322-6.
 65 6. Bergey, D. R., Howe, G. A. & Ryan, C. A. (1996). Polypeptide signaling for plant defensive genes exhibits analogies to defense signaling in animals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 12053-8.

7. Broothaerts, W., Mitchell, H. J., Weir, B., Kaines, S., Smith, L. M., Yang, W., Mayer, J. E., Roa-Rodriguez, C. & Jefferson, R. A. (2005). Gene transfer to plants by diverse species of bacteria. *Nature* 433, 629-33.

8. Chuang, C. F. & Meyerowitz, E. M. (2000). Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 4985-90.

5 9. Chung, M. H., Chen, M. K. & Pan, S. M. (2000). Floral spray transformation can efficiently generate *Arabidopsis* transgenic plants. *Transgenic Res* 9, 471-6.

10 10. Clough, S. J. & Bent, A. F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16, 735-43.

15 11. Corbesier, L., Vincent, C., Jang, S., Fornara, F., Fan, Q., Searle, I., Giakountis, A., Farrona, S., Gissot, L., Turnbull, C. & Coupland, G. (2007). FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science* 316, 1030-3.

16 12. D'Aoust, M. A., Lavoie, P. O., Belles-Isles, J., Bechtold, N., Martel, M. & Vezina, L. P. (2009). Transient expression of antibodies in plants using syringe agroinfiltration. *Methods Mol Biol* 483, 41-50.

17 13. D'Aoust, M. A., Lavoie, P. O., Couture, M. M., Trepanier, S., Guay, J. M., Dargis, M., Mongrand, S., Landry, N., Ward, B. J. & Vezina, L. P. (2008). Influenza virus-like particles produced by transient expression in *Nicotiana benthamiana* induce a protective immune response against a lethal viral challenge in mice. *Plant Biotechnol J* 6, 930-40.

18 14. De Buck, S., De Wilde, C., Van Montagu, M. & Depicker, A. (2000). Determination of the T-DNA transfer and the T-DNA integration frequencies upon cocultivation of *Arabidopsis thaliana* root explants. *Mol Plant Microbe Interact* 13, 658-65.

19 15. De Buck, S., Jacobs, A., Van Montagu, M. & Depicker, A. (1998). *Agrobacterium tumefaciens* transformation and cotransformation frequencies of *Arabidopsis thaliana* root explants and tobacco protoplasts. *Mol Plant Microbe Interact* 11, 449-57.

20 16. de Felippe, F. F. & Weigel, D. (2010). Transient assays for the analysis of miRNA processing and function. *Methods Mol Biol* 592, 255-64.

21 17. Deluc, L., Bogs, J., Walker, A. R., Ferrier, T., Decendit, A., Merillon, J. M., Robinson, S. P. & Barrieu, F. (2008). The transcription factor VvMYB5b contributes to the regulation of anthocyanin and proanthocyanidin biosynthesis in developing grape berries. *Plant Physiol* 147, 2041-53.

22 18. Escobar, M. A., Civerolo, E. L., Summerfelt, K. R. & Dandekar, A. M. (2001). RNAi-mediated oncogene silencing confers resistance to crown gall tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 13437-42.

23 19. Fraley, R. T., Rogers, S. G., Horsch, R. B., Sanders, P. R., Flick, J. S., Adams, S. P., Bittner, M. L., Brand, L. A., Fink, C. L., Fry, J. S., Galluppi, G. R., Goldberg, S. B., Hoffmann, N. L. & Woo, S. C. (1983). Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 4803-7.

24 20. Giritch, A., Marillonnet, S., Engler, C., van Eldik, G., Botterman, J., Klimyuk, V. & Gleba, Y. (2006). Rapid high-yield expression of full-size IgG antibodies in plants coinfecting with noncompeting viral vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 14701-6.

25 21. Gleba, Y., Klimyuk, V. & Marillonnet, S. (2007). Viral vectors for the expression of proteins in plants. *Curr Opin Biotechnol* 18, 134-41.

26 22. Gleba, Y., Marillonnet, S. & Klimyuk, V. (2004). Engineering viral expression vectors for plants: the 'full virus' and the 'deconstructed virus' strategies. *Curr Opin Plant Biol* 7, 182-8.

27 23. Gleba, Y., Marillonnet, S. & Klimyuk, V. (2008). Plant virus vectors (gene expression systems). In *Encyclopedia of Virology*, tercera Edición. M.H.V. van Regenmortel, Mahy, B.W.J., eds. (San Diego, CA: Elsevier Academic Press), vol. 4, pp. 229-237.

28 24. Green, B. J., Fujiki, M., Mett, V., Kaczmarczyk, J., Shamloul, M., Musiychuk, K., Underkoffler, S., Yusibov, V. & Mett, V. (2009). Transient protein expression in three *Pisum sativum* (green pea) varieties. *Biotechnol J* 4, 230-7.

29 25. Grimsley, N., Hohn, B., Hohn, T. & Walden, R. (1986). "Agroinfection," an alternative route for viral infection of plants by using the Ti plasmid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 3282-3286.

30 26. Huang, G., Allen, R., Davis, E. L., Baum, T. J. & Hussey, R. S. (2006). Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 14302-6.

31 27. Huang, Z., Santi, L., LePore, K., Kilbourne, J., Arntzen, C. J. & Mason, H. S. (2006). Rapid, high-level production of hepatitis B core antigen in plant leaf and its immunogenicity in mice. *Vaccine* 24, 2506-13.

32 28. Joh, L. D., McDonald, K. A. & VanderGheynst, J. S. (2006). Evaluating extraction and storage of a recombinant protein produced in agroinfiltrated lettuce. *Biotechnol Prog* 22, 723-30.

33 29. Joh, L. D., Wroblewski, T., Ewing, N. N. & VanderGheynst, J. S. (2005). High-level transient expression of recombinant protein in lettuce. *Biotechnol Bioeng* 91, 861-71.

34 30. Johnson, K. B. (2009). Optimization of Biocontrol of Plant Diseases. *Annu Rev Phytopathol*.

35 31. Jones, H. D., Doherty, A. & Sparks, C. A. (2009). Transient transformation of plants. *Methods Mol Biol* 513, 131-52.

36 32. Kerr, A. & Tate, M. E. (1984). Agrocins and the biological control of crown gall. *Microbiol Sci* 1, 1-4.

37 33. Kim, J. G., Park, B. K., Kim, S. U., Choi, D., Nahm, B. H., Moon, J. S., Reader, J. S., Farrand, S. K. & Hwang, I. (2006). Bases of biocontrol: sequence predicts synthesis and mode of action of agrocin 84, the Trojan horse antibiotic that controls crown gall. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 8846-51.

38 34. Lee, J. J., Woodward, A. W. & Chen, Z. J. (2007). Gene expression changes and early events in cotton fibre development. *Ann Bot* 100, 1391-401.

35. Lee, M. W. & Yang, Y. (2006). Transient expression assay by agroinfiltration of leaves. *Methods Mol Biol* 323, 225-9.

5 36. Li, J. F., Park, E., von Arnim, A. G. & Nebenfuhr, A. (2009). The FAST technique: a simplified *Agrobacterium*-based transformation method for transient gene expression analysis in seedlings of *Arabidopsis* and other plant species. *Plant Methods* 5, 6.

10 37. Li, X. Q., Liu, C. N., Ritchie, S. W., Peng, J. Y., Gelvin, S. B. & Hodges, T. K. (1992). Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transient expression of gusA in rice. *Plant Mol Biol* 20, 1037-48.

15 38. Lico, C., Chen, Q. & Santi, L. (2008). Viral vectors for production of recombinant proteins in plants. *J Cell Physiol* 216, 366-77.

20 39. Lindbo, J. A. (2007). TRBO: a high-efficiency tobacco mosaic virus RNA-based overexpression vector. *Plant Physiol* 145, 1232-40.

25 40. Lindbo, J. A. (2007). High-efficiency protein expression in plants from agroinfection-compatible Tobacco mosaic virus expression vectors. *BMC Biotechnol* 7, 52.

30 41. Liu, C. N., Li, X. Q. & Gelvin, S. B. (1992). Multiple copies of virG enhance the transient transformation of celery, carrot and rice tissues by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol Biol* 20, 1071-87.

35 42. Marillonnet, S., Giritch, A., Gils, M., Kandzia, R., Klimyuk, V. & Gleba, Y. (2004). In planta engineering of viral RNA replicons: efficient assembly by recombination of DNA modules delivered by *Agrobacterium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 6852-7.

40 43. Marillonnet, S., Thoeringer, C., Kandzia, R., Klimyuk, V. & Gleba, Y. (2005). Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. *Nat Biotechnol* 23, 718-23.

45 44. Martinez-Garcia, J. F., Virgos-Soler, A. & Prat, S. (2002). Control of photoperiod-regulated tuberization in potato by the *Arabidopsis* flowering-time gene CONSTANS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 15211-6.

50 45. Mett, V., Lyons, J., Musiychuk, K., Chichester, J. A., Brasil, T., Couch, R., Sherwood, R., Palmer, G. A., Streatfield, S. J. & Yusibov, V. (2007). A plant-produced plague vaccine candidate confers protection to monkeys. *Vaccine* 25, 3014-7.

55 46. Moore, L. W. (1988). Use of *Agrobacterium radiobacter* in agricultural ecosystems. *Microbiol Sci* 5, 92-5.

60 47. Nam, M. H., Park, M. S., Kim, H. G. & Yoo, S. J. (2009). Biological control of strawberry Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* using *Bacillus velezensis* BS87 and RK1 formulation. *J Microbiol Biotechnol* 19, 520-4.

65 48. Pandolfini, T., Rotino, G. L., Camerini, S., Defez, R. & Spena, A. (2002). Optimisation of transgene action at the post-transcriptional level: high quality parthenocarpic fruits in industrial tomatoes. *BMC Biotechnol* 2, 1.

70 49. Plesha, M. A., Huang, T. K., Dandekar, A. M., Falk, B. W. & McDonald, K. A. (2007). High-level transient production of a heterologous protein in plants by optimizing induction of a chemically inducible viral amplicon expression system. *Biotechnol Prog* 23, 1277-85.

75 50. Plesha, M. A., Huang, T. K., Dandekar, A. M., Falk, B. W. & McDonald, K. A. (2009). Optimization of the bioprocessing conditions for scale-up of transient production of a heterologous protein in plants using a chemically inducible viral amplicon expression system. *Biotechnol Prog* 25, 722-34.

80 51. Pooggin, M., Shivaprasad, P. V., Veluthambi, K. & Hohn, T. (2003). RNAi targeting of DNA virus in plants. *Nat Biotechnol* 21, 131-2.

85 52. Reader, J. S., Ordoukhalian, P. T., Kim, J. G., de Crecy-Lagard, V., Hwang, I., Farrand, S. & Schimmel, P. (2005). Major biocontrol of plant tumors targets tRNA synthetase. *Science* 309, 1533.

90 53. Regnard, G. L., Halley-Stott, R. P., Tanzer, F. L., Hitzeroth, II & Rybicki, E. P. (2010). High level protein expression in plants through the use of a novel autonomously replicating geminivirus shuttle vector. *Plant Biotechnol J* 8, 38-46.

95 54. Ryu, C. M., Anand, A., Kang, L. & Mysore, K. S. (2004). Agrodrench: a novel and effective agroinoculation method for virus-induced gene silencing in roots and diverse Solanaceous species. *Plant J* 40, 322-31.

100 55. Santi, L., Giritch, A., Roy, C. J., Marillonnet, S., Klimyuk, V., Gleba, Y., Webb, R., Arntzen, C. J. & Mason, H. S. (2006). Protection conferred by recombinant *Yersinia pestis* antigens produced by a rapid and highly scalable plant expression system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 861-6.

105 56. Shang, Y., Schwinn, K. E., Bennett, M. J., Hunter, D. A., Waugh, T. L., Pathirana, N. N., Brummell, D. A., Jameson, P. E. & Davies, K. M. (2007). Methods for transient assay of gene function in floral tissues. *Plant Methods* 3, 1.

110 57. Shibleth, Y. M., Arazi, T., Wang, Y. & Gal-On, A. (2001). A new approach for weed control in a cucurbit field employing an attenuated potyvirus-vector for herbicide resistance. *J Biotechnol* 92, 37-46.

115 58. Shoji, Y., Farrance, C. E., Bi, H., Shamloul, M., Green, B., Manceva, S., Rhee, A., Ugulava, N., Roy, G., Musiychuk, K., Chichester, J. A., Mett, V. & Yusibov, V. (2009). Immunogenicity of hemagglutinin from A/Bar-headed Goose/Qinghai/1A/05 and A/Anhui/1/05 strains of H5N1 influenza viruses produced in *Nicotiana benthamiana* plants. *Vaccine* 27, 3467-70.

120 59. Simmons, C. W., VanderGheynst, J. S. & Upadhyaya, S. K. (2009). A model of *Agrobacterium tumefaciens* vacuum infiltration into harvested leaf tissue and subsequent in planta transgene transient expression. *Biotechnol Bioeng* 102, 965-70.

125 60. Sudarshana, M. R., Plesha, M. A., Uratsu, S. L., Falk, B. W., Dandekar, A. M., Huang, T. K. & McDonald, K. A. (2006). A chemically inducible cucumber mosaic virus amplicon system for expression of heterologous proteins in plant tissues. *Plant Biotechnol J* 4, 551-9.

130 61. Turpen, T. H., Turpen, A. M., Weinzettl, N., Kumagai, M. H. & Dawson, W. O. (1993). Transfection of whole

plants from wounds inoculated with *Agrobacterium tumefaciens* containing cDNA of tobacco mosaic virus. *J Virol Methods* 42, 227-39.

5 62. Vaquero, C., Sack, M., Chandler, J., Drossard, J., Schuster, F., Monecke, M., Schillberg, S. & Fischer, R. (1999). Transient expression of a tumor-specific single-chain fragment and a chimeric antibody in tobacco leaves. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 11128-33.

10 63. Vezina, L. P., Faye, L., Lerouge, P., D'Aoust, M. A., Marquet-Blouin, E., Burel, C., Lavoie, P. O., Bardor, M. & Gomord, V. (2009). Transient co-expression for fast and high-yield production of antibodies with human-like N-glycans in plants. *Plant Biotechnol J* 7, 442-55.

15 64. Vicedo, B., Penalver, R., Asins, M. J. & Lopez, M. M. (1993). Biological Control of *Agrobacterium tumefaciens*, Colonization, and pAgK84 Transfer with *Agrobacterium radiobacter* K84 and the Tra Mutant Strain K1026. *Appl Environ Microbiol* 59, 309-315.

65. Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P. & Baulcombe, D. (2003). An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J* 33, 949-56.

15 66. Wroblewski, T., Tomczak, A. & Michelmore, R. (2005). Optimization of *Agrobacterium*-mediated transient assays of gene expression in lettuce, tomato and *Arabidopsis*. *Plant Biotechnol J* 3, 259-73.

67. Yang, L., Wang, H., Liu, J., Li, L., Fan, Y., Wang, X., Song, Y., Sun, S., Wang, L., Zhu, X. & Wang, X. (2008). A simple and effective system for foreign gene expression in plants via root absorption of agrobacterial suspension. *J Biotechnol* 134, 320-4.

20 68. Yang, Y., Li, R. & Qi, M. (2000). *In vivo* analysis of plant promoters and transcription factors by agroinfiltration of tobacco leaves. *Plant J* 22, 543-51.

69. Zambre, M., Terryn, N., De Clercq, J., De Buck, S., Dillen, W., Van Montagu, M., Van Der Straeten, D. & Angenon, G. (2003). Light strongly promotes gene transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plant cells. *Planta* 216, 580-6.

25 70. Zeevaart, J. A. (2008). Leaf-produced floral signals. *Curr Opin Plant Biol* 11, 541-7.

71. Zhang, C. & Ghahrial, S. A. (2006). Development of Bean pod mottle virus-based vectors for stable protein expression and sequence-specific virus-induced gene silencing in soybean. *Virology* 344, 401-11.

72. Zhao, M. M., An, D. R., Zhao, J., Huang, G. H., He, Z. H. & Chen, J. Y. (2006). Transiently expressed short hairpin RNA targeting 126 kDa protein of tobacco mosaic virus interferes with virus infection. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 38, 22-8.

30 **Anexo: Secuencias de regiones de T-ADN para las construcciones básicas utilizadas como vectores de clonación**

35 pNMD280 (Fig. 1)

pNMD033 (Fig. 1)

pNMD035 (Fig. 2)

pNMD661 (Fig. 3)

pNMD670 (Fig. 4)

pNMD694 (Fig. 5)

pNMD1971

pNMD2210

pNMD050

pNMD1953

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de generación o alteración de un rasgo en una planta, que comprende

5 (i) cultivar dicha planta hasta un estadio de crecimiento deseado;
 (ii) expresar, en dicha planta, una proteína o un ARN capaz de generar o alterar dicho rasgo, que comprende una transfección transitoria por pulverización de las partes aéreas de dicha planta con una suspensión acuosa que contiene células de una cepa de *Agrobacterium*, al menos un abrasivo suspendido en dicha suspensión, y, como adyuvante de pulverización agrícola, un tensioactivo no iónico con una concentración entre 0,25 y 5,0 g por litro de dicha suspensión.

10 comprendiendo dicha cepa de *Agrobacterium* una molécula de ADN que comprende una construcción de ácido nucleico que contiene una secuencia de ADN de interés, codificando dicha secuencia de ADN de interés dicha proteína o dicho ARN, y

15 siendo dicho abrasivo un material particulado que es esencialmente insoluble en la suspensión acuosa de células de *Agrobacterium*.

2. Un procedimiento de producción de una proteína de interés en una planta, que comprende

20 (i) cultivar dicha planta hasta un estado de crecimiento deseado;
 (ii) expresar, en dicha planta, dicha proteína de interés, que comprende la transfección transitoria por pulverización de las partes aéreas de dicha planta con una suspensión acuosa que contiene células de una cepa de *Agrobacterium*, al menos un abrasivo suspendido en dicha suspensión, y, como adyuvante de pulverización agrícola, un tensioactivo no iónico con una concentración entre 0,25 y 5,0 g por litro de dicha suspensión,

25 comprendiendo dicha cepa de *Agrobacterium* una molécula de ADN que comprende una construcción de ácido nucleico que contiene una secuencia de ADN de interés, codificando dicha secuencia de ADN de interés dicha proteína de interés, y

30 siendo dicho abrasivo un material particulado que es esencialmente insoluble en la suspensión acuosa de células de *Agrobacterium*.

3. Un procedimiento de protección de plantas de cultivo en un campo de una plaga, que comprende

35 (i) cultivar dichas plantas en el suelo de dicho campo;
 (ii) determinar, en un estado de crecimiento deseado de dichas plantas, la infestación de al menos una de dichas plantas por una plaga;
 (iii) expresar, en dichas plantas, una proteína o ARN que es perjudicial para la plaga determinada en la etapa previa, que comprende la transfección transitoria por pulverización de las partes aéreas de dichas plantas con una suspensión acuosa que contiene células de una cepa de *Agrobacterium*, al menos un abrasivo suspendido en dicha suspensión, y, un adyuvante de pulverización agrícola, un tensioactivo no iónico con una concentración de entre 0,25 y 5,0 por litro de dicha suspensión,

40 comprendiendo dicha cepa de *Agrobacterium* una molécula de ADN que comprende una construcción de ácido nucleico que contiene una secuencia de ADN de interés unida operativamente a un promotor, codificando dicha secuencia de ADN de interés dicha proteína o dicho ARN, y

45 siendo dicho abrasivo un material particulado que es esencialmente insoluble en la suspensión acuosa de células de *Agrobacterium*.

50 4. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde dicha suspensión acuosa contiene dichas células de dicha cepa de *Agrobacterium* con una concentración de como mucho $2,2 \times 10^7$, preferentemente como mucho $1,1 \times 10^7$, más preferentemente de como mucho $4,4 \times 10^6$, más preferentemente como mucho $1,1 \times 10^6$ ufc/ml de dicha suspensión.

55 5. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde dicho abrasivo es un vehículo inorgánico particulado para polvos humectables, tales como sílice o carborundo.

60 6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, donde dicha suspensión acuosa contiene dicho abrasivo en una cantidad de entre 0,02 y 2, preferentemente entre 0,05 y 1 y más preferentemente entre 0,1 y 0,5 % por peso de dicha suspensión.

65 7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, donde el tamaño medio de partícula del abrasivo añadido a la suspensión está entre 0,1 y 30, preferentemente entre 0,1 y 10, más preferentemente entre 0,5 y 10 y más preferentemente entre 0,5 y 5 μm .

8. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, donde el abrasivo tiene un valor D90 de como mucho 40 μm , preferentemente como mucho 30 μm ; y donde el abrasivo no contiene partículas que

tengan un tamaño por encima de 45 μm , preferentemente no mayor de 40 μm .

9. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde el adyuvante de pulverización es un tensioactivo de silicona orgánica.

5 10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, donde el tensioactivo de silicona orgánica es un heptametiltrisiloxano modificado con polialquilenóxido.

10 11. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde dicha construcción de ácido nucleico está flanqueada por una secuencia limítrofe de T-ADN en al menos un lado, que permite la transferencia de dicha construcción de ácido nucleico en las células de dicha planta.

15 12. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde dicha construcción de ácido nucleico codifica un vector vírico replicante que codifica dicha proteína de interés, siendo dicho vector vírico replicante incapaz de movimiento sistémico en dicha planta.

13. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde dicha secuencia de ADN está unida operativamente a un promotor activo en células vegetales.

20 14. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde dicho tensioactivo no iónico es un tensioactivo de silicona orgánica, y la concentración del tensioactivo de silicona orgánica en la suspensión agrobacteriana que se utiliza para la pulverización está entre 0,5 y 5,0 g por litro de dicha suspensión.

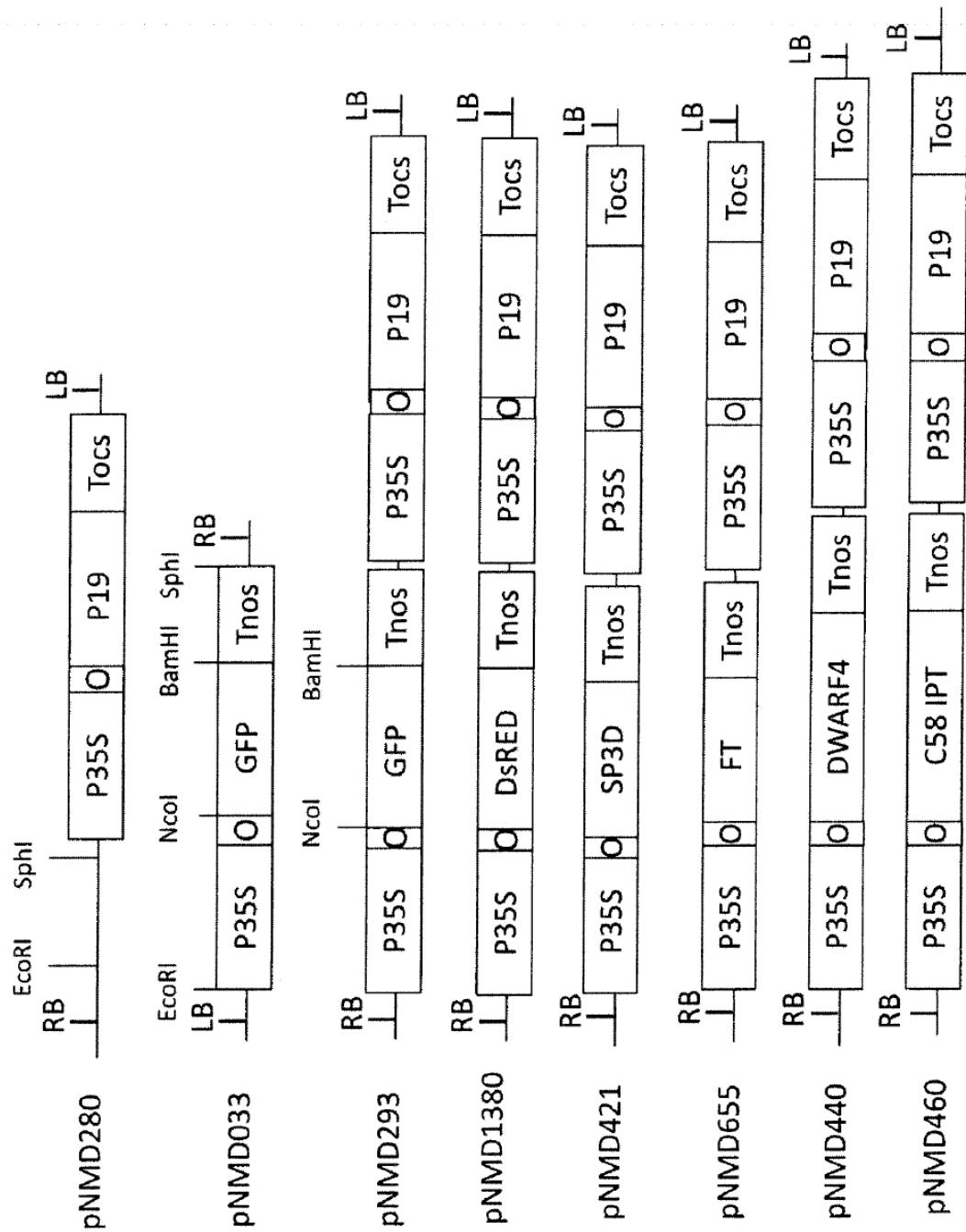


Fig. 1

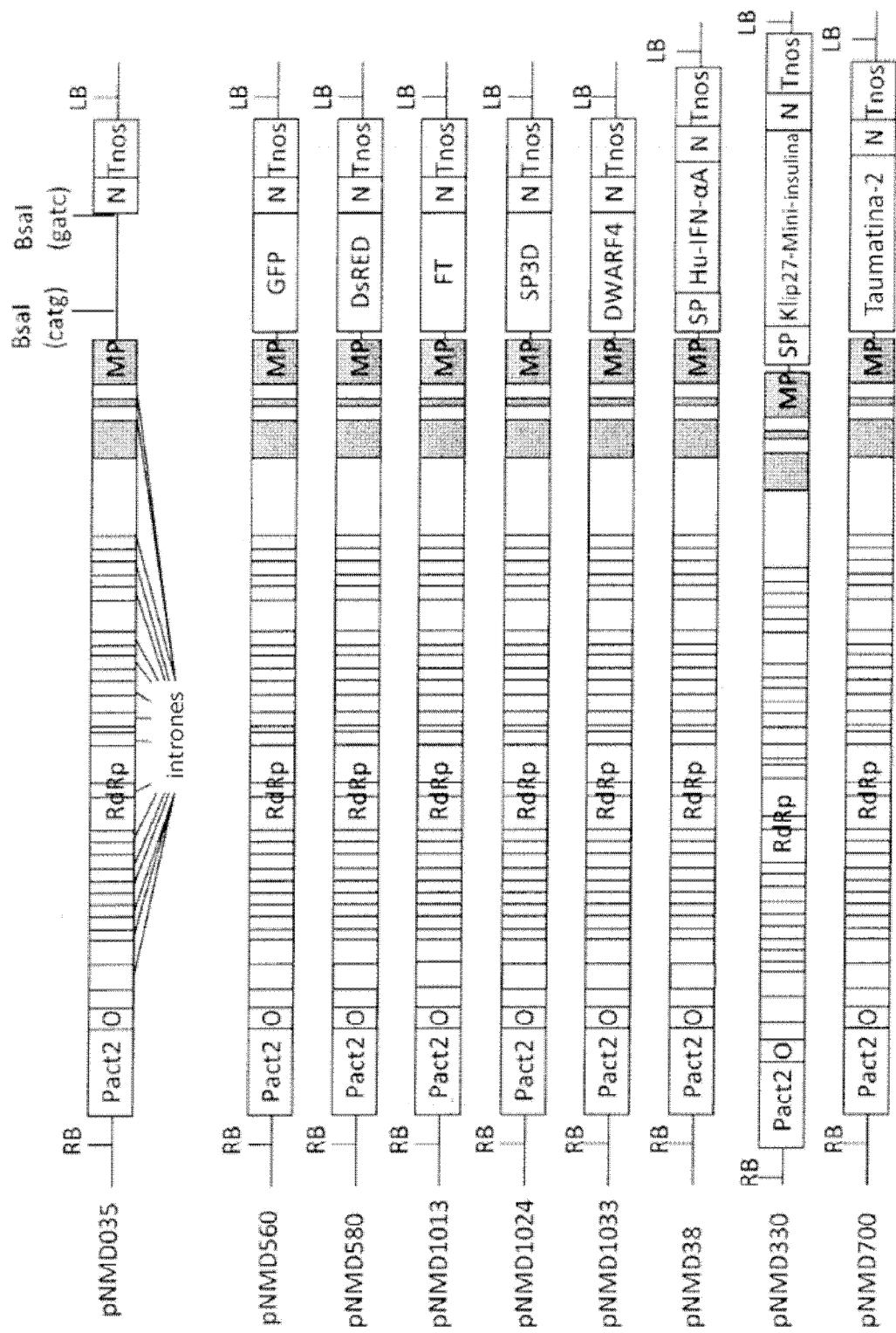


Fig. 2A

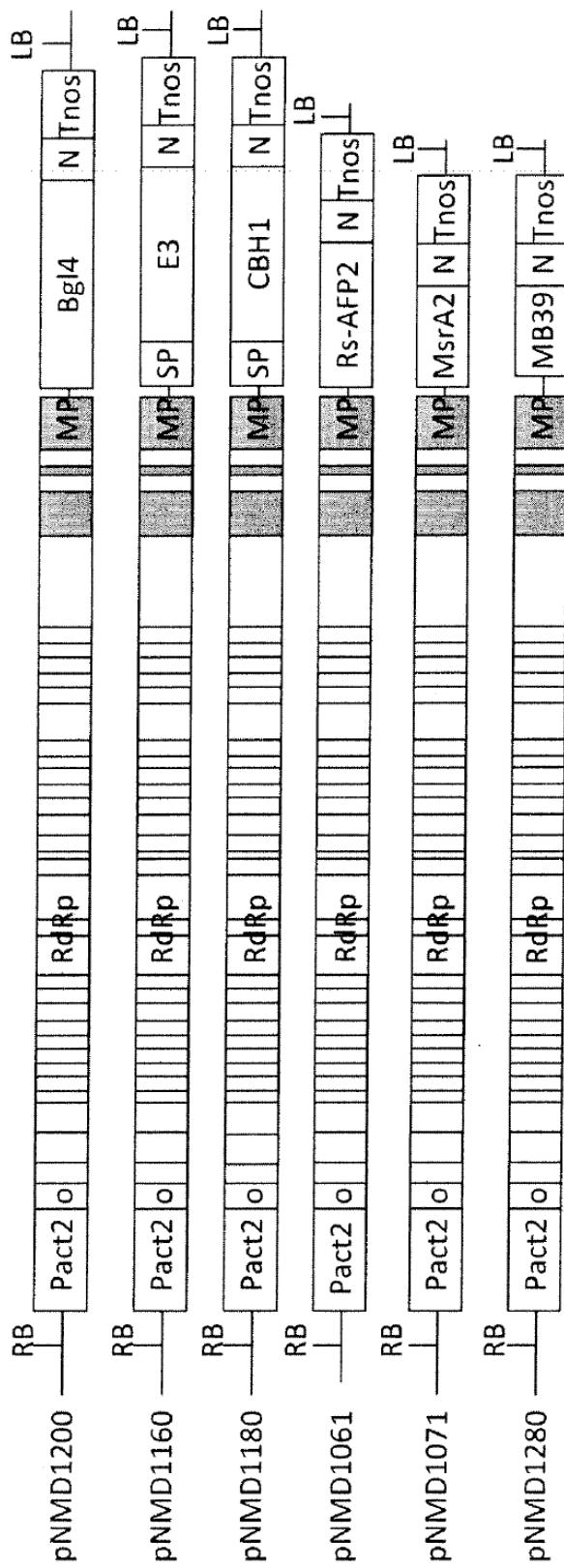
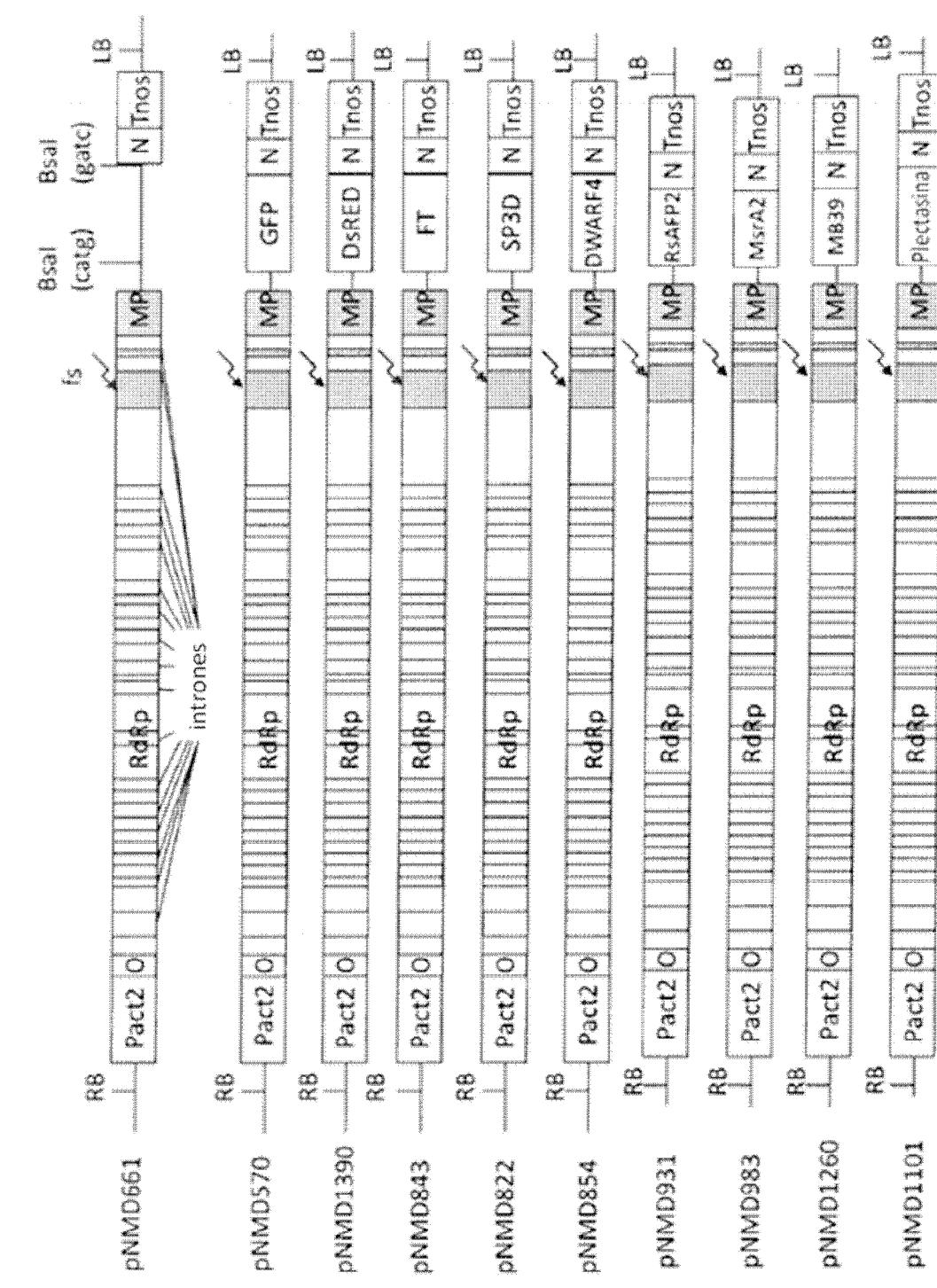


Fig. 2B



三
三
三

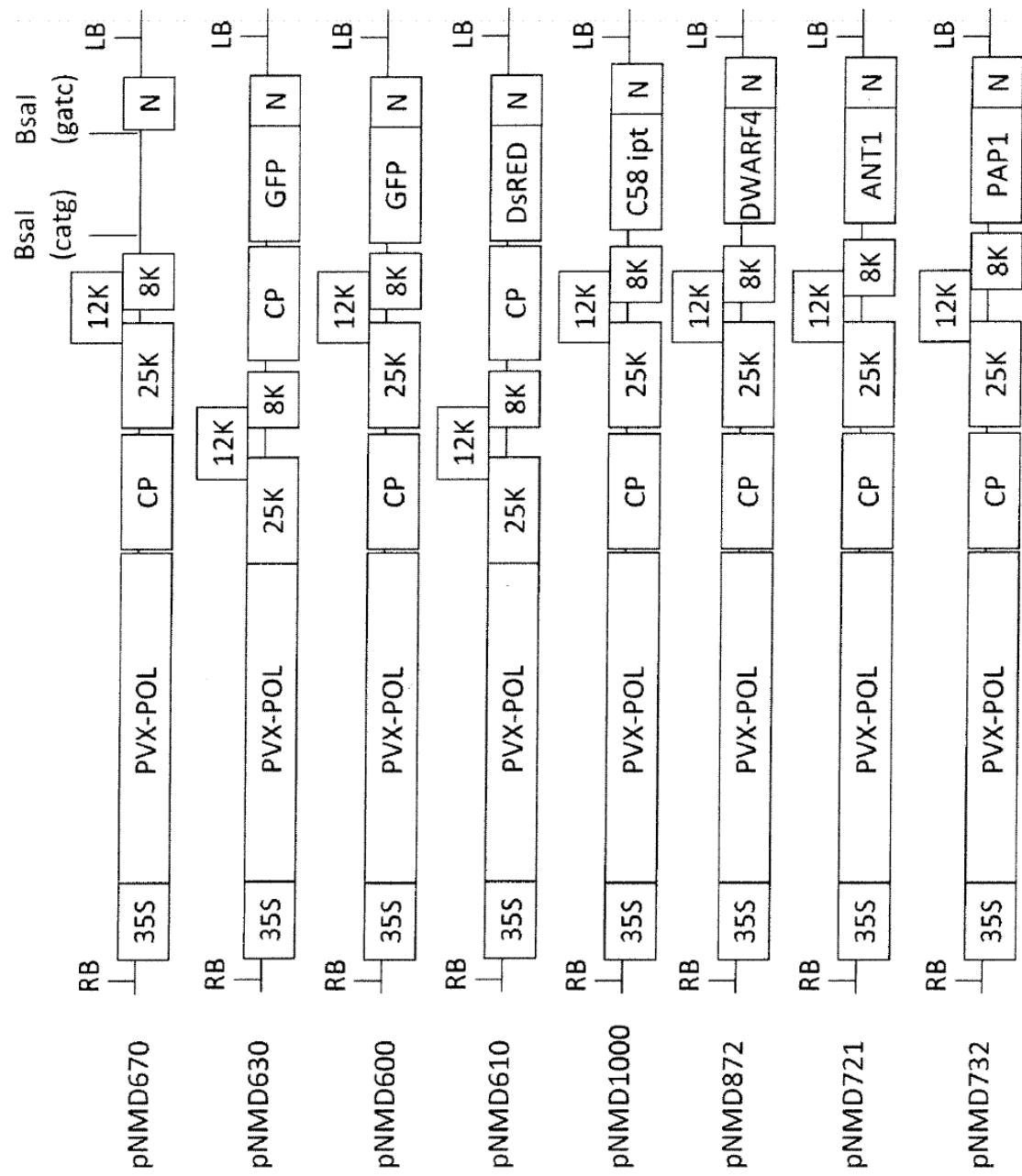


Fig. 4A

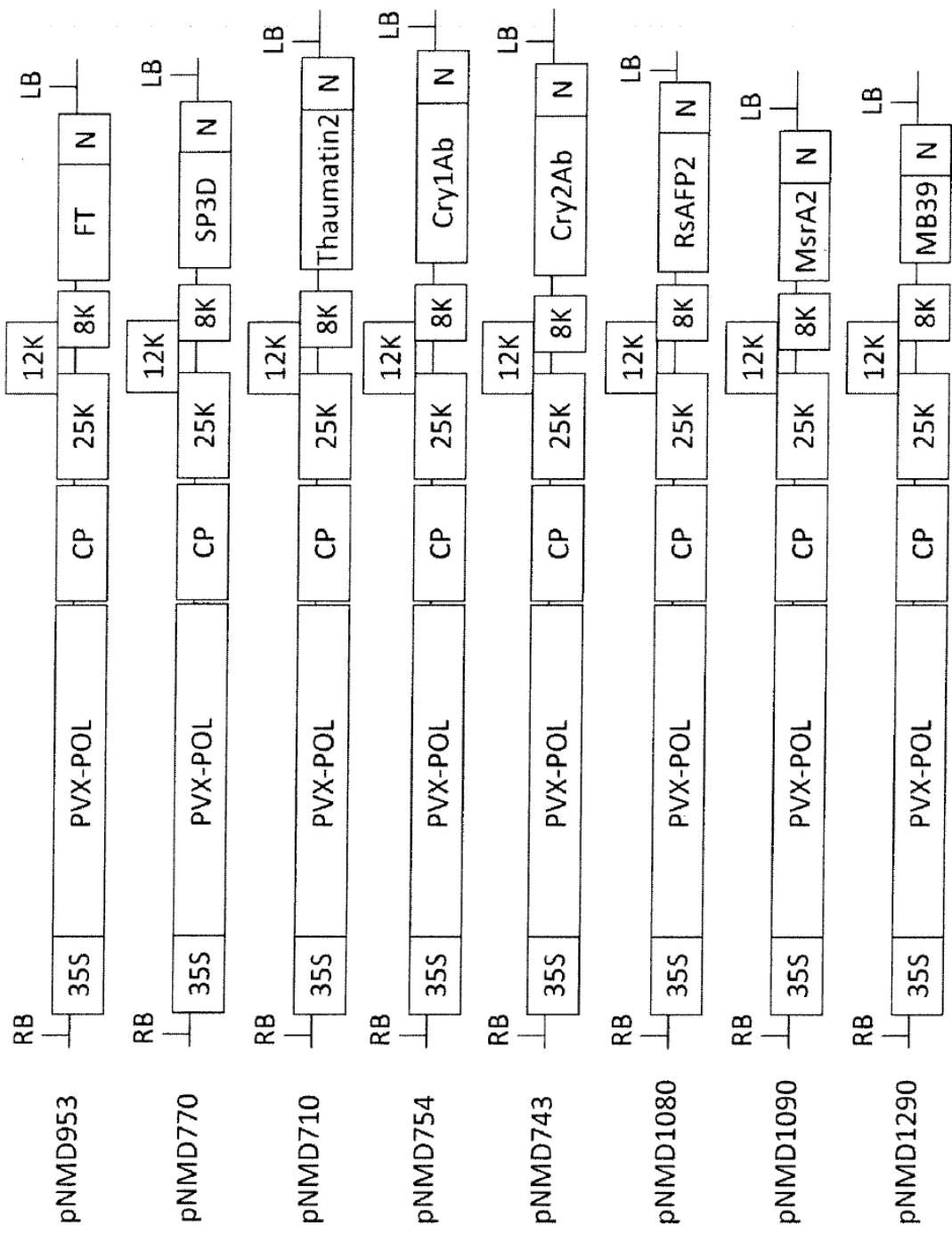


Fig. 4B

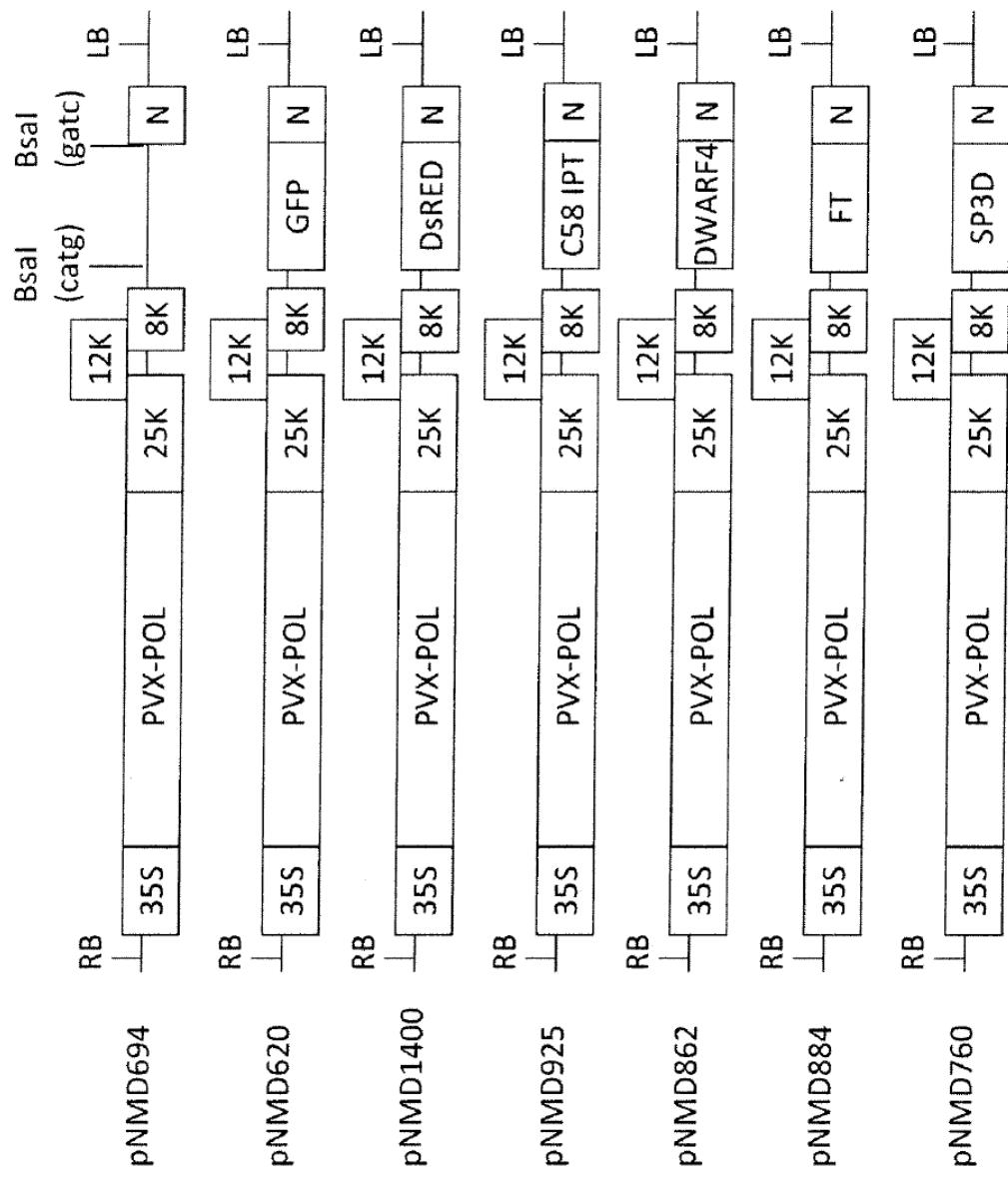


Fig. 5A

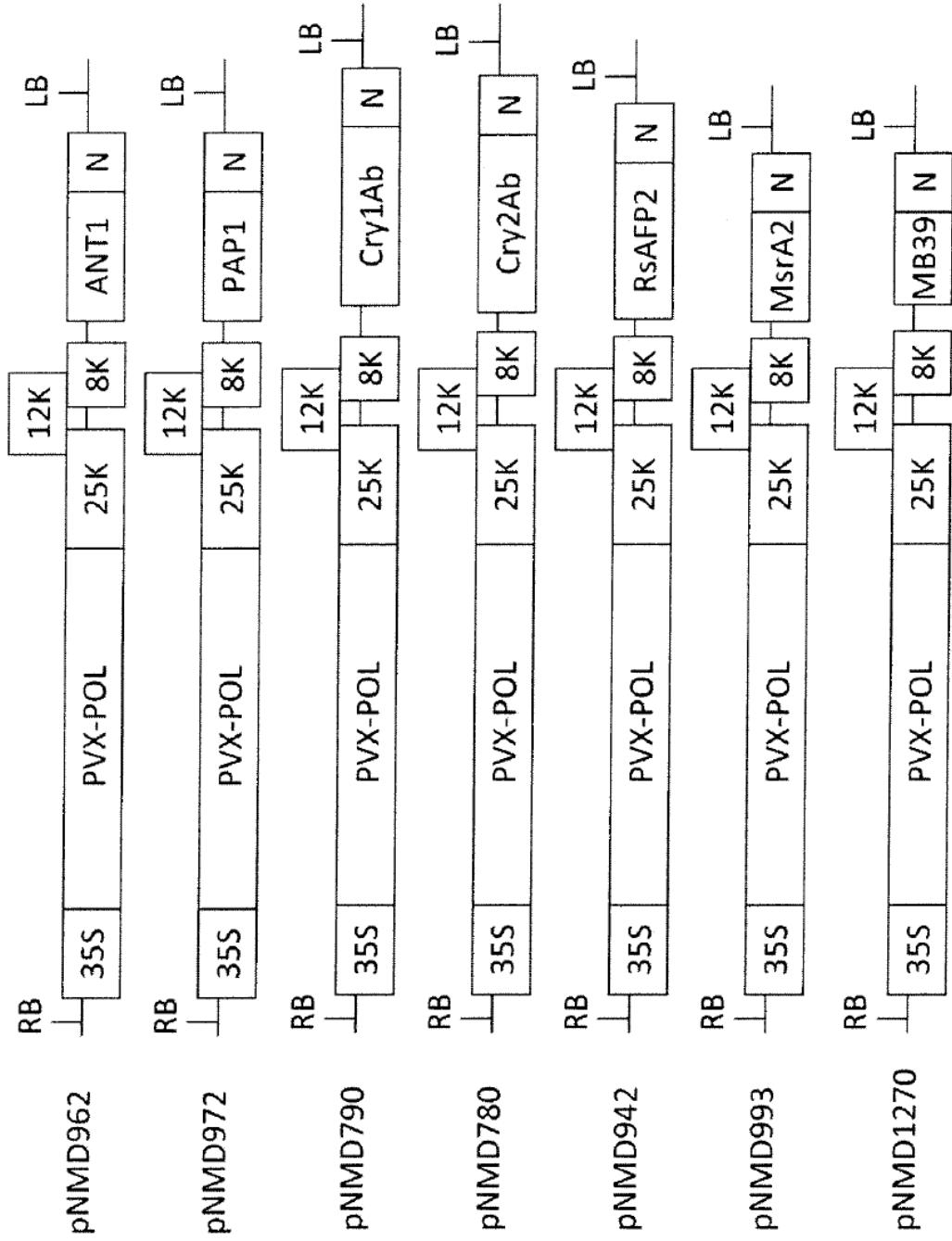


Fig. 5B

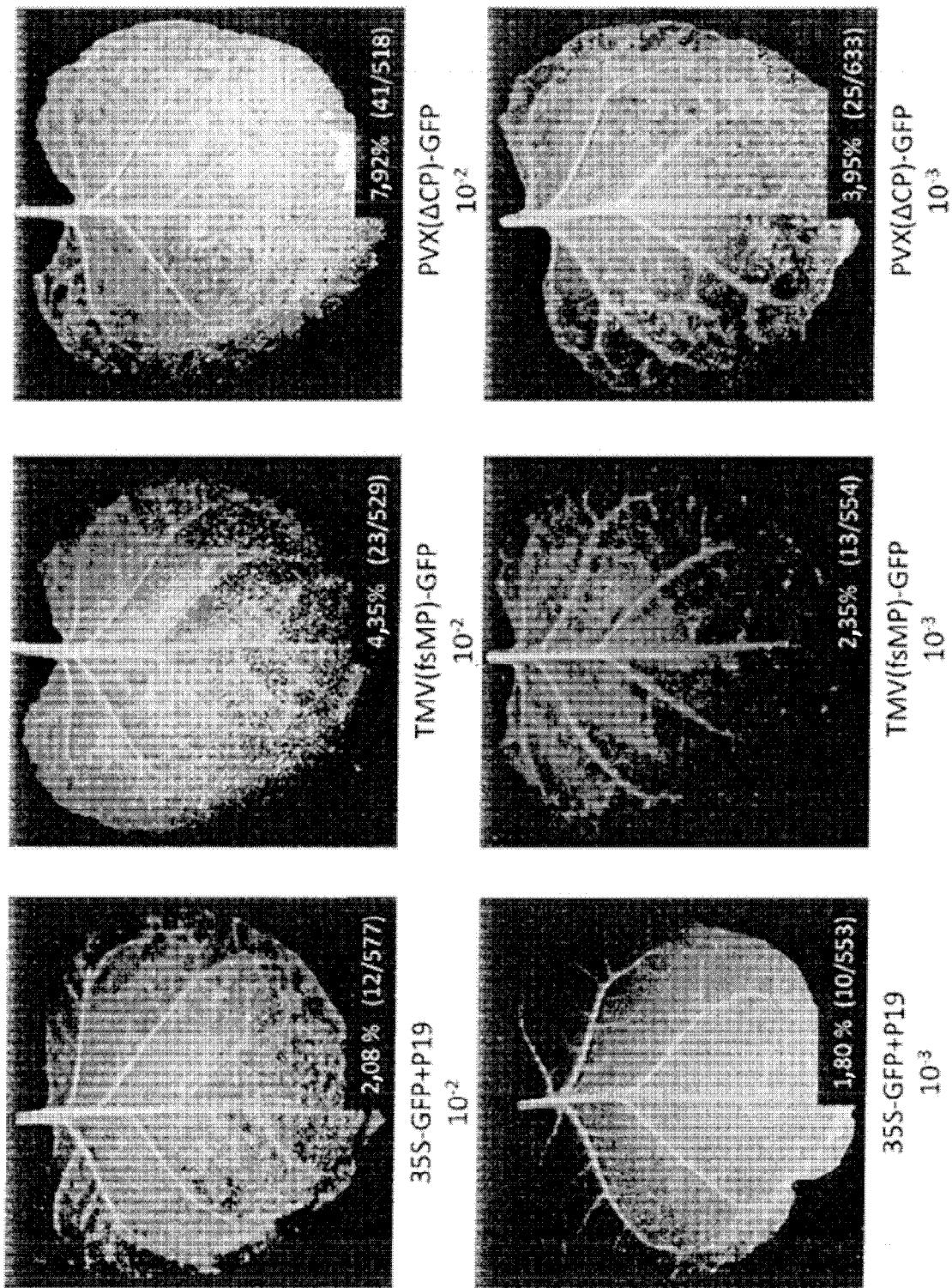
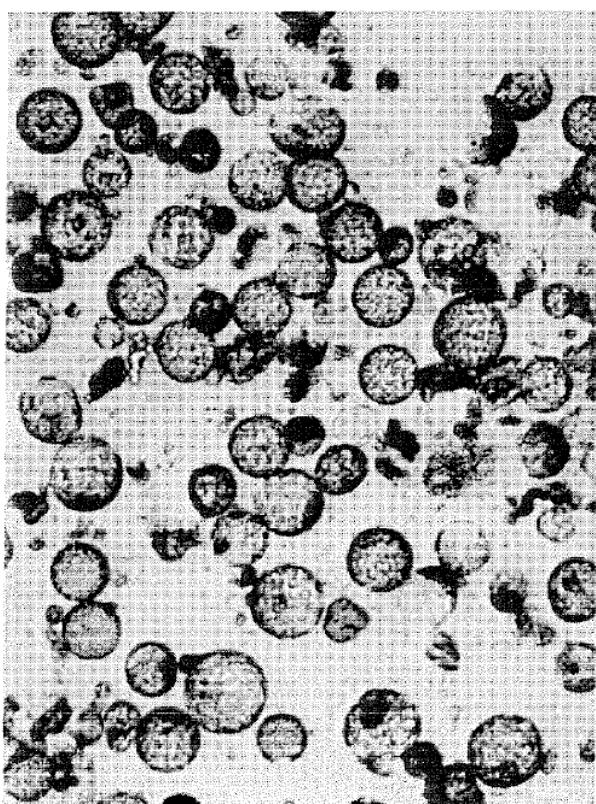
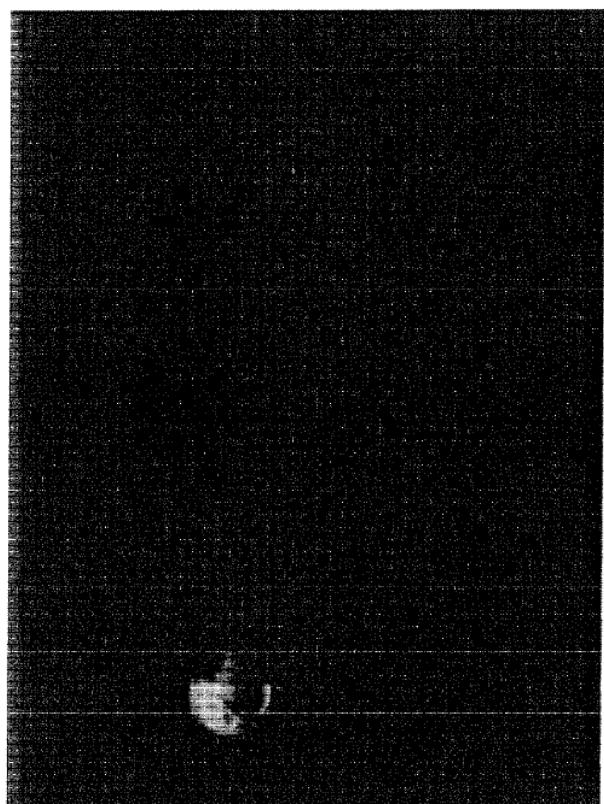


Fig. 6

Fig. 7



A



B

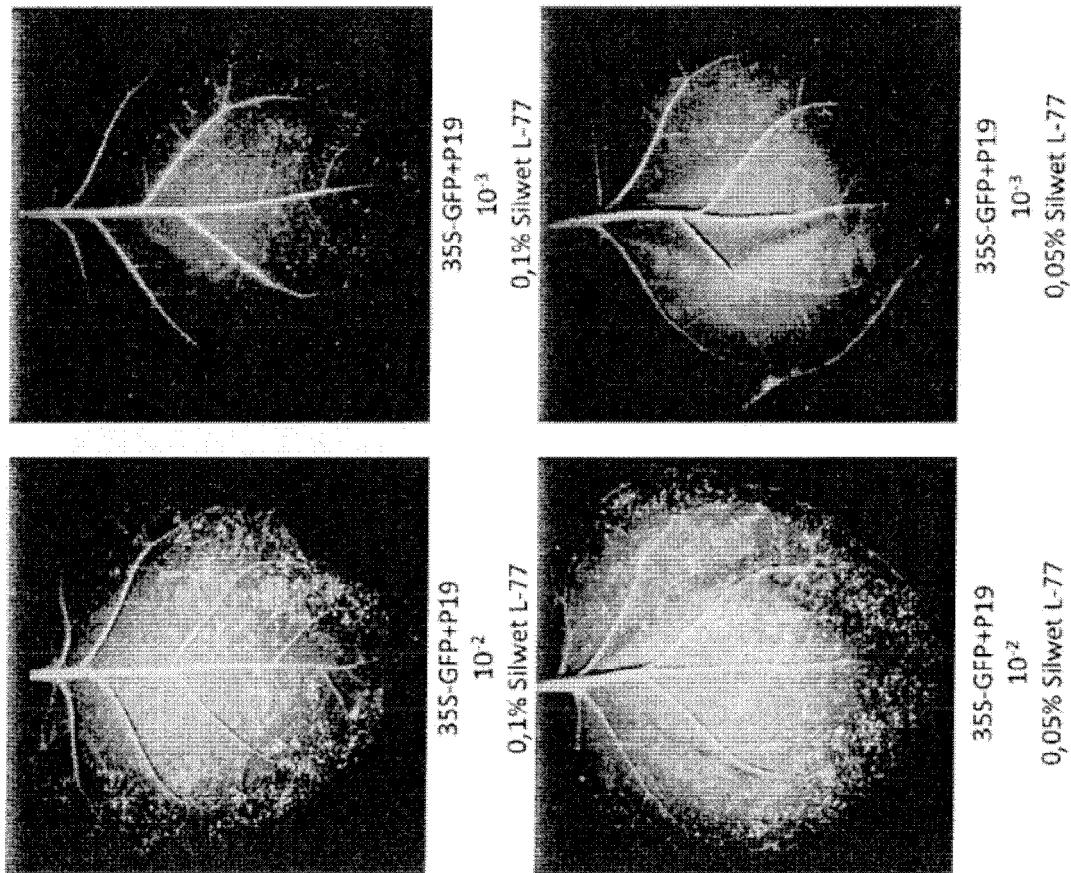


Fig. 8

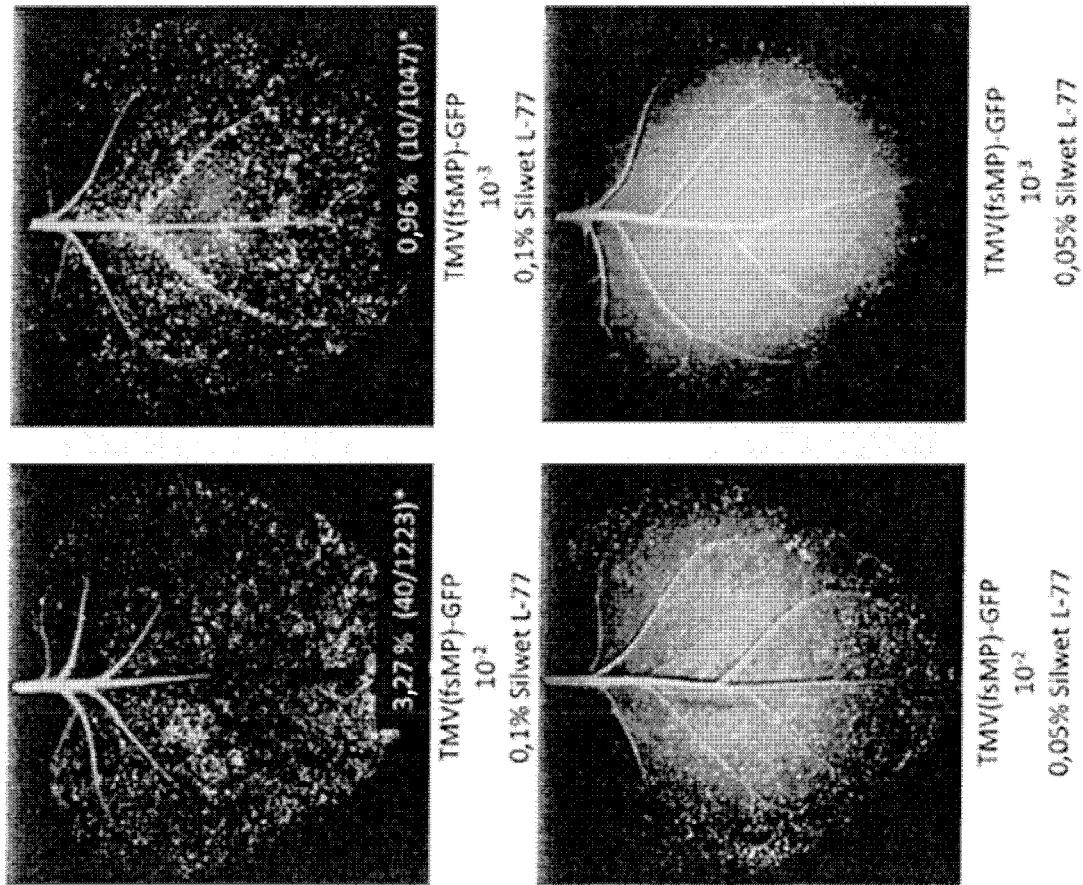


Fig. 9

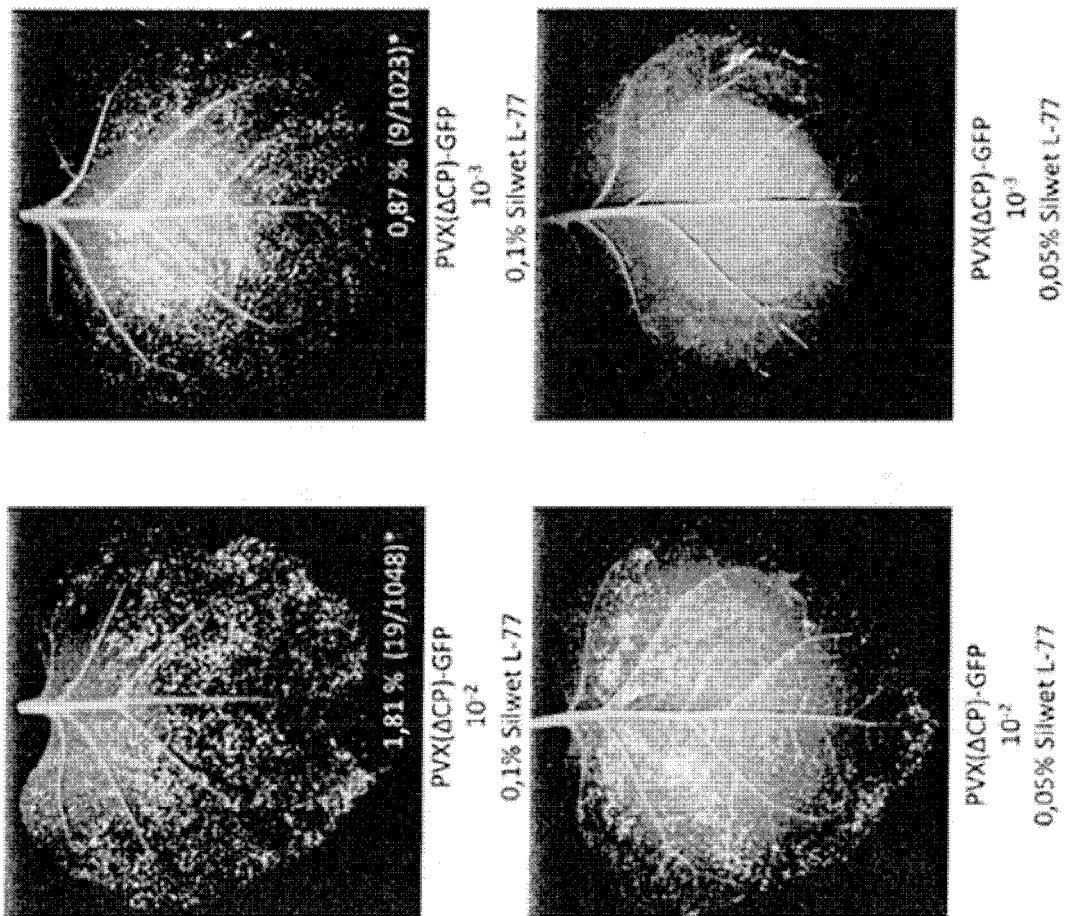


Fig. 10

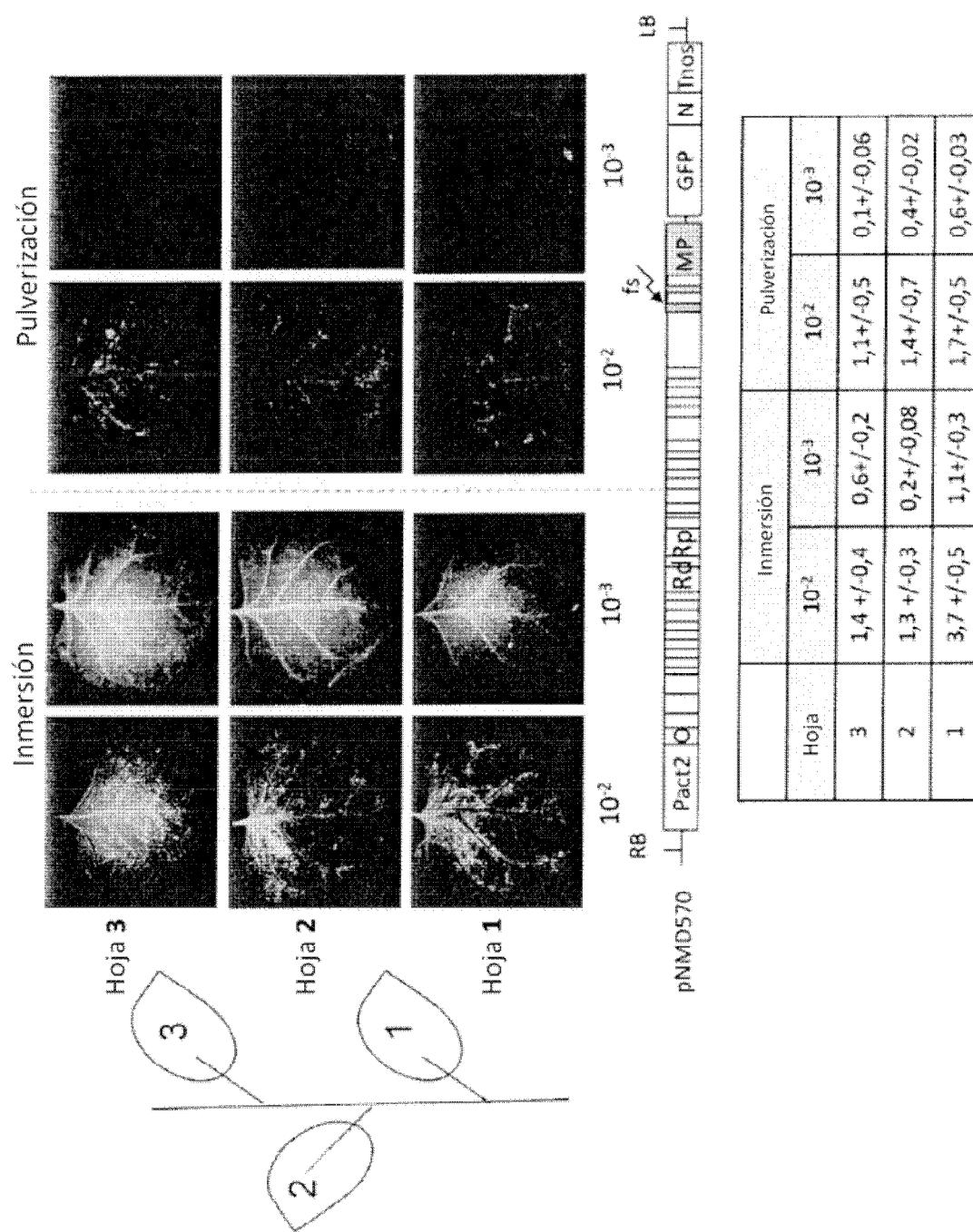


Fig. 11

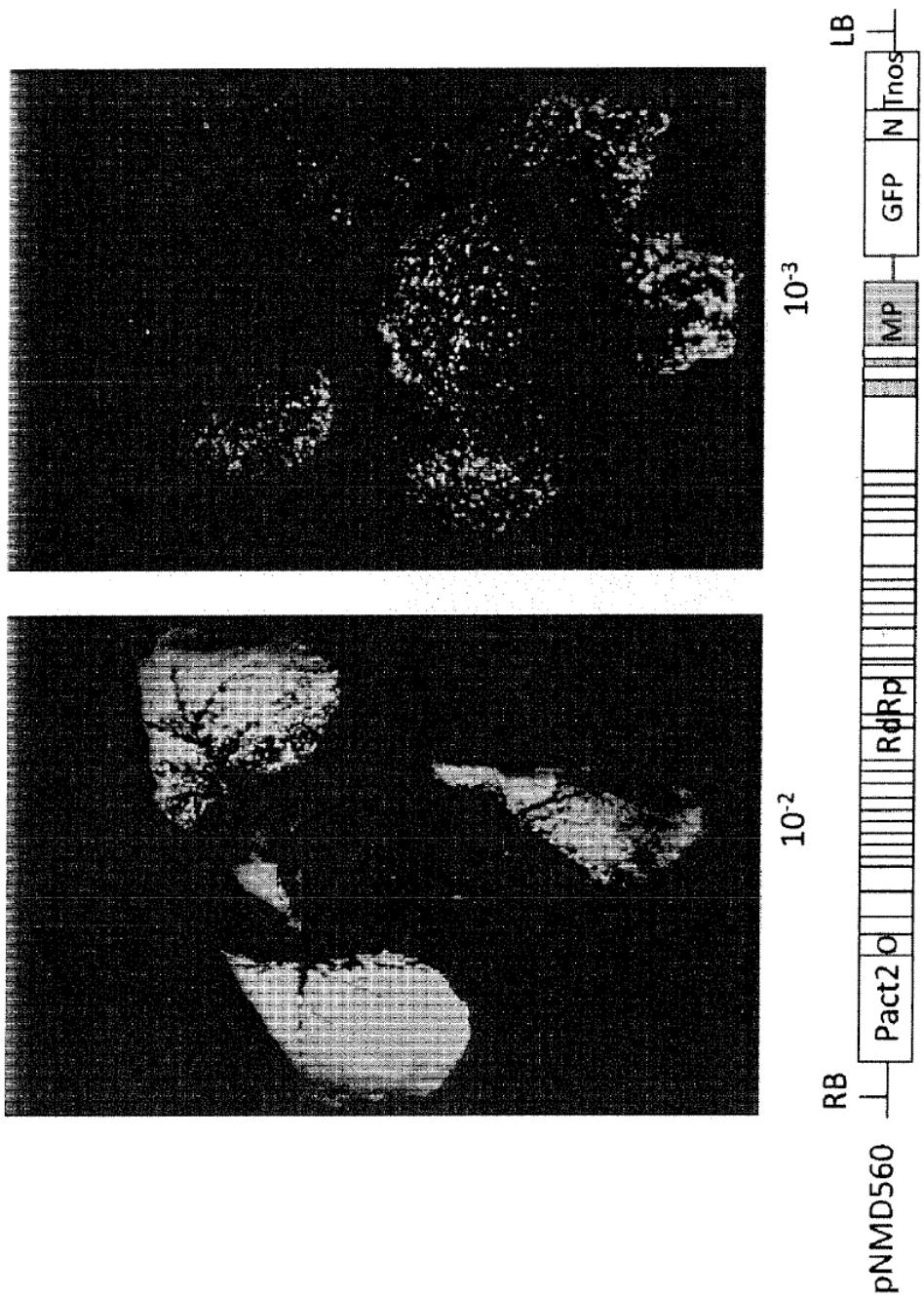


Fig. 12

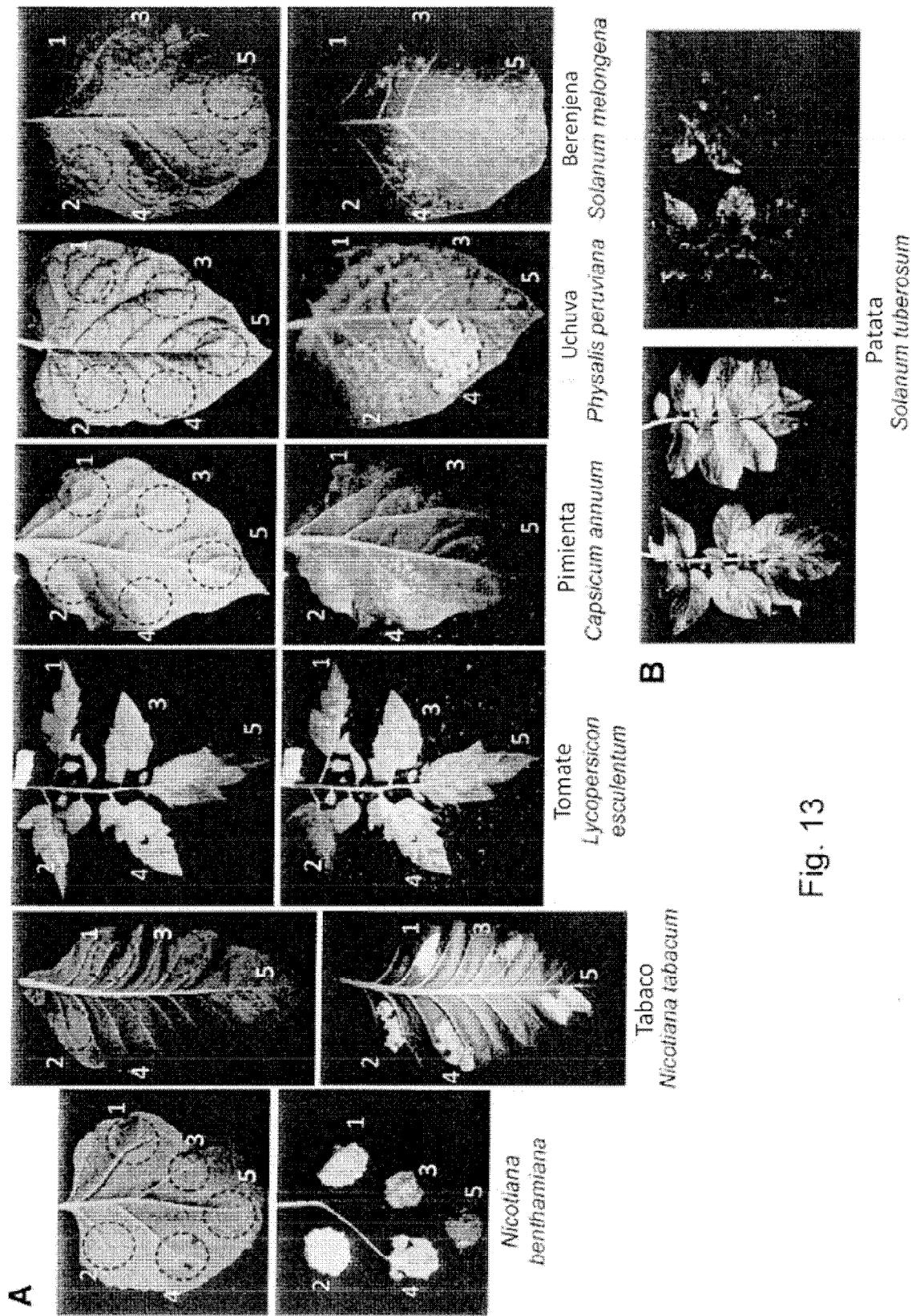


Fig. 13

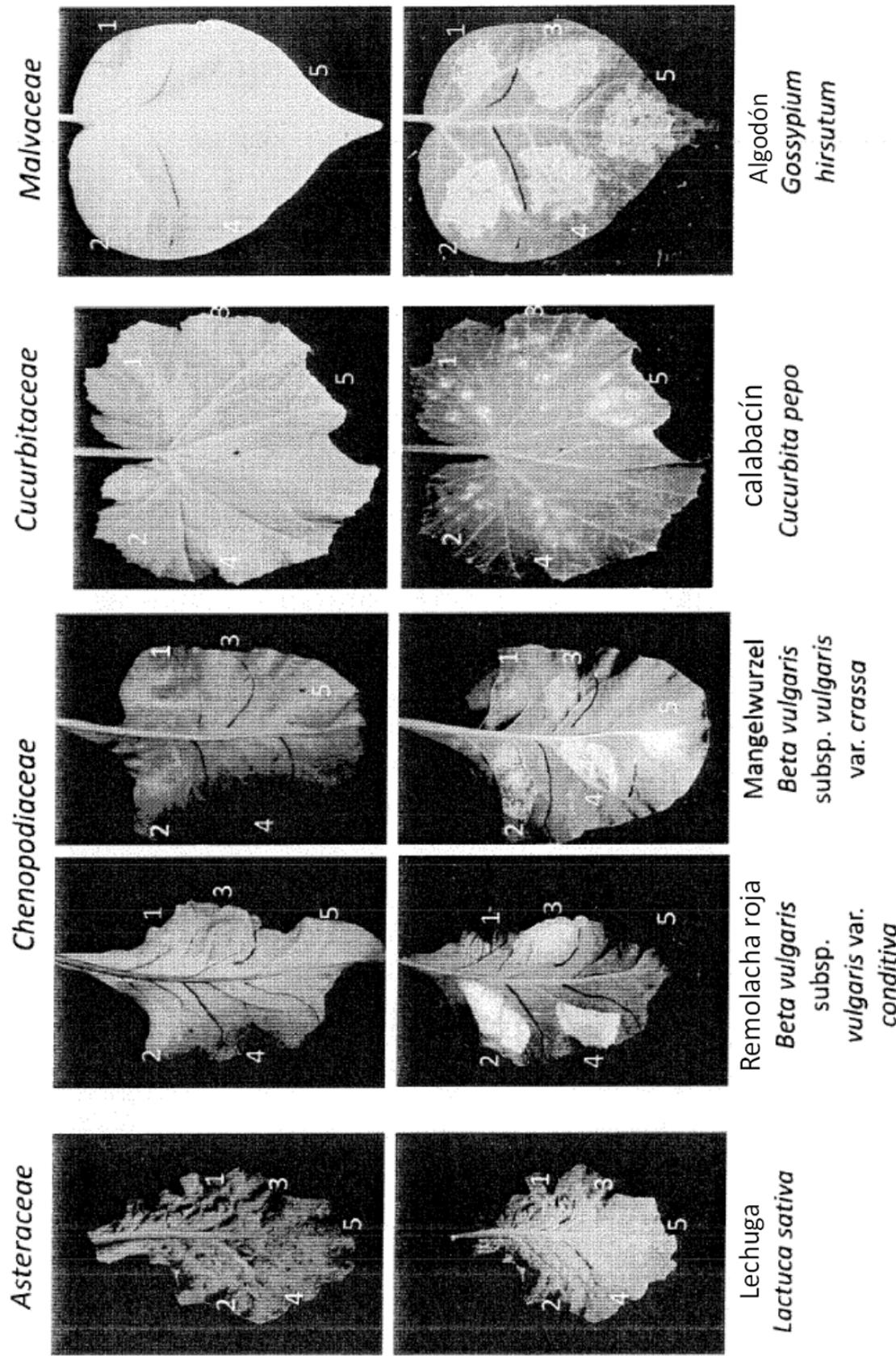


Fig. 14

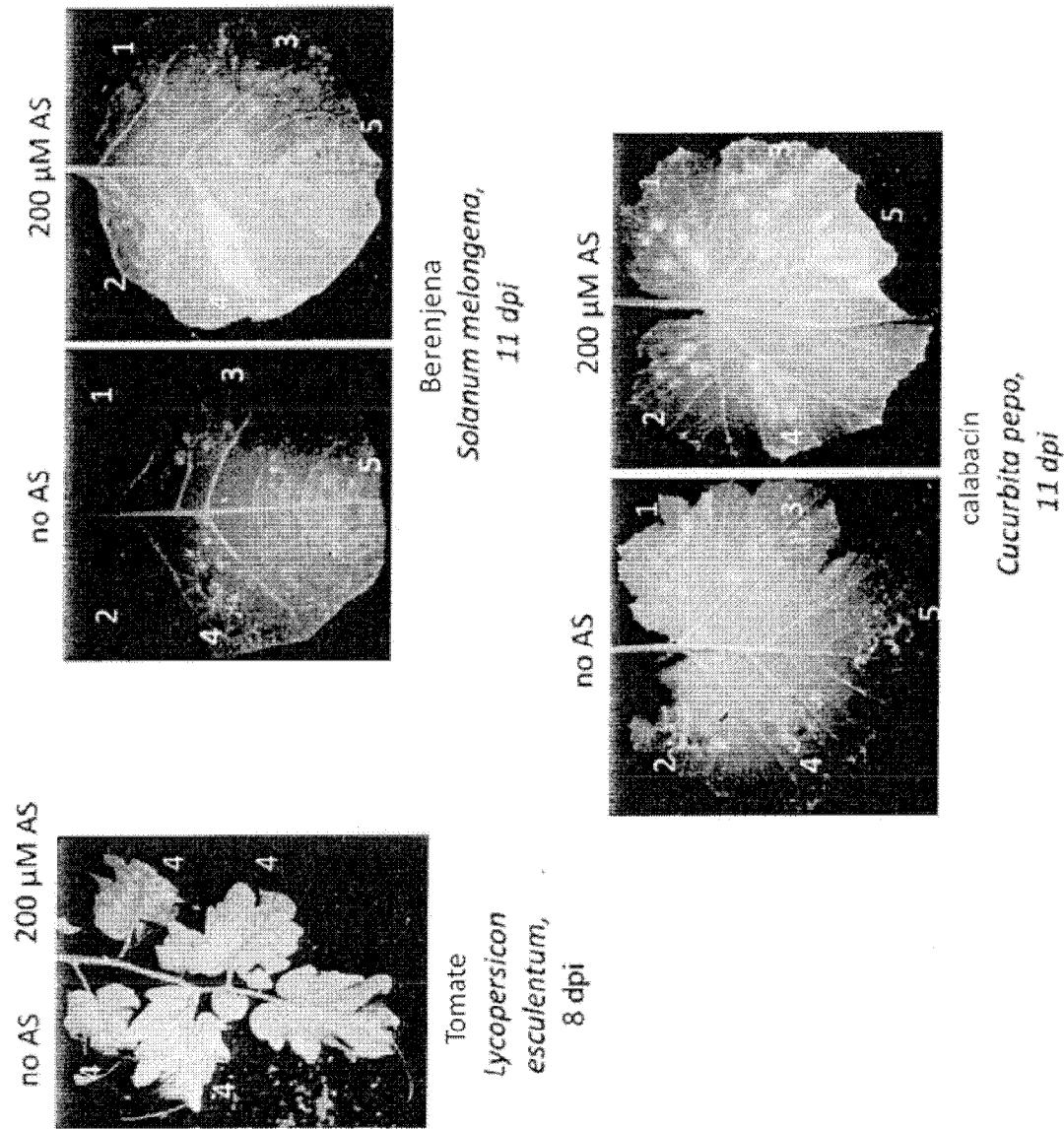
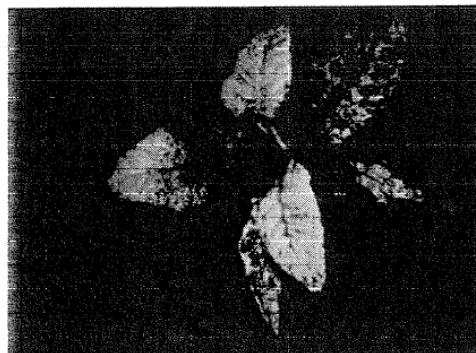
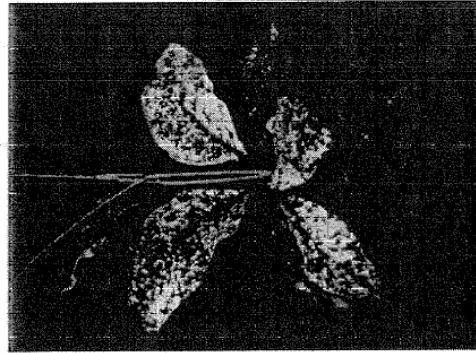


Fig. 15



Nicotiana benthamiana



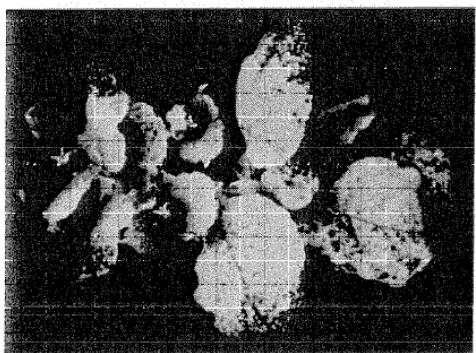
Nicotiana maritima



Nicotiana excelsior



Nicotiana debneyi



Nicotiana simulans



Nicotiana exigua



Fig. 16

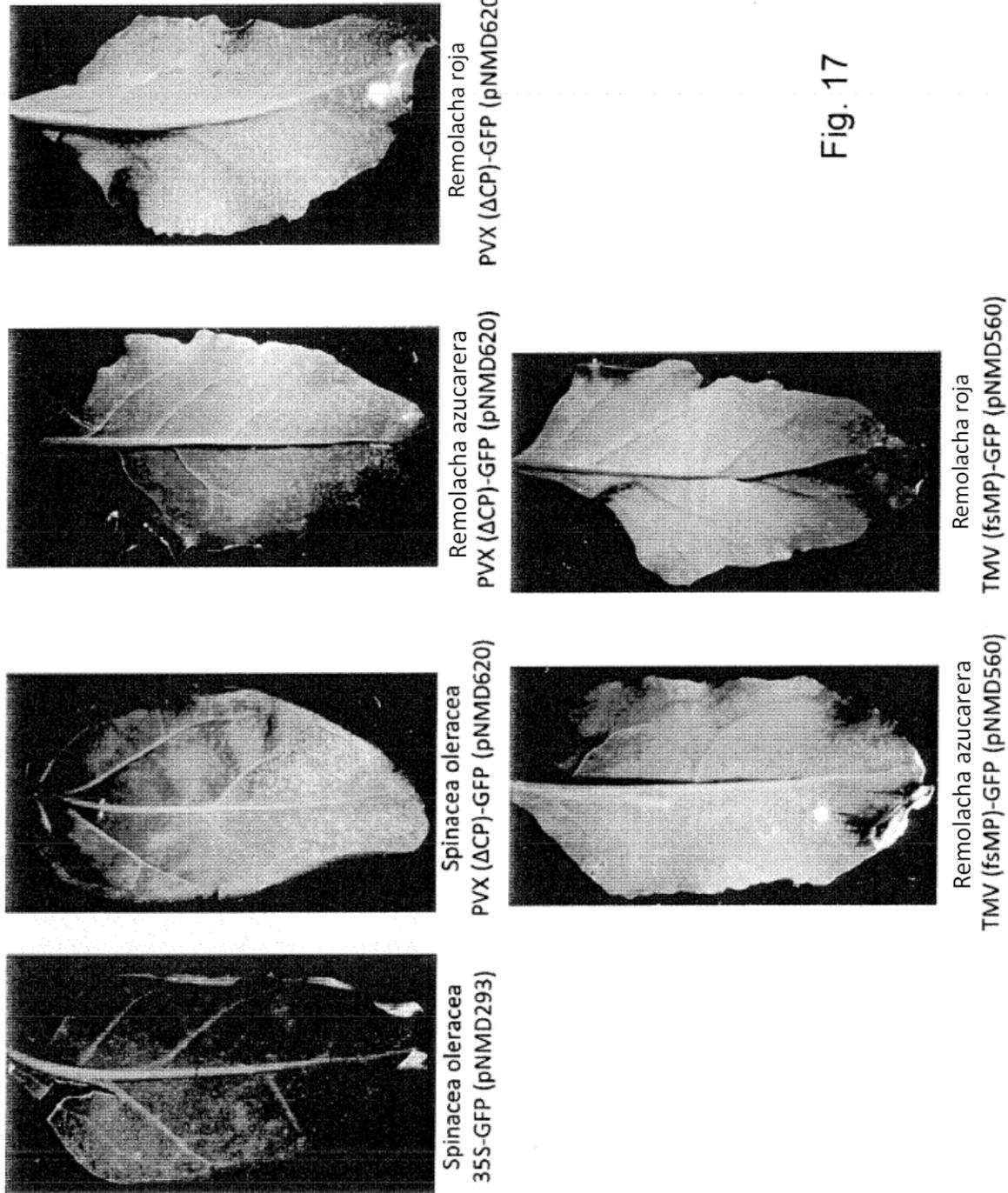


Fig. 17

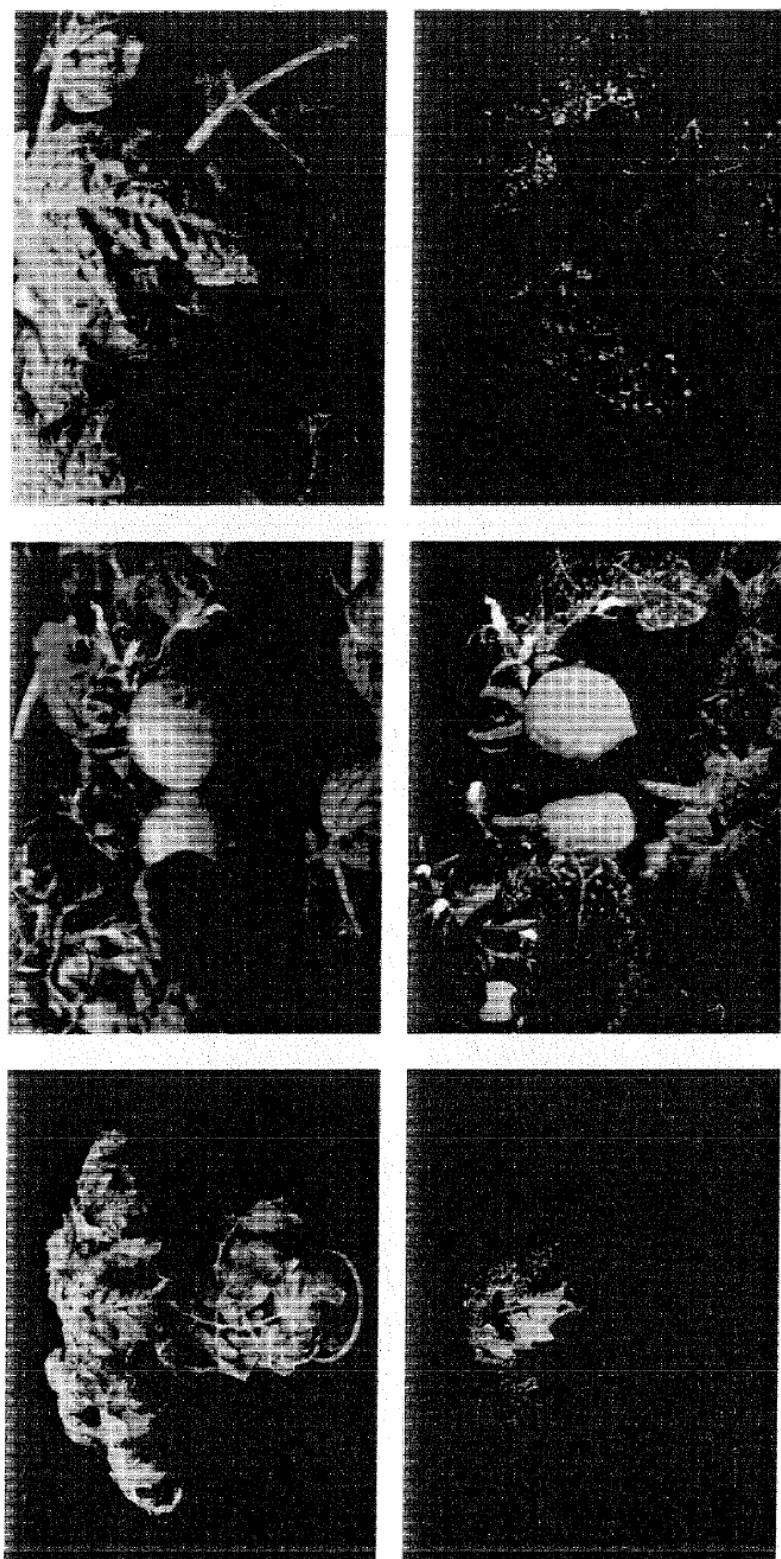


Fig. 18

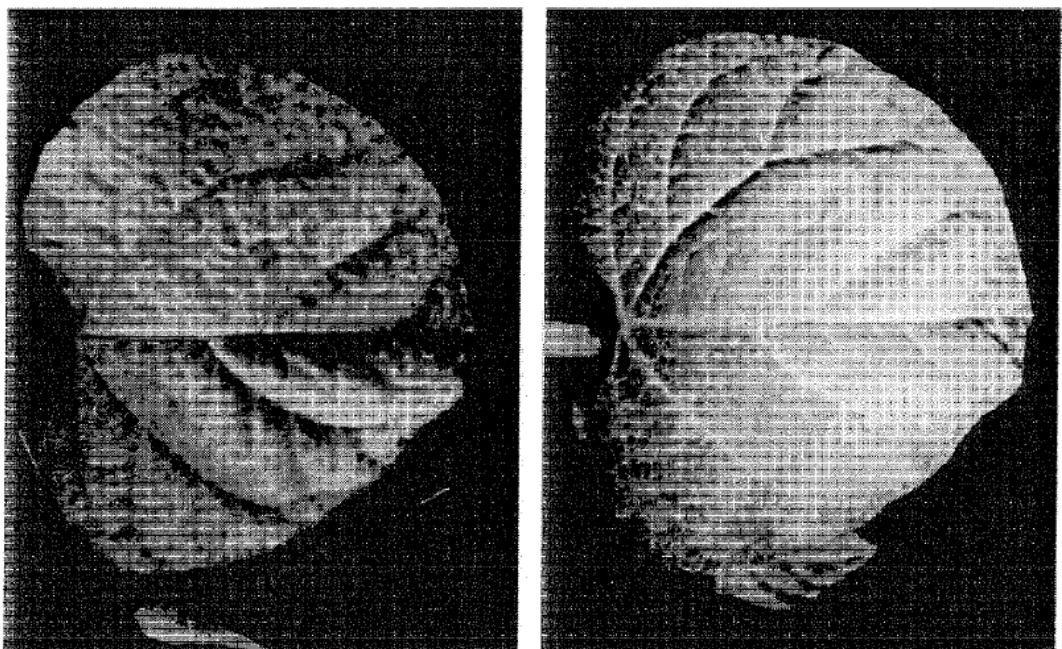


Fig. 19

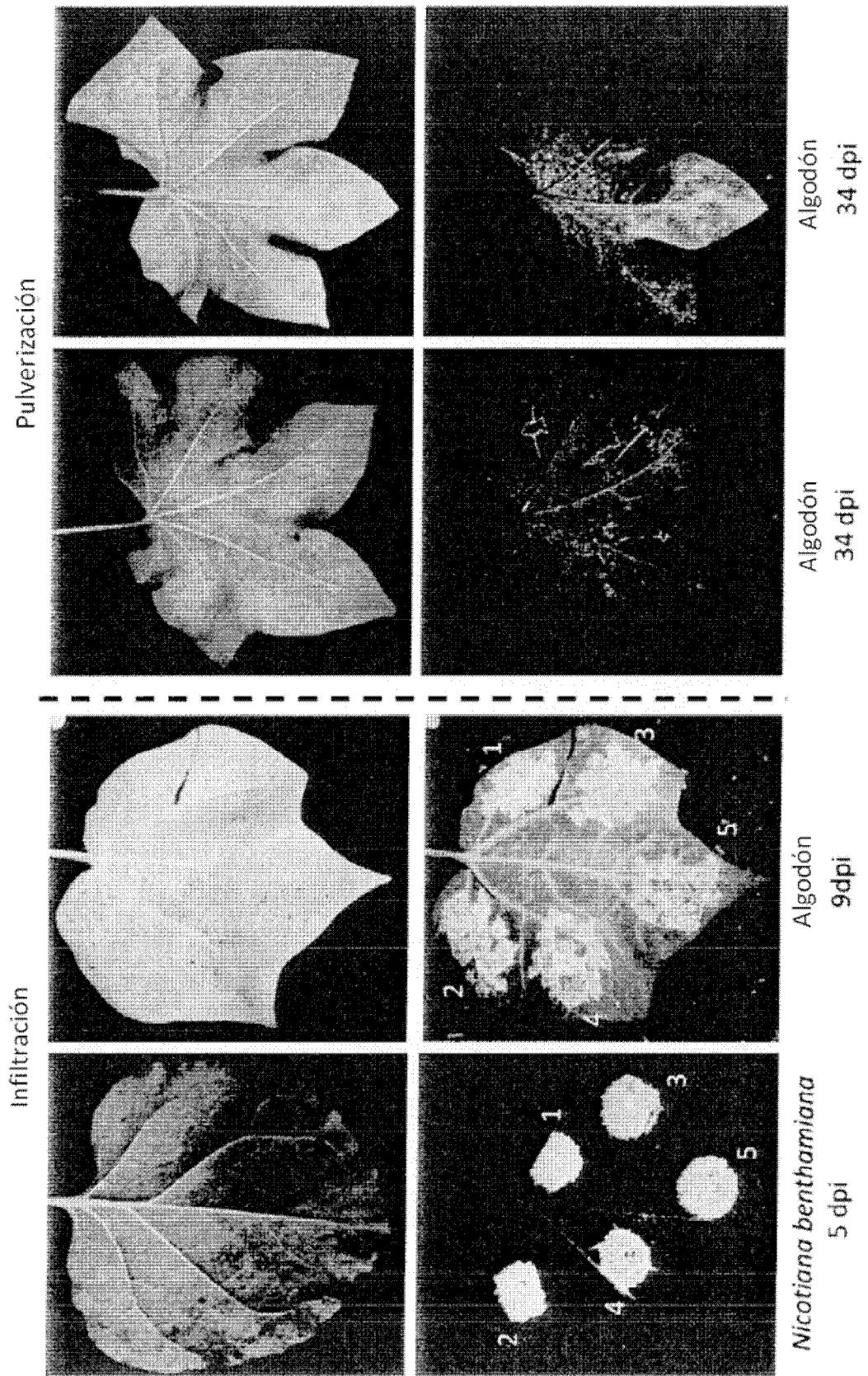


Fig. 20

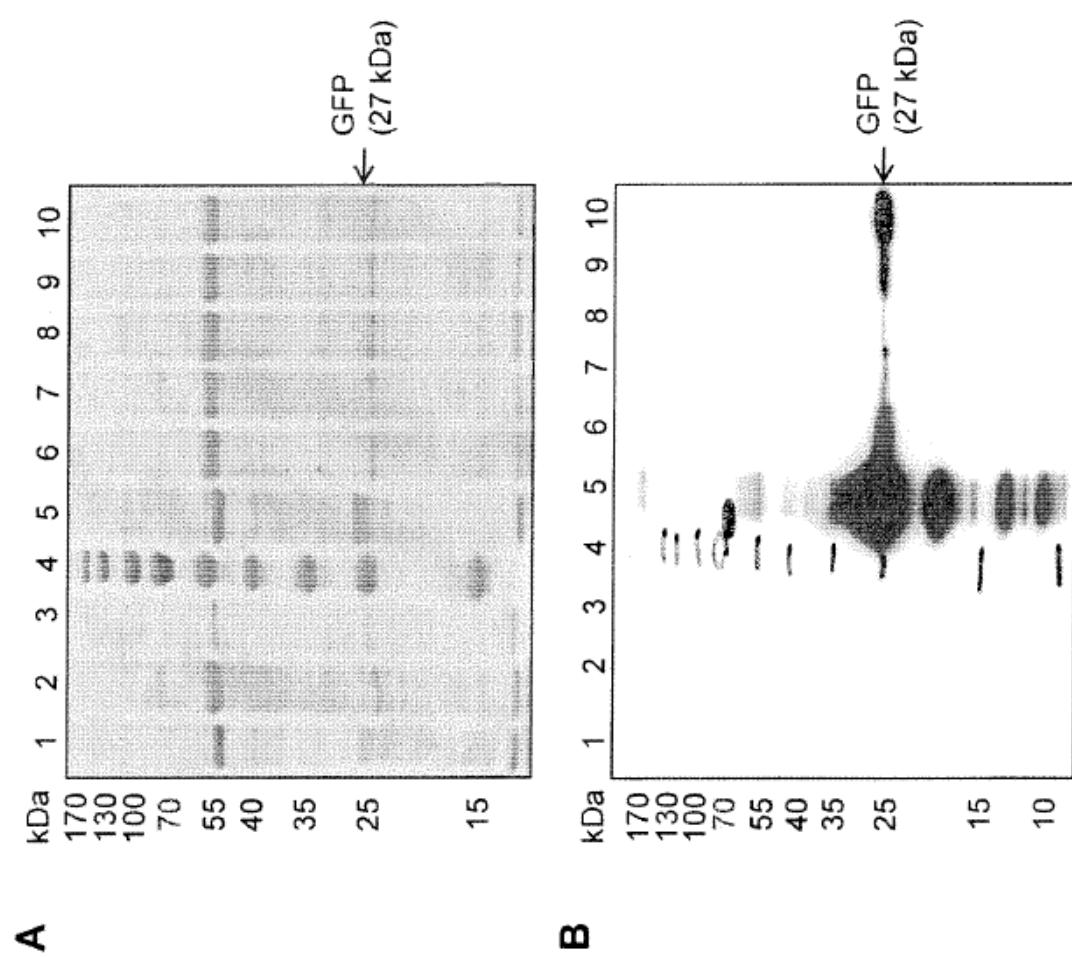


Fig. 21

Puntos de
GFP por
hoja:

41+/-11

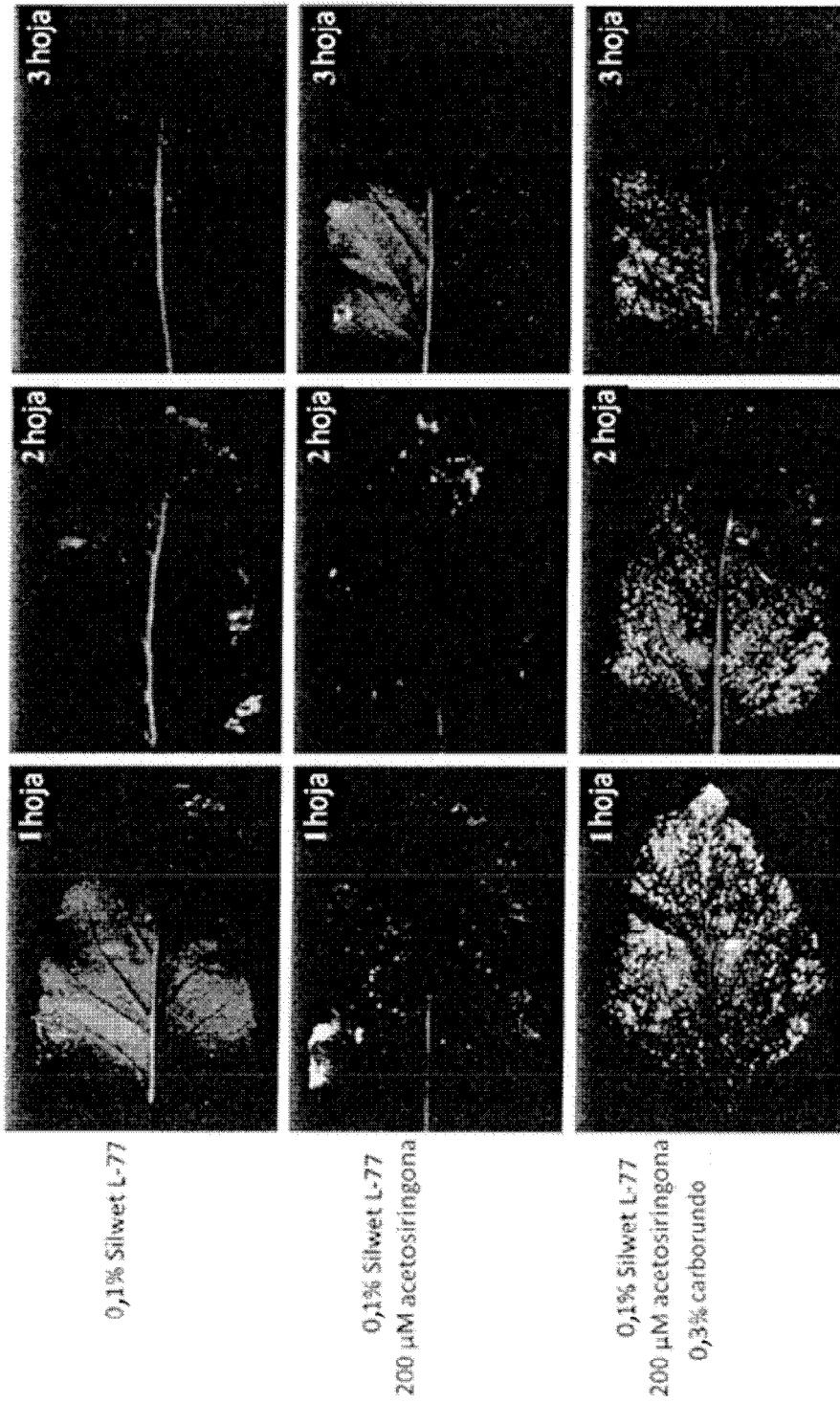


Fig. 22

TMV(MP)-GFP

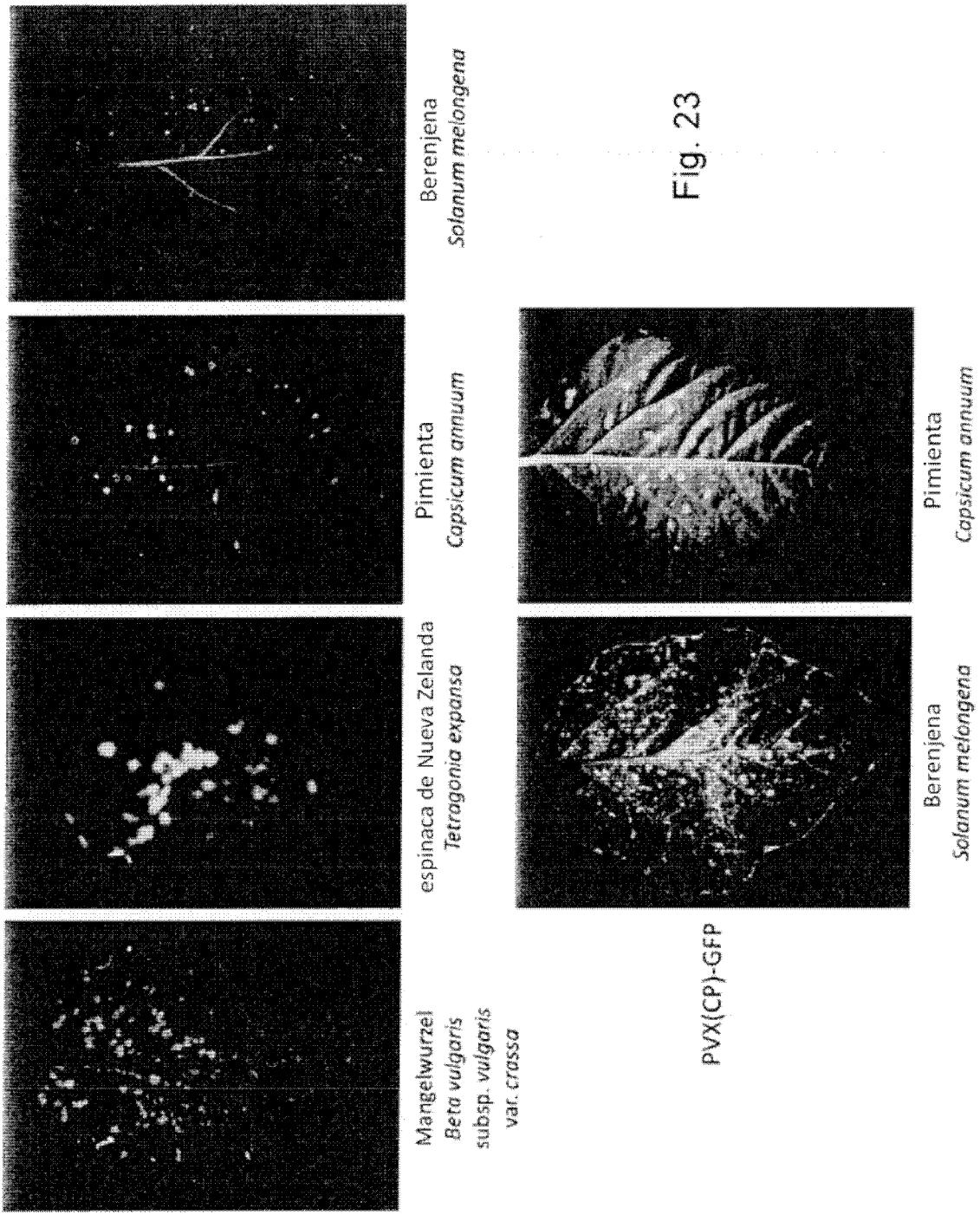


Fig. 23

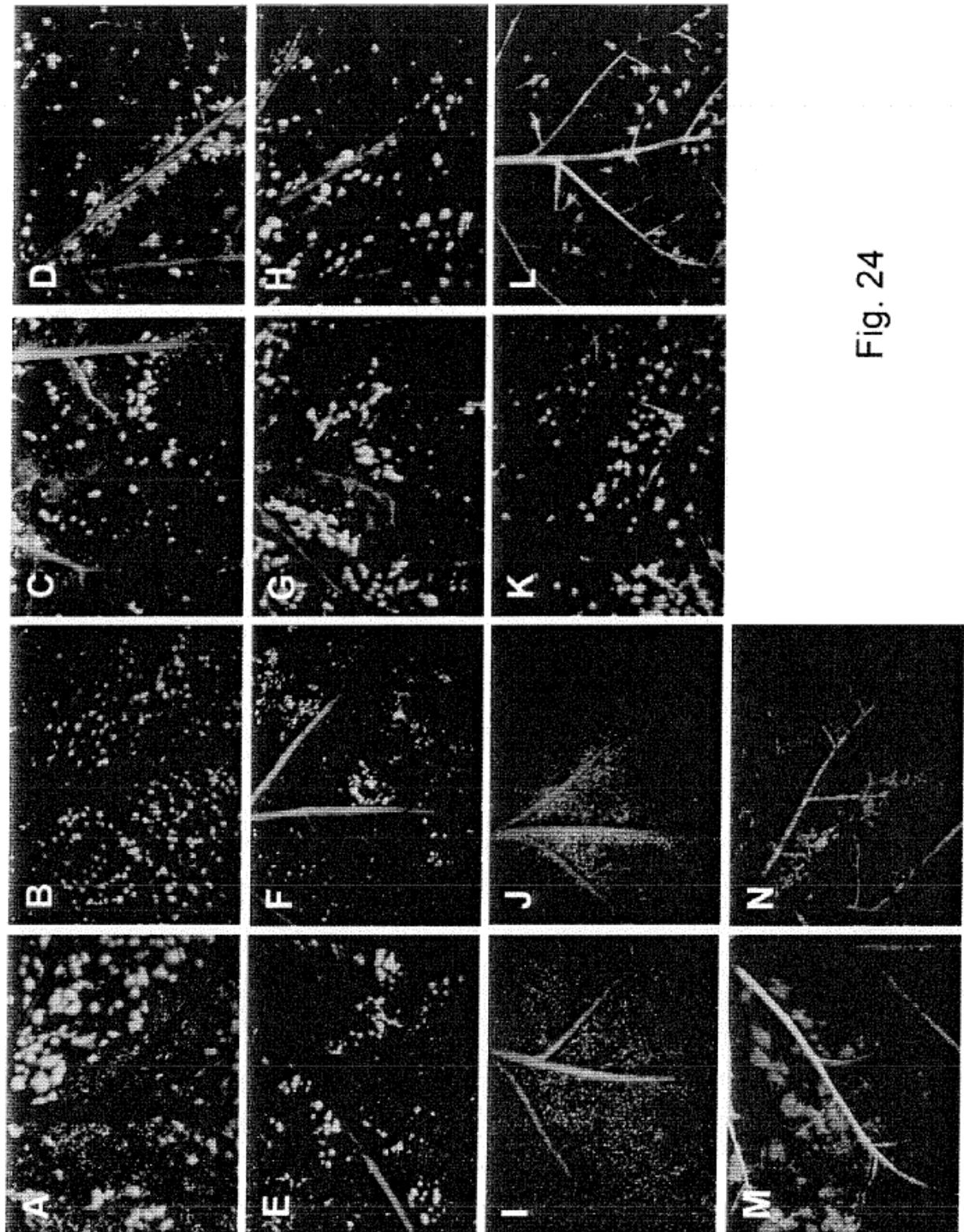


Fig. 24

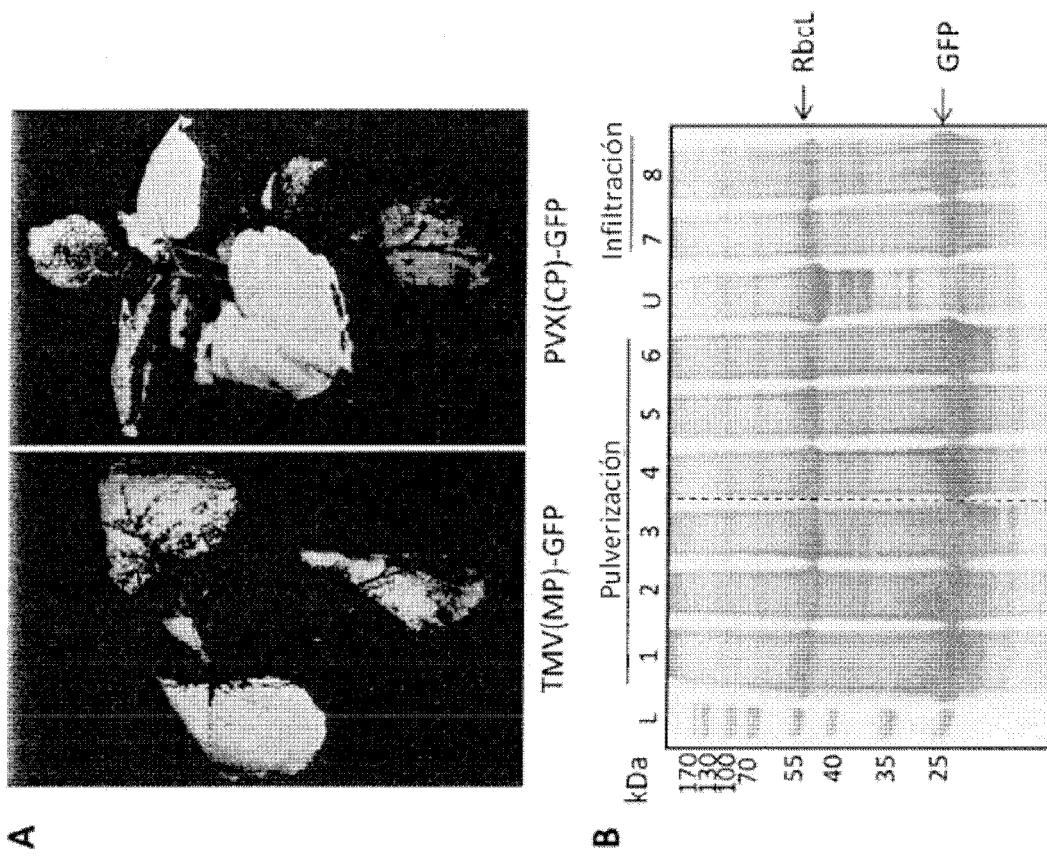


Fig. 25

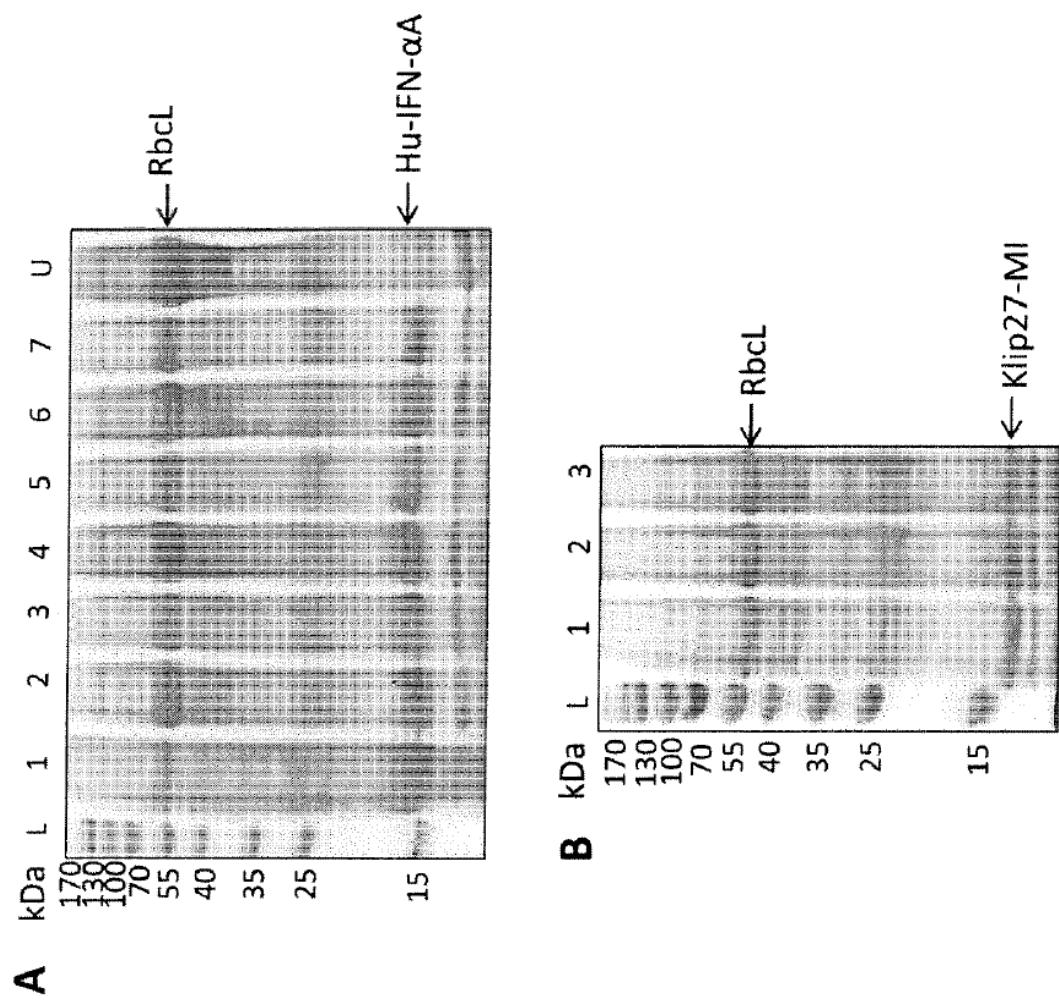


Fig. 26

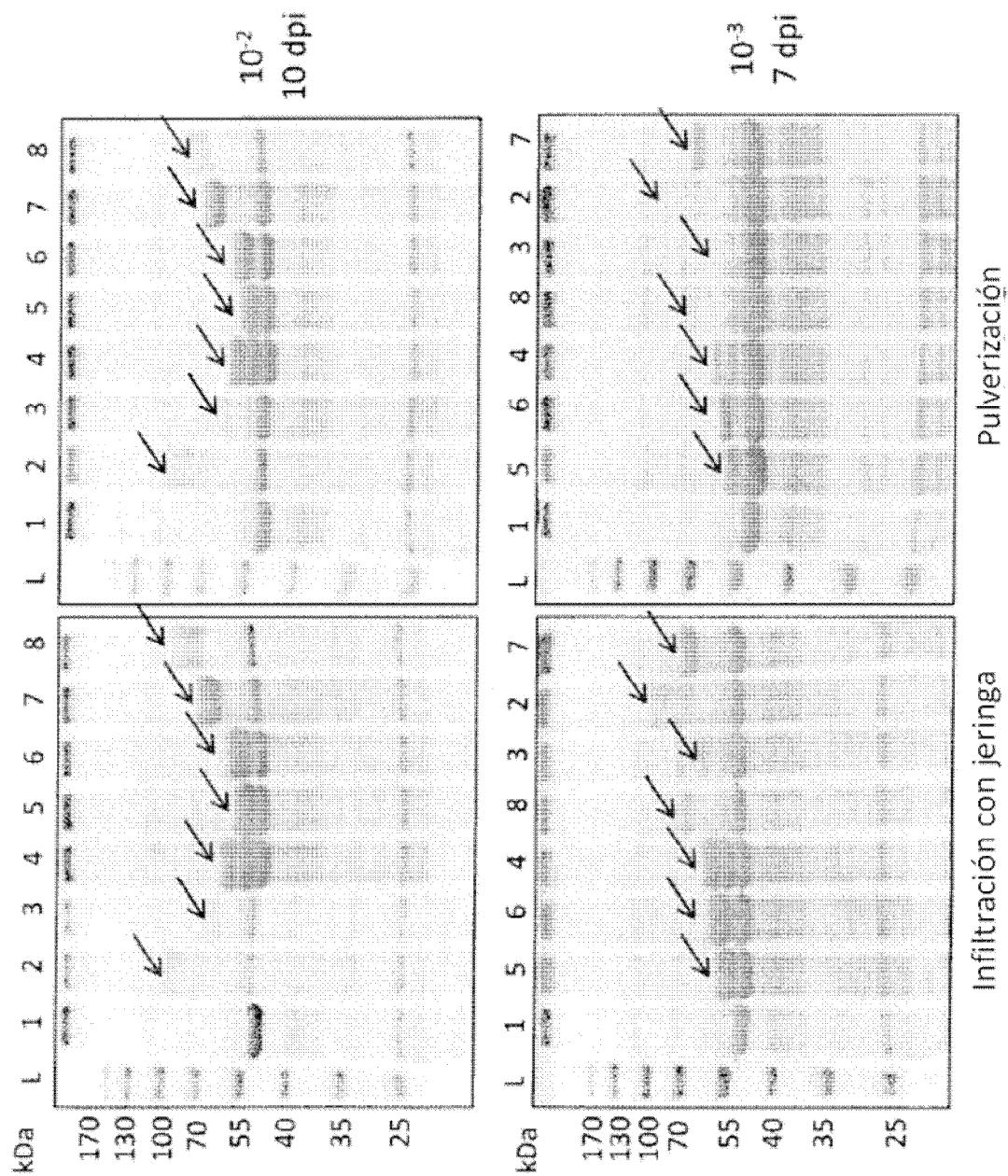


Fig. 27

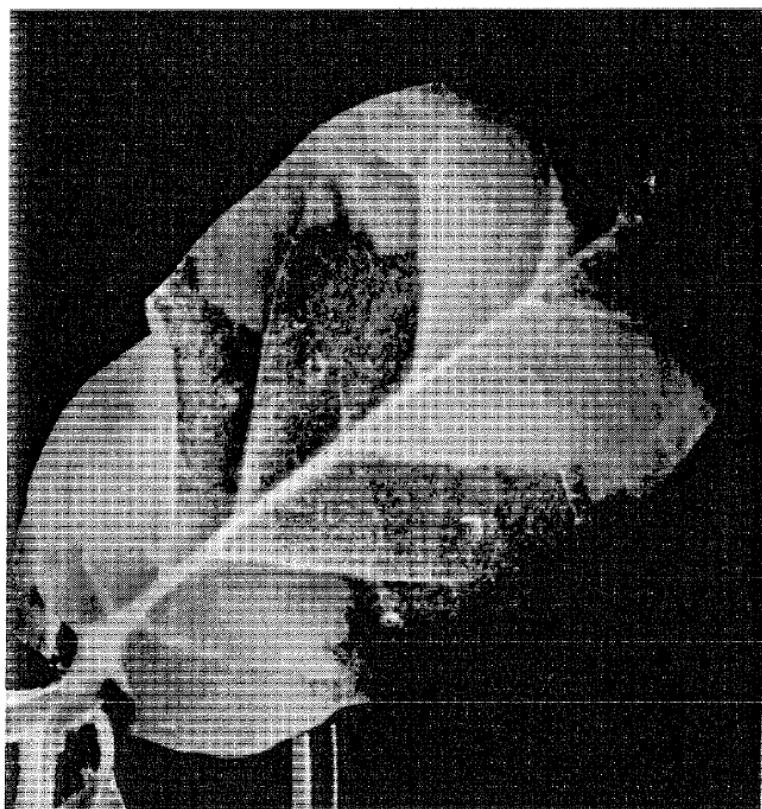


Fig. 28

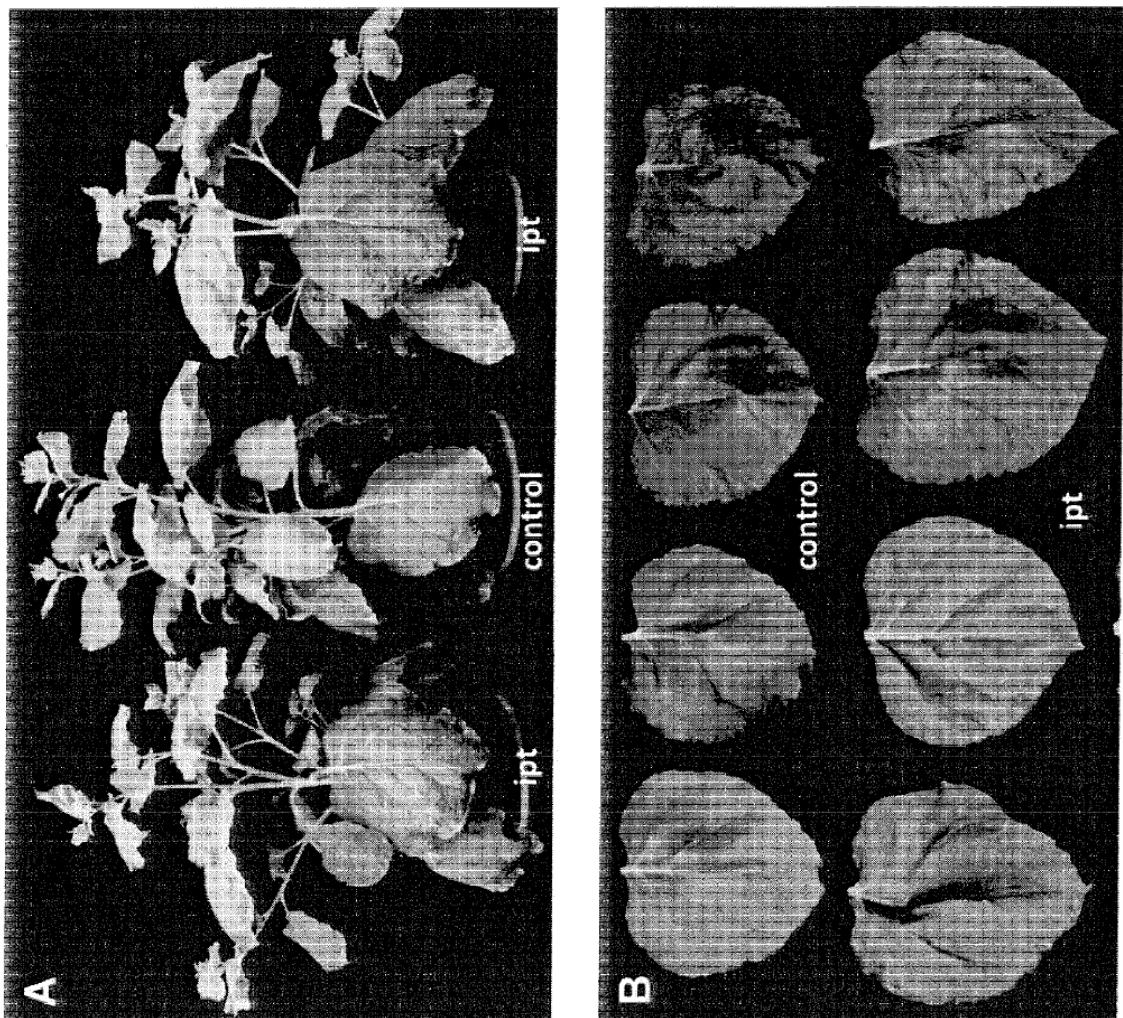


Fig. 29

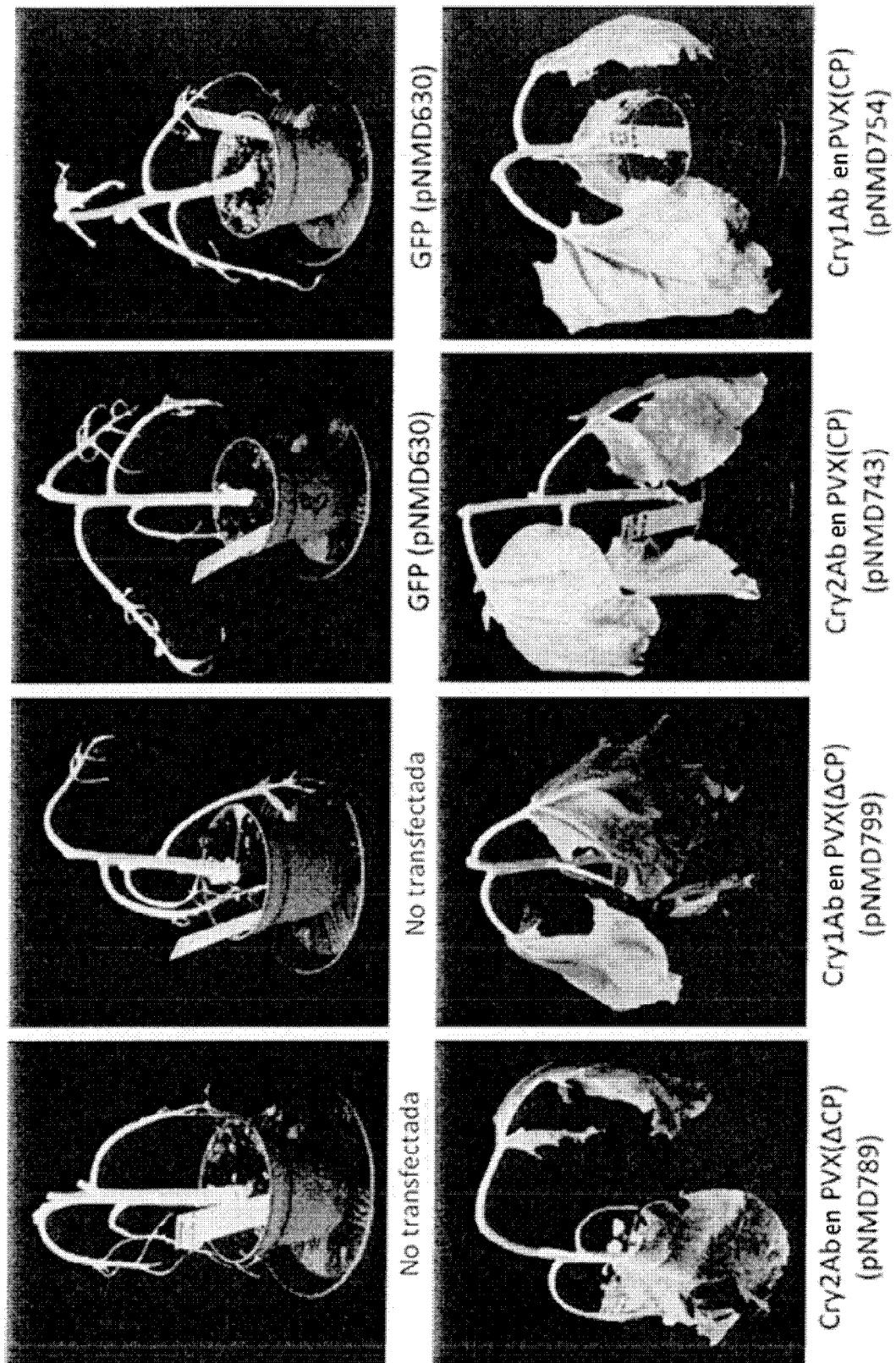


Fig. 30

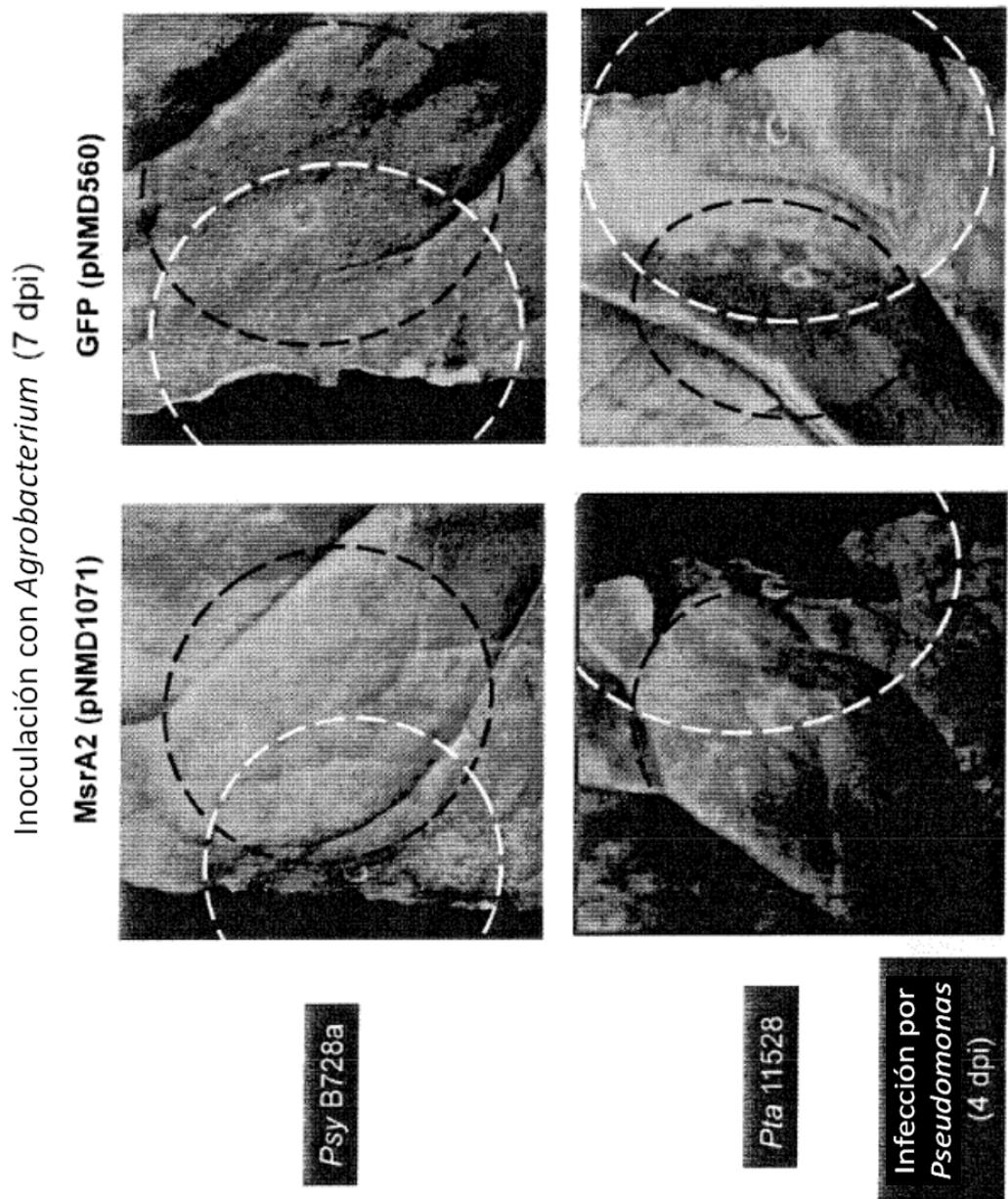


Fig. 31

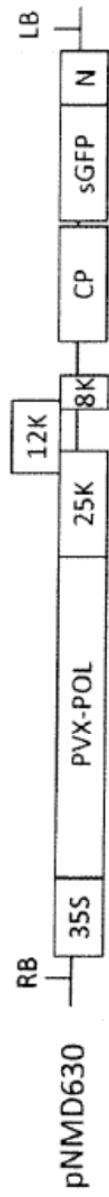
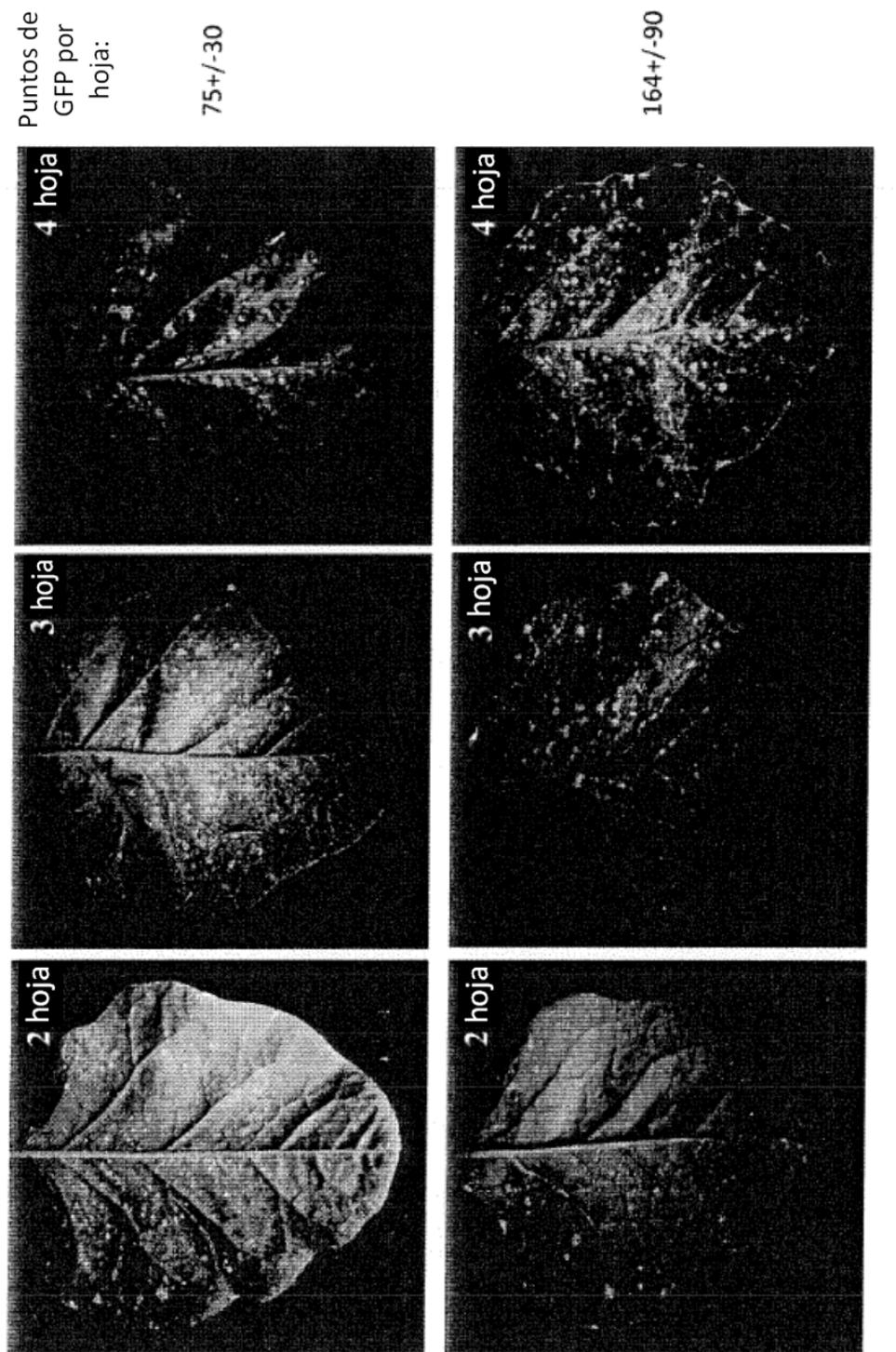
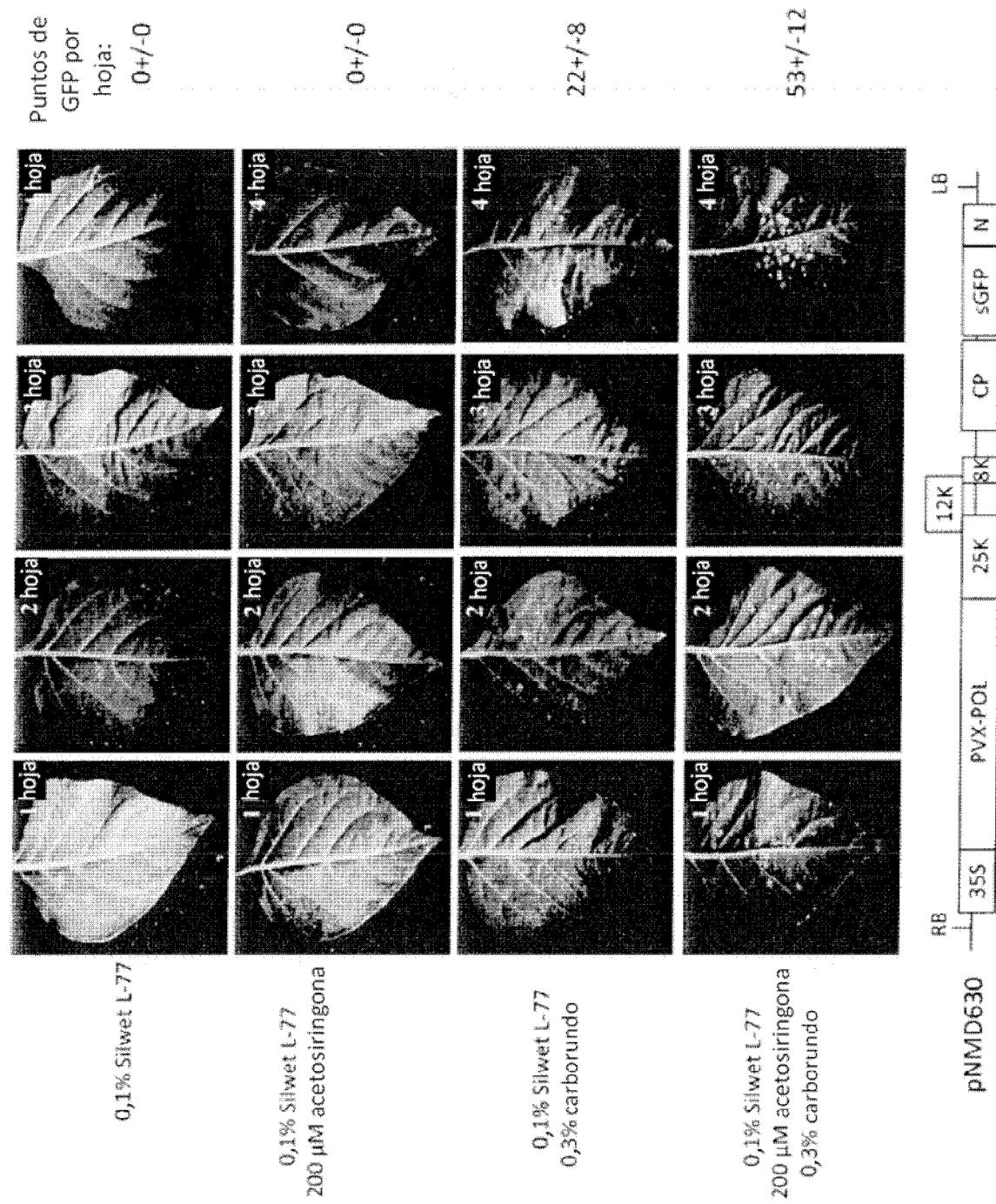


Fig. 32



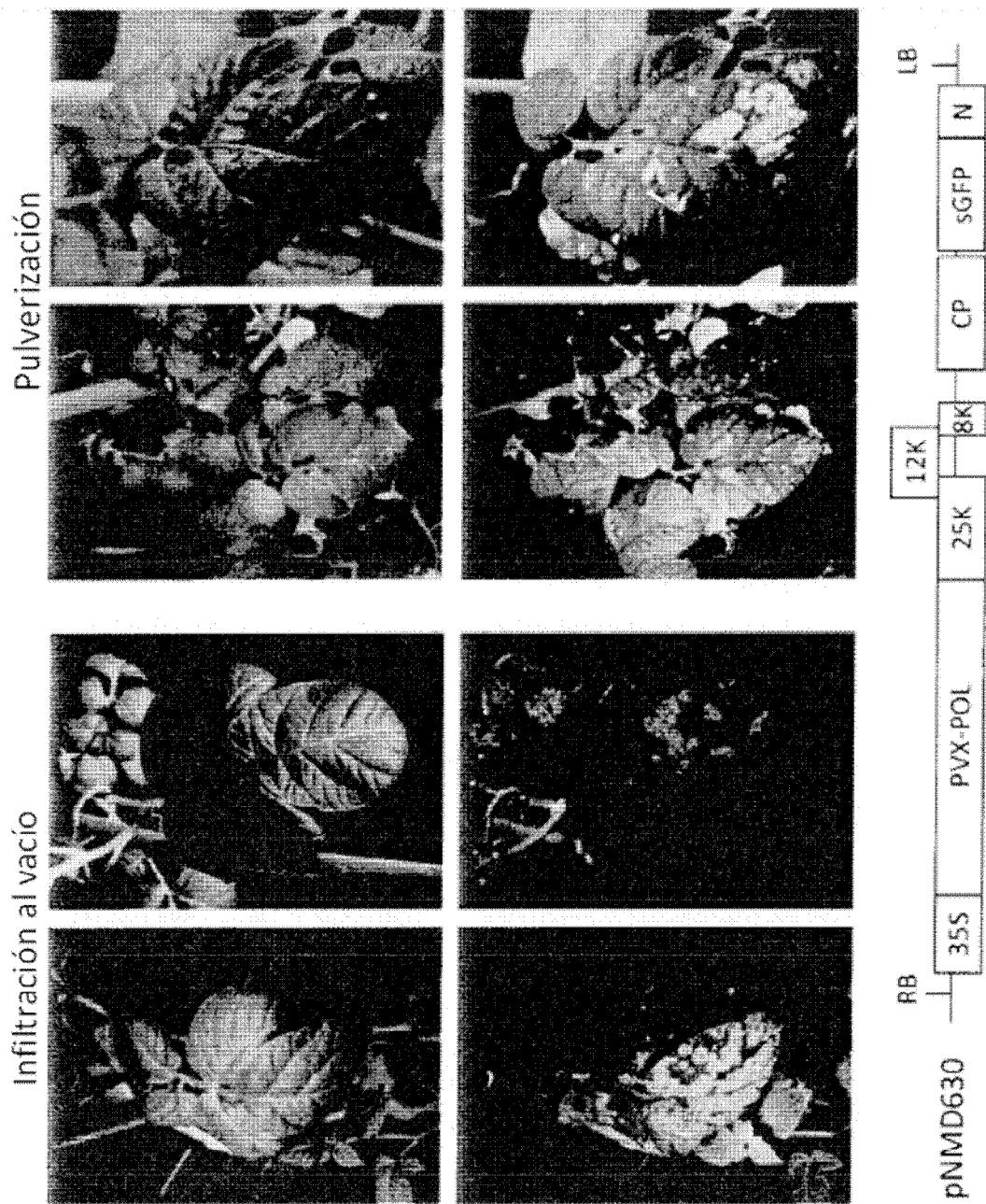


Fig. 34

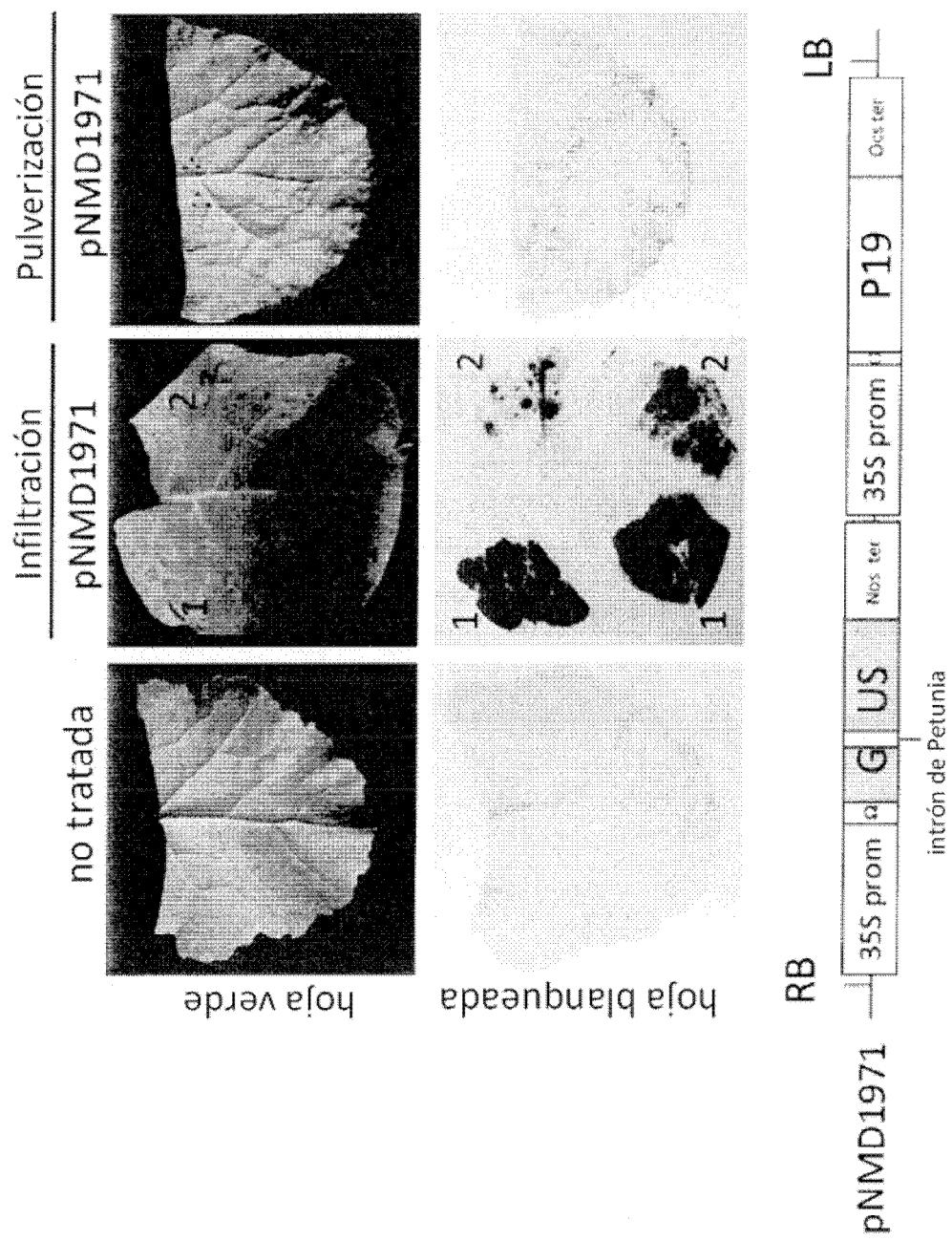


Fig. 35

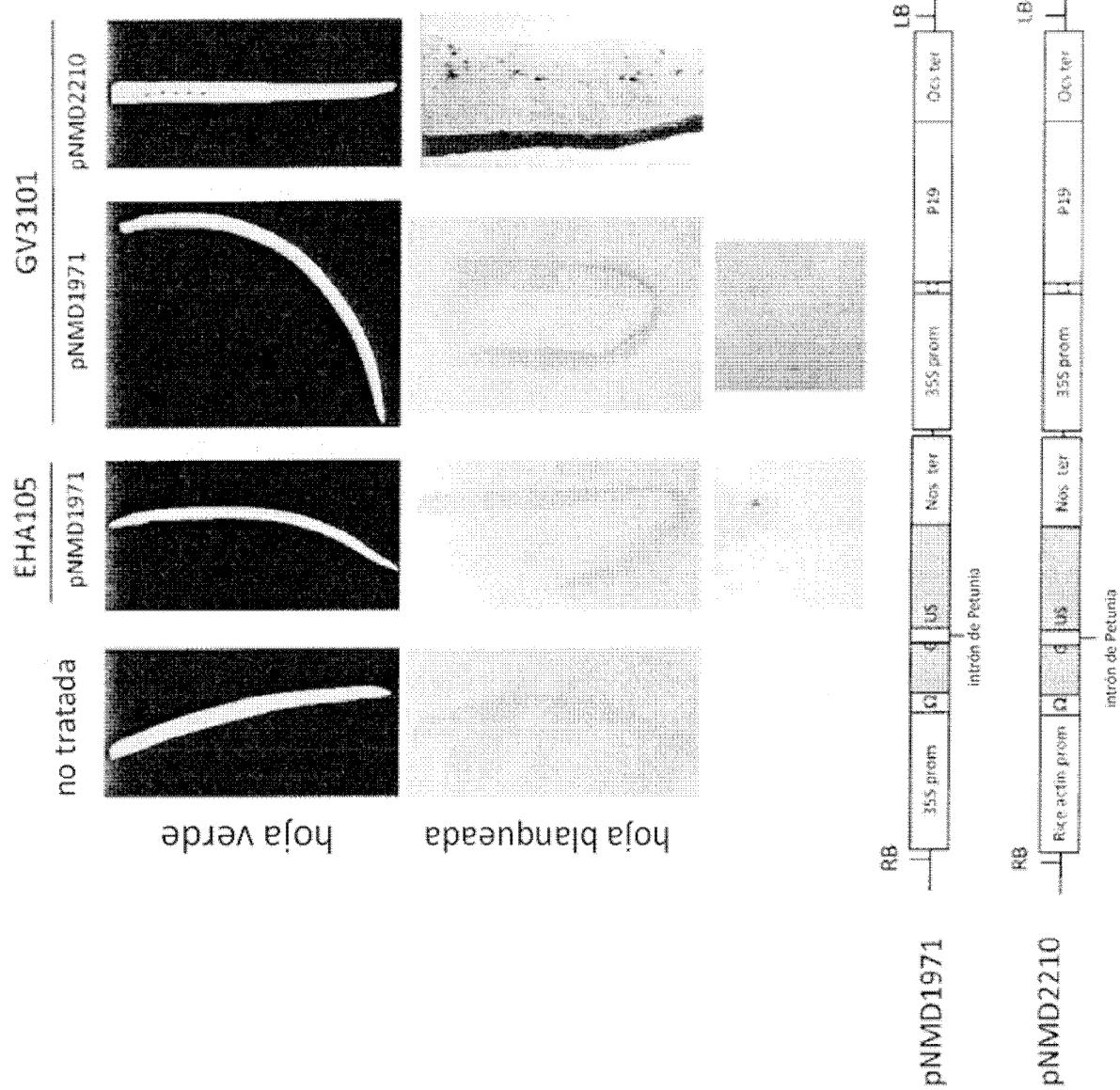


Fig. 37

