

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 543 086**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

C07K 14/415 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.08.2005 E 05784681 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.05.2015 EP 1789562**

54 Título: **Cepas de Agrobacterium desarmadas, plásmidos Ri y procedimientos de transformación basados en ellas**

30 Prioridad:

02.09.2004 US 606789 P

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

14.08.2015

73 Titular/es:

**BASF PLANT SCIENCE GMBH (100.0%)
67056 Ludwigshafen, DE**

72 Inventor/es:

**MANKIN, LUKE;
HILL, DWIGHT-STEVEN;
OLHOFT, PAULA;
TOREN, EFFIE;
BROWN, JEFFREY A.;
XING, LIQUN;
FU, HUIHUA;
IRELAND, LESLEY;
JIA, HONGMEI;
SONG, HEE-SOOK;
WENCK, ALLAN RICHARD y
NEA, LARRY**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 543 086 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

Cepas de *Agrobacterium* desarmadas, plásmidos Ri y procedimientos de transformación basados en ellas

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a variantes de cepas “desarmadas” de la cepa de *Agrobacterium* K599 (NCPFB 2659), variantes de plásmidos “desarmados” del plásmido Ri pRi2659, y derivados de las mismas, y a procedimientos que emplean estas cepas y plásmidos en la transformación de plantas.

Antecedentes de la invención

10 El género *Agrobacterium* (para una revisión reciente véase Gelvin 2003) se ha dividido en varias especies. Sin embargo, esta división ha reflejado, en general, sintomatología de las enfermedades y variedad de huéspedes. *A. radiobacter* es una especie “avirulenta”, *A. tumefaciens* produce la enfermedad de las agallas de la corona, *A. rhizogenes* produce la enfermedad de las raíces pilosas, *A. rubi* produce la enfermedad de las agallas de la caña y *A. vitis* produce agallas en la uva y alguna otra especie de planta (Otten 1984; Smith y Townsend 1907; Hildebrand 1934; para una revisión sobre *A. rhizogenes* véase Nilsson y Olsson, 1997). Aunque Bergey's Manual of Systematic Bacteriology todavía refleja esta nomenclatura, la clasificación es compleja y confusa. La sintomatología de las enfermedades es muy amplia debido a la transferencia, integración y expresión en el genoma de la célula de la planta de ADN (ADN-T) que se origina a partir de grandes plásmidos llamados plásmidos Ti (inductores de tumor) y Ri (inductores de raíz) (Van Laerebeke 1974; Chilton 1977, 1982; Moore 1979; White 1982; Tepfer 1983; Nester 1984). El curar un plásmido particular y sustituir este plásmido con otro tipo de plásmido tumorigénico puede alterar los síntomas de la enfermedad. Por ejemplo, la infección de plantas con C58 de *A. tumefaciens*, que contiene el plásmido Ti tipo nopalina pTiC58, produce la formación de teratomas en agallas de la corona. Cuando se cura este plásmido, la cepa se vuelve no patógena. La introducción de plásmidos Ri en la cepa curada “convierte” la bacteria en una cepa rizogénica (Lam 1984, White 1980). Además, puede introducirse un plásmido Ti (inductor de tumor) de *A. tumefaciens* en *A. rhizogenes*; la cepa resultante provoca tumores de morfología alterada en plantas de Kalanchoe (Costantino 1980). Así, debido a que *A. tumefaciens* puede “convertirse” en *A. rhizogenes* simplemente sustituyendo un tipo de plásmido oncogénico con otro, el término “especie” deja de tener sentido. Así, en los últimos años, el procedimiento para distinguir las cepas de bacterias por su fenotipo de agallas de la corona o de raíces pilosas no parece ya ser apropiado, ya que estas características solo están asociadas al plásmido extracromosómico. El análisis de ADN genómico reveló que algunas cepas anteriormente clasificadas como *A. rhizogenes* están más relacionadas con *A. tumefaciens* y viceversa.

30 Un sistema de clasificación más significativo divide el género *Agrobacterium* en “biovariedades” basándose en las características de crecimiento y metabólicas (Keane 1970). Usando este sistema, la mayoría de las cepas de *A. tumefaciens* y *A. rubi* (Tighe 2000) pertenecen a la biovariedad I, las cepas de *A. rhizogenes* se clasifican en biovariedad II, y la biovariedad III se representa por cepas de *A. vitis*. Más recientemente, todavía se ha propuesto otro sistema de clasificación taxonómico para el género *Agrobacterium* (Young 2001). La reciente terminación de la secuencia de ADN del genoma C58 de *A. tumefaciens* entero (que está compuesta por un cromosoma lineal y uno circular, un plásmido Ti y otro gran plásmido (Goodner 1999, 2001; Wirawan 1996) puede proporcionar un punto de partida para la reclasificación de las “cepas” de *Agrobacterium* en “especies” verdaderas. Una reciente clasificación basada en RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar) refleja las diferencias genómicas y está proporcionando un árbol “familiar” para varias cepas de *Agrobacterium* (Llop 2003). Sawada (Sawada 1993) propuso un esquema de clasificación modificado.

45 Aunque los antecedentes genéticos de *Agrobacteria* están poco explorados, ya existe un amplio conocimiento sobre la funcionalidad de sus plásmidos Ti o Ri en la infección de plantas. La movilización del ADN-T requiere que los productos de genes localizados en cualquier parte sobre el plásmido Ti o Ri, llamados conjuntamente los genes *vir*, que se activan por ciertos desencadenantes de las células vegetales heridas en trans para sintetizar y transferir una copia monocatenaria del ADN-T (la hebra T) a la célula de planta (Zambryski 1992; Zupan 1995). La secuencia de ADN-T en el plásmido Ti está flanqueada por repeticiones directas cortas de 24 pb (Yadav 1982), que se requieren para el reconocimiento del ADN-T (Wang 1984). Las secuencias que rodean inmediatamente estos límites parecen participar en la polaridad de la síntesis de la hebra T, que se inicia en el límite derecho (Wang 1987). El ADN extraño flanqueado por las secuencias del límite de ADN-T pueden transferirse a células vegetales usando *A. tumefaciens* como vector (Hernalsteens 1980). La inactivación o eliminación de los genes de ADN-T nativos que participan en la síntesis de hormonas harían que *A. tumefaciens* fuera incapaz de producir los síntomas de la enfermedad de las agallas de la corona. Este proceso de inactivar o eliminar genes responsables de los síntomas de la enfermedad se llama “desarme”. Los primeros procedimientos de manipulación por ingeniería de *A. tumefaciens* implicaron el desarme e introducción simultánea del gen deseado, ya que el gen introducido sustituyó directamente los genes en el ADN-T. Por un procedimiento llamado “homogenotización” (Matzke y Chilton, 1981), el ADN-T nativo del plásmido Ti se sustituyó con un gen deseado para la transformación. Otra estrategia desarrollada para manipular por ingeniería *A. tumefaciens* implicó la clonación del gen deseado en un vector intermedio cointegrativo, que contuvo una única región de homología de ADN-T y una única secuencia de límite. En este sistema, las secuencias se recombinan por un evento de cruce simple (Horsch 1985), que hace que se integre el vector entero, que incluye el gen de interés. Los sistemas cointegrativos se emparejan en regiones de homología entre la región de ADN-T del

plásmido Ti y la secuencia de ADN en el vector integrativo introducido. Un ejemplo de un plásmido cointegrativo útil es pGV3850, un plásmido Ti de una cepa de nopalina (C58), de la que la región de ADN-T entera entre los límites se sustituyó con pBR322, ofreciendo así un sitio de recombinación para cualquier construcción génica que contenía homología de pBR322 (Zambryski 1983).

- 5 Tras el descubrimiento de que el ADN-T no tiene que estar en el mismo plásmido que los genes *vir* (de Framond 1983; Hoekema 1983, 1985), se desarrolló el vector binario. Un vector binario se mantiene en *A. tumefaciens* separado del plásmido Ti, y contiene el gen de interés y un gen marcador de selección de planta entre las secuencias de límite de ADN-T. Estos vectores ofrecen un gran grado de flexibilidad, ya que no requieren un plásmido Ti específicamente manipulado por ingeniería con un sitio de recombinación homóloga. Por este motivo, cualquier cepa de *A. tumefaciens* desarmada puede usarse para transferir genes para cualquier vector binario. Debido a su versatilidad, los vectores binarios son actualmente los vectores intermedios preferidos para clonar genes destinados para la transformación mediada por *Agrobacterium* en plantas. Sin embargo, cualquier cepa de *A. tumefaciens* que vaya a usarse con vectores binarios debe tener su propio plásmido Ti desarmado, especialmente si la especie de planta objetivo se transforma ineficazmente mediante *A. tumefaciens*. De otro modo, el gen deseado del vector binario se co-transformará con los genes de fitohormonas oncogénicas del ADN-T nativo de las bacterias, reduciendo así la eficiencia de transformación del gen deseado y produciendo también los síntomas de enfermedad tumorigénica en muchas de las células diana y previniendo así la diferenciación de estas células en plantas normales.

20 El desarme de cepas de *A. tumefaciens* no mutantes para el uso general con vectores binarios ha implicado, en algunos casos, una forma de homogenización. Una construcción intermedia que contiene un gen marcador flanqueado por secuencias del plásmido Ti que son homólogas a regiones que se encuentran fuera del ADN-T se introduce en *A. tumefaciens* no mutante por conjugación bacteriana (Hood 1986, 1993). Mientras que las cepas de *A. tumefaciens* desarmadas normalmente tienen quitadas sus secuencias de ADN-T enteras, se ha demostrado que la movilización de ADN-T puede inactivarse por la eliminación de la secuencia de límite derecho: informes del trabajo con cepas del tipo nopalina de *A. tumefaciens* muestran que el límite derecho de ADN-T es necesario para la transferencia de genes, pero no el límite izquierdo (Joos 1983; Peralto y Ream 1985; Shaw 1984; Wang 1984). *Agrobacterium tumefaciens* tiene una diversa variedad de huéspedes dicotiledóneos, y adicionalmente algunas familias monocotiledóneas (De Cleene 1976; Smith 1995). Hay varias cepas diferentes de *A. tumefaciens*, cada una clasificada en tipo octopina, tipo nopalina y tipo L,L-succinamopina, llamadas por el tipo de opina sintetizada en las células vegetales que infectan. Estas cepas tienen variedades de huéspedes comparables, aunque no idénticas, y se han usado satisfactoriamente versiones desarmadas de muchos tipos de *A. tumefaciens* para la transferencia génica en una variedad de especies de planta (van Wordragen 1992; Hood 1993).

35 Las cepas de *Agrobacterium rhizogenes* se clasifican de la misma forma que las cepas de *A. tumefaciens*. Normalmente, se clasifican por la opina que producen. Las cepas más comunes son las cepas tipo agropina (por ejemplo, caracterizadas por el plásmido Ri pRiA4), cepas tipo manopina (por ejemplo, caracterizadas por el plásmido Ri pRi8196) y las cepas tipo cucumopina (por ejemplo, caracterizadas por el plásmido Ri pRi2659). Algunas otras cepas son del tipo mikimopina (por ejemplo, caracterizadas por el plásmido Ri pRi1724). La mikimopina y la cucumopina son estereoisómeros, pero no se encontró homología entre ellos al nivel de nucleótidos (Suzuki 2001).

40 La soja (*Glycine max* L. Merr.) ha demostrado ser muy difícil de transformar con *A. tumefaciens*, al menos en parte debido a que es resistente a la infección por *A. tumefaciens* no mutante. Estudios comparativos con varios cultivares de soja y cepas de *A. tumefaciens* sugieren que la susceptibilidad de la soja a *A. tumefaciens* está limitada, y es tanto dependiente del cultivar como de la cepa bacteriana (Bush 1991; Byrne 1987; Hood 1987). Los problemas con la resistencia de la soja a *A. tumefaciens* se complican adicionalmente por la dificultad de trabajar con soja en cultivo de tejido. A pesar de algunos avances hasta la fecha, sin embargo, la transformación mediada por *Agrobacterium* en soja sigue siendo ineficaz y requiere mucho trabajo, y continuamente están siendo buscados procedimientos para mejorar esa eficiencia.

50 Como se ha mencionado anteriormente, algunas cepas de *A. tumefaciens* infectan soja más fácilmente que otras. Una cepa, A281, es una *A. tumefaciens* tipo L,L-succinamopina de amplia variedad de huéspedes supervirulenta con antecedente cromosómico de C58 tipo nopalina, que contiene el plásmido Ti tipo L,L-succinamopina, pTiBo542 (Hood 1987). El desarmar esta cepa ha producido EHA101 y EHA105, cepas ahora ampliamente usadas conjuntamente con la transformación de soja (Hood 1986, 1987). Se han descrito diversas otras cepas de *Agrobacterium* desarmadas (A208, documento US 5.416.011; LBA 4404, documento WO 94/02620). Hood y col. (1993) desvelan el desarme de tres plásmidos Ti: cada uno de los tipos octopina, nopalina y L,L-succinamopina. Se desvela que las cepas A281 y EHA101 de *Agrobacterium tumefaciens* pueden transformar soja. Se desvela el desarme derivado del plásmido pTiBo542 de la cepa A281 y se designa pEHA105.

60 Las plantas transformadas con Ri de *Agrobacterium rhizogenes* de varias especies de planta tienen un fenotipo característico, con entrenudos acortados, hojas arrugadas y una abundante masa de raíces con amplias ramificaciones laterales (Tepfer 1984). Los genes *rol* en ADN-T de Ri inducen cambios en la sensibilidad a las hormonas de la planta y/o en el metabolismo de hormonas de la planta (Maurel 1994; Moritz y Schmölling 1998; Nilsson 1997; Shen 1988). Además, la transformación de tejidos de planta por infección con *A. rhizogenes* aumenta la producción de ciertos metabolitos (Ermayanti 1994; Mano 1986; Sim 1994).

K599 de *Agrobacterium rhizogenes* (pRi2659) "armado" nativo es capaz de inducir la formación de raíces pilosas en una variedad de cultivares de soja que incluyen Jack, Williams 82, Cartter, Fayette, Hartwig, Mandarin, Lee 68, Peking y PI437654 (Cho 2000).

5 En el caso de *A. rhizogenes*, el plásmido Ri de manopina de la cepa 8196 posee una única región T que no comparte homología con ninguno de los oncogenes del ADN-T de pTi (Lahnert 1984). Esta observación sugiere que un novedoso mecanismo, diferente de aquel debido a la expresión de *tms* en mutantes Ti *tmr*, es responsable de la inducción de raíces por esta cepa. En el caso de las cepas de agropina tales como A4, dos regiones distintas del plásmido Ri se transfieren al genoma de la planta: la región TL y la región TR (Huffman 1984; Jouanin 1984; White 1985). El tamaño del ADN de TL encontrado en plantas transformadas por la cepa A4 es bastante constante, mientras que la longitud del ADN de TR es más variable. Las hibridaciones con las regiones T de *A. tumefaciens* revelaron homología en la región TR de pRi con genes del ADN de TR de los plásmidos Ti de octopina que participan en la síntesis de agropina. Entre los oncogenes pTi comunes solo se encontró homología con los loci *fm* (Willmitzer 1982; Huffman 1984; Jouanin 1984), sugiriendo una posible función para la síntesis de auxina dirigida por ADN de TR en la inducción de raíces, aunque los genes similares a *tms* no se encuentran en el genoma de todas las plantas transformadas generadas (Taylor 1985; Jouanin 1986a). La región TL, a diferencia, no se hibrida con genes de ADN-T de pTi (Jouanin 1984). La secuencia de ADN de TL establecida por Slightom y col. (1986) confirma esta ausencia de homología al nivel de nucleótidos. Sin embargo, el ADN de TL es altamente homólogo a la única región T de la manopina pRi8196 y, por tanto, podría ser capaz de inducir raíces transformadas.

20 Vilaine y col. (Vilaine 1987) han demostrado que la transferencia de ADN de TL solo, además de la transferencia de ADN de TR solo, conduce a la inducción de raíces en fragmentos de plantas infectados, sugiriendo la existencia de dos mecanismos moleculares independientes para la inducción de raíces en plásmidos Ri tipo agropina. Vilaine y col. están describiendo adicionalmente el desarme de la cepa A4RS de *Agrobacterium rhizogenes* tipo agropina delecionando las regiones TL, TR, o ambas de TL y TR, del plásmido Ri pRiA4 que produce la cepa RS de *A. rhizogenes* (pRiB278b). Se describe la conjugación de los plásmidos Ri desarmados con cósmidos que llevan la región TL o TR, "rescatando" así el fenotipo de raíces pilosas. No se desvela uso para la transferencia génica de dicha cepa de *A. rhizogenes* desarmada.

30 Mientras que transformación de plantas mediada por *Agrobacterium tumefaciens* se ha convertido en un estándar en la industria biotecnología de las plantas para muchas especies de plantas, el uso de *Agrobacterium rhizogenes* solo se hace raramente. Hasta la fecha, solo las cepas de *Agrobacterium rhizogenes* "armadas" nativas se emplearon para incorporar genes extraños en plantas (por ejemplo, Narayanan 1999; Kouchi 1999). Como *A. rhizogenes* también puede transferir el ADN-T de vectores binarios 'en trans', se ha usado el plásmido Ri como vector para la introducción de ADN extraño en especies de plantas dicotiledóneas (Bevan 1984; Simpson 1986; Hamill 1991). Sin embargo, las cepas de *Agrobacterium rhizogenes* empleadas en estas divulgaciones están "armadas" (comprendiendo sus plásmidos Ri nativos) y todavía son capaces de producir el fenotipo de raíz pilosa (véase, por ejemplo, Narayanan 1999).

40 Aunque se han vencido algunos de los problemas asociados a la transformación de plantas por los procedimientos descritos en la materia, todavía hay una necesidad significativa de mejora y procedimiento alternativo. Aunque se han hecho avances significativos en el campo de los procedimientos de transformación mediados por *Agrobacterium*, continúa existiendo una necesidad de procedimientos mejorados para facilitar la facilidad, velocidad y eficiencia de tales procedimientos, especialmente también para la transformación de plantas monocotiledóneas y plantas dicotiledóneas que son resistentes a la transformación con cepas de *A. tumefaciens* estándar. Por tanto, fue el objetivo de la presente invención proporcionar un procedimiento alternativo que ofreciera una eficiencia de transformación mejorada para una amplia variedad de especies de planta. Este objetivo se resuelve por la presente invención.

45 **Resumen de la invención**

La presente invención usa variantes de cepas "desarmadas" de la cepa K599 de *Agrobacterium* (NCPBP 2659) para la administración de ADN-T en células de plantas. En el presente documento más adelante no se emplea la clasificación previa de una cepa de "*A. rhizogenes*", debido a que además del fenotipo inductor de raíces pilosas (que es un resultado del plásmido Ri, pero no el genoma bacteriano), la cepa parece estar solo remotamente relacionada con otras cepas de *A. rhizogenes* basándose en un análisis de comparación de secuencias de ADN ribosómico. Así, se considera que la cepa es un espécimen único que tampoco es inequívocamente un tipo de cepa de *A. tumefaciens* o de *A. rhizogenes*.

Una primera realización de la invención se refiere a un procedimiento para producir una célula de planta transgénica que comprende las etapas de:

55 a) proporcionar bacterias de una variante de cepa no patógena transgénica de la cepa K599 de *Agrobacterium* (NCPBP 2659) o de un derivado de dicha cepa, en el que dicha variante de cepa es capaz de infectar células vegetales, pero carece de propiedades inductoras del fenotipo de raíces pilosas y en el que dicha variante de cepa comprende además un ADN-T transgénico, y

b) co-cultivar una célula de planta con dichas bacterias, y

c) aislar o seleccionar células vegetales que comprenden establemente integrado en su genoma dicho ADN-T transgénico.

5 Otra realización de la invención se refiere a un procedimiento para producir una planta transgénica que comprende las etapas de:

a) proporcionar bacterias de una variante de cepa no patógena transgénica de la cepa K599 de *Agrobacterium* (NCPBP 2659) o de un derivado de dicha cepa, en el que dicha variante de cepa es capaz de infectar células vegetales, pero carece de propiedades inductoras del fenotipo de raíces pilosas y en el que dicha variante de cepa comprende además un ADN-T transgénico, y

10 b) co-cultivar una planta, célula de planta o tejido de planta con dichas bacterias, y

c) aislar o seleccionar y - opcionalmente - regenerar plantas que comprenden establemente integrado en su genoma dicho ADN-T transgénico.

15 Los procedimientos de la invención pueden usarse para transformar prácticamente todo tipo de plantas, preferentemente célula de planta, tejido de planta, o planta derivada de una planta seleccionada del grupo de plantas monocotiledóneas, plantas dicotiledóneas y plantas gimnospermas. Más preferentemente, la planta es de un género seleccionado del grupo que consiste en *Medicago*, *Lycopersicon*, *Brassica*, *Cucumis*, *Solanum*, *Juglans*, *Gossypium*, *Malus*, *Vitis*, *Antirrhinum*, *Populus*, *Fragaria*, *Arabidopsis*, *Picea*, *Capsicum*, *Chenopodium*, *Dendranthema*, *Pharbitis*, *Pinus*, *Pisum*, *Oryza*, *Zea*, *Triticum*, *Triticale*, *Secale*, *Lolium*, *Hordeum*, *Glycine*, *Pseudotsuga*, *Kalanchoe*, *Beta*, *Helianthus* y *Nicotiana*.

20 En una realización preferida de la invención, el ADN-T transgénico comprende al menos un gen marcador de selección expresable en planta.

25 Otra realización de la invención está relacionada con una variante de cepa no patógena de la cepa K599 de *Agrobacterium* (NCPBP 2659) o de un derivado de dicha cepa (denominada en lo sucesivo variante de cepa "desarmada"), en la que dicha variante de cepa es capaz de infectar células vegetales, pero carece de propiedades inductoras del fenotipo de raíces pilosas. Otra realización de la invención está relacionada con una variante de cepa no patógena transgénica de la cepa K599 de *Agrobacterium* (NCPBP 2659) o de un derivado de dicha cepa, en la que dicha variante de cepa es capaz de infectar células vegetales, pero carece de propiedades inductoras del fenotipo de raíces pilosas y en la que dicha variante de cepa comprende además un ADN-T transgénico.

30 En una realización preferida de la invención, dicha variante de cepa no patógena de la cepa K599 de *Agrobacterium* (NCPBP 2659) (o de un derivado de dicha cepa) es capaz de infectar células vegetales, para mediar en la transferencia de ADN-T en células vegetales, y para mediar en la inserción de ADN-T en el genoma de la planta, pero carece de las propiedades inductoras del fenotipo de raíces pilosas. Más preferentemente, esto se logra por la presencia de una variante de plásmido no patógeno del plásmido Ri pRi2659 (el plásmido Ri natural en la cepa K599 de *Agrobacterium*; NCPBP 2659) o un derivado de la misma. Dicha variante de plásmido no patógeno proporciona preferentemente todas las funciones requeridas para la infección y transformación de la célula de planta, pero carece de secuencias que provocan el fenotipo de raíces pilosas.

35 El derivado de la cepa K599 de *Agrobacterium* (NCPBP2659) es preferentemente una bacteria patógena de las plantas transmitida por la tierra, caracterizada por una secuencia intergénica de ARNr 16S-23S que comprende al menos un motivo de secuencia seleccionado del grupo que consiste en los motivos de secuencia descritos por SEC ID N°: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14. La variante de cepa no patógena puede comprender además una o más características seleccionadas del grupo que consiste en la presencia de genes *virA* o *virG* mutantes o quiméricos o la presencia de plásmidos super-virulentos. La variante de cepa no patógena de la cepa K599 de *Agrobacterium* (NCPBP2659) puede comprender una variante de plásmido no patógeno del plásmido pRi2659 (como se define más adelante).

45 Todavía otra realización de la invención está relacionada con una variante de plásmido no patógeno de pRi2659 (el plásmido Ri natural en la cepa K599 de *Agrobacterium*; NCPBP 2659) o un derivado de la misma, proporcionando dicha variante de plásmido las funciones requeridas para la infección y transformación de la célula de planta, pero que carece de secuencias que provocan el fenotipo de raíces pilosas (denominada en lo sucesivo la variante de plásmido "desarmado"). Preferentemente, especialmente cuando se usa en combinación con un ADN-T transgénico comprendido en un vector (binario) separado, dicha variante de plásmido "desarmado" no comprende elementos (tales como, por ejemplo, elementos de ADN-T) que puedan transferirse al genoma de la planta. Hay diversos medios para proporcionar una variante de plásmido "desarmado" tal. Esto puede realizarse haciendo disfuncionales los límites del ADN-T (por ejemplo, por mutagénesis) o, preferentemente, delecionando el ADN-T entero del plásmido Ri.

55 En una realización especialmente preferida de la invención, dicha variante de plásmido no patógeno comprende al menos una secuencia seleccionada del grupo de secuencias descritas por

- a) secuencias que comprenden una secuencia descrita por SEC ID N°: 25, o una secuencia de al menos 100 nucleótidos consecutivos de la secuencia descrita por SEC ID N°: 24, y
- b) secuencias que tienen una identidad de secuencias de al menos el 90 % con una secuencia como se describe por SEC ID N°: 24 o una secuencia de al menos 1000 nucleótidos consecutivos de la secuencia descrita por SEC ID N°: 24, y,
- c) secuencias que se hibridan en condiciones equivalentes a la unión o hibridación a 68 °C en una disolución que consiste en 5x SSPE, 1 % de SDS, 5x reactivo de Denhardt y 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado, seguido de lavado en una disolución que comprende 0,1 x SSPE y 0,1 % de SDS a 68 °C con una sonda que consiste en al menos 100 nucleótidos consecutivos de una secuencia como se describe por SEC ID N°: 24 o la secuencia complementaria a la misma.

La secuencia aislada de la versión desarmada del plásmido pRI2659 se proporciona en el presente documento. Así, una realización preferida de la invención se refiere a una secuencia de nucleótidos aislada seleccionada del grupo de secuencias descritas por

- a) secuencias que comprenden una secuencia descrita por SEC ID N°: 24, o una secuencia de al menos 100 nucleótidos consecutivos de la secuencia descrita por SEC ID N°: 24, y
- b) secuencias que tienen una identidad de secuencias de al menos el 90 % con una secuencia como se describe por SEC ID N°: 24 o una secuencia de al menos 1000 nucleótidos consecutivos de la secuencia descrita por SEC ID N°: 24, y,
- c) secuencias que se hibridan en condiciones equivalentes a la unión o hibridación a 68 °C en una disolución que consiste en 5x SSPE, 1 % de SDS, 5x reactivo de Denhardt y 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado, seguido de lavado en una disolución que comprende 0,1x SSPE y 0,1 % de SDS a 68 °C con una sonda que consiste en al menos 100 nucleótidos consecutivos de una secuencia como se describe por SEC ID N°: 24 o la secuencia complementaria a la misma.

Más preferentemente, dicha variante de plásmido no patógeno se describe por una secuencia de nucleótidos que describe el plásmido pRI2659 desarmado o un derivado anterior (como se ha definido anteriormente). Incluso más preferentemente o alternativamente, el derivado está codificando una proteína virD2 que tiene una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos el 85 % con la secuencia descrita por SEC ID N° 112. Se espera que dicha proteína virD2 sea un factor clave para el rendimiento potenciado en la transformación del plásmido pRI2659 desarmado. Así, otra realización de la invención se refiere a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

- a) la secuencia como se describe por SEC ID N°: 112 o secuencias de al menos 200 aminoácidos consecutivos de la misma,
- b) secuencias que tienen una identidad de secuencias de al menos el 85 % (preferentemente al menos el 90 % o el 92 %, más preferentemente al menos el 95 % o el 98 %, lo más preferentemente al menos el 99 %) con las secuencias descritas por SEC ID N°: 112.

Sin embargo, también se considera que las otras proteínas codificadas por el plásmido pRI2659 desarmado son útiles para la optimización de procesos de transformación, así otra realización de la invención se refiere a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

- a) la secuencia como se describe por cualquiera de SEC ID N°: 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 126, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 136, 137, 139, 140, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 154, 155, 156, 158, 159, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186 ó 187 o secuencias de al menos 200 aminoácidos consecutivos (preferentemente al menos 300 aminoácidos consecutivos, más preferentemente al menos 400 aminoácidos consecutivos, preferentemente todos los aminoácidos consecutivos) de la misma,
- b) secuencias que tienen una identidad de secuencias de al menos el 85 % (preferentemente al menos el 90 % o el 92 %, más preferentemente al menos el 95 % o el 98 %, lo más preferentemente al menos el 99 %) con una secuencia descrita por cualquiera de SEC ID N°: 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 126, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 136, 137, 139, 140, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 154, 155, 156, 158, 159, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186 ó 187.

Todavía otra realización de la invención se refiere a secuencias de ácidos nucleicos aisladas que codifican dichos polipéptidos. Estas secuencias pueden ser las secuencias naturales aisladas (como están comprendidas en el plásmido pRI2659) u otras secuencias derivadas basándose en la degeneración del código genético.

Por consiguiente, una realización preferida de la invención se refiere a una variante de plásmido no patógeno de pRi2659 o un derivado de la misma, en la que dicha variante de plásmido comprende las secuencias requeridas para la infección y transformación de la célula de planta del pRi2659 patógeno nativo o su derivado, pero carece del ADN-T, preferentemente la región descrita por la secuencia de aproximadamente la base 538 a aproximadamente la base 15519 de la secuencia caracterizada por el n° de acceso de GenBank AJ271050 (SEC ID N°: 4) o de aproximadamente la base 3644 a aproximadamente la base 18577 de la secuencia caracterizada por SEC ID N°: 26. Esta secuencia se corresponde con el ADN-T del plásmido Ri pRi2659 patógeno original como se proporciona en la cepa K599 de *Agrobacterium* patógena (NCPBP 2659). Más preferentemente, dicha variante de plásmido no patógeno es una secuencia que se hibrida bajo condiciones de alta rigurosidad (por ejemplo, equivalentes a la unión o hibridación a 68 °C en una disolución que consiste en 5x SSPE, 1 % de SDS, 5x reactivo de Denhardt y 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado, seguido de lavado en una disolución que comprende 0,1x SSPE y 0,1 % de SDS a 68 °C) con el plásmido Ri pRi2659 patógeno original como se proporciona en la cepa K599 de *Agrobacterium* patógena (NCPBP 2659), pero que no se hibrida bajo condiciones de alta rigurosidad con la secuencia de aproximadamente la base 538 a aproximadamente la base 15519 de la secuencia caracterizada por el n° de acceso de GenBank AJ271050 (SEC ID N°: 4) o de aproximadamente la base 3644 a aproximadamente la base 18577 de la secuencia caracterizada por SEC ID N°: 26.

Más preferentemente, el derivado de pRi2659 es un plásmido capaz de mediar en la transferencia de ADN-T de una bacteria transmitida por la tierra en una célula de planta caracterizado adicionalmente por

a) tener una homología de al menos el 90 % con el ADN que codifica el plásmido pRi2659 nativo (como está comprendido en la cepa K599 de *Agrobacterium* (NCPBP2659) o

b) hibridarse bajo condiciones de alta rigurosidad equivalentes a la unión o hibridación a 68 °C en una disolución que consiste en 5x SSPE, 1 % de SDS, 5x reactivo de Denhardt y 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado, seguido de lavado en una disolución que comprende 0,1x SSPE y 0,1 % de SDS a 68 °C con el plásmido pRi2659 nativo.

Preferentemente, el ADN-T en dicha variante de cepa no patógena transgénica de la cepa K599 de *Agrobacterium* (NCPBP 2659) o su derivado está comprendida en un plásmido de vector binario separado del plásmido que proporciona las características requeridas para la infección de la planta (tal como un plásmido Ti o Ri que carece de sus propiedades neoplásicas o inductoras de raíces pilosas). Preferentemente, el ADN-T está flanqueado por al menos la secuencia de límite derecho (más preferentemente por la secuencia de límite derecho e izquierdo). Se prefieren límites de Ti y/o Ri. En una realización preferida, dicho ADN-T transgénico comprende al menos un casete de expresión para conferir a dicha planta un rasgo agrónomicamente valioso. En otra realización preferida, dicho ADN-T comprende además al menos un gen marcador, que permite la selección y/o identificación de plantas, células vegetales o tejidos transformados.

Se ha demostrado que los límites de ADN-T del plásmido pRi2659 son especialmente eficaces en la transferencia de ADN-T y así en la generación de plantas transgénicas (especialmente plantas de soja transgénicas). Así, otra realización de la invención se refiere a ADN-T transgénico flanqueado por al menos un límite de ADN-T del plásmido pRi2659 de *Agrobacterium rhizogenes*, no comprendiendo dicho ADN-T transgénico secuencias que causen un fenotipo de raíces pilosas. Preferentemente, al menos una de dichas secuencias de límite se describe por SEC ID N°: 18 ó 19. Más preferentemente, dicho ADN-T transgénico comprende al menos un casete de expresión para conferir a dicha planta un rasgo agrónomicamente valioso o al menos un gen marcador, que permite la selección y/o identificación de plantas, células vegetales o tejidos transformados. Otro objeto de la invención se refiere a un vector transgénico que comprende dicho ADN-T transgénico de la invención.

Otras realizaciones de la invención se refieren a células u organismos no humanos que comprenden una secuencia de nucleótidos, una variante de plásmido no patógeno o un ADN-T transgénico de la invención. Preferentemente, dichas células u organismos no humanos están seleccionados del grupo que consiste en bacterias, levaduras, plantas, mamíferos e insectos. En una realización preferida, dicha célula u organismo es una bacteria transmitida por la tierra del género *Rhizobiaceae*. En otra realización preferida, dicha célula u organismo es célula de planta u organismo de planta, más preferentemente seleccionada del grupo de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas.

Otros objetivos, ventajas y características de la presente invención serán evidentes de la siguiente memoria descriptiva.

Descripción de los dibujos

Fig. 1A Dendrograma que demuestra la relación de cepas de *Agrobacteria* como se ha determinado por RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar) (Figura 2 de Llob 2003). Para la descripción de las diversas cepas véase la Tabla 1 a continuación. La cepa K599 de *Agrobacterium* (NCPBP 2659) bajo estas condiciones se agrupa en un grupo distinto de cultivares separado de las cepas de "*Agrobacterium tumefaciens*" tradicionales tales como C58 o Ach5, pero también de otras cepas de "*Agrobacterium rhizogenes*" tales como NCPBP 8196 o ATCC 15834.

Fig. 1B Dendrograma que demuestra la relación de cepas de *Agrobacterium* como se ha determinado por comparación de ARNr 16S. Las secuencias se compilan usando el programa Clustal W (Saitou 1987). Las cepas se describen por el n° de acceso de GenBank de sus ARNr 16S respectivos. Se evalúan las siguientes cepas:

ES 2 543 086 T3

Especie	Nº de acceso	Nombre alternativo / Nombre en el dendrograma (si es diferente del nº de acceso de GenBank)
<i>A. tumefaciens</i>	AB114201	
<i>A. tumefaciens</i>	AF388033	Cepa 52
<i>A. tumefaciens</i>	AF388030	Cepa 42
<i>A. tumefaciens</i>	AY306228	NCPPB 4042
<i>A. tumefaciens</i>	AY306224	CSL 3276
<i>A. tumefaciens</i>	AY306223	CSL 3139
<i>A. tumefaciens</i>	AY306222	
<i>A. tumefaciens</i>	D14500	
<i>A. tumefaciens</i>	AJ389902	NCPPB 1641
<i>A. tumefaciens</i>	AJ012209	C58
<i>A. tumefaciens</i>	S56774	C58
<i>A. tumefaciens</i>	AB102735	
<i>A. tumefaciens</i>	AB102734	
<i>A. tumefaciens</i>	AB102733	
<i>A. tumefaciens</i>	AB102732	
<i>A. spp.</i>	AY174112	JS71
<i>A. spp.</i>	D14506	
<i>A. spp.</i>	D14504	
<i>A. rhizogenes</i>	D14501	
<i>A. rhizogenes</i>	X67232	
<i>A. rhizogenes</i>	X67224	
<i>A. vitis</i>	D14502	
<i>A. vitis</i>	D12795	
<i>A. vitis</i>	X67225	
<i>R. vitis</i>	AB118158	
<i>R. vitis</i>	AB114418	
<i>A. vitis</i>	AJ389912	
<i>A. vitis</i>	AJ389911	
<i>A. rubi</i>	D14503	
<i>A. rubi</i>	X67228	
<i>A. rubi</i>	D12787	
<i>A. larrymoorei</i>	Z30542	Cepa de Ficus
<i>R. leguminosarum</i>	D14513	
<i>R. galegae</i>	D11343	

(continuación)

Especie	Nº de acceso	Nombre alternativo / Nombre en el dendrograma (si es diferente del nº de acceso de GenBank)
<i>S. meliloti</i>	D14509	
<i>S. fredii</i>	D14516	
<i>R. tropici</i>	D11344	
<i>A. rhizogenes</i>	K599	BPS 599
<i>A. tumefaciens</i>	AGL0	BPS 600
<i>A. tumefaciens</i>	AGL1	BPS 601
<i>A. tumefaciens</i>	MP90	BPS 602
<i>A. tumefaciens</i>	LBA4404	BPS 603

5 Fig. 1C Dendrograma que demuestra la relación de cepas de *Agrobacterium* como se ha determinado por la comparación de secuencias de aminoácidos de virD2. Las secuencias se compilan usando el programa Clustal W (Saitou 1987). Las cepas se describen por el nº de acceso de GenBank de sus proteínas virD2 respectivas. Se evalúan las siguientes cepas:

Especie	Nº de acceso	Nombre alternativo / Nombre en el dendrograma (si es diferente del nº de acceso de GenBank)
<i>Agrobacterium</i> K599		Ri2659 = K599
<i>A. tumefaciens</i>	AAL57024	TiAB2/73
<i>A. tumefaciens</i>	AD3250	
<i>A. tumefaciens</i>	B25063	TiA6
<i>A. tumefaciens</i>	B37763	TiC58
<i>A. rhizogenes</i>	CAA31351	A4b
<i>A. tumefaciens</i>	NP 053396	TiSAKURA
<i>A. tumefaciens</i>	NP 059814	Ti15955
<i>A. rhizogenes</i>	NP 066749	Ri1724
<i>A. tumefaciens</i>	NP 396503	TiC58 Cereon
<i>A. tumefaciens</i>	NP 536300	TiC58 UW
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110	NP 766684	
<i>Bordetella bronchiseptica</i> RB50	NP 887044	
<i>A. rhizogenes</i>	P13462	RiA4
<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4	ZP 00402780	
<i>Bordetella bronchiseptica</i> RB50	ZP 00613251	
<i>Azotobacter vinelandii</i> OP	ZP 00416447	

Fig. 2: Mapa de restricción física de la región de ADN-T del plásmido pRi2659 de *Agrobacterium*. Las flechas indican las regiones de límite derecho e izquierdo (de: Combard 1987).

10 Fig. 3 Expresión transitoria de GUS en soja (5 días) de explantes de meristemas axilares de hojas después de 2 días de co-cultivo con tanto AGL1 (pBPSMM192b) (I) como SHA016 (pBPSMM192b) (II). SHA016/pBPSMM192b es

una cepa de variante de K599 de *Agrobacterium* transgénica desarmada. AGL1/pBPSMM192b es una cepa de control. Las cepas SHA001 y SHA016 de *Agrobacterium* son cepas funcionalmente equivalentes de la cepa K599 de *Agrobacterium* (NCPBPB 2659) (pRi2659Δtet), es decir, que comprenden el plásmido pRi2659Δtet desarmado.

5 Fig. 4 Expresión estable de GUS en soja 35 días después de la infección usando explantes de meristemos axilares de hojas infectadas con SHA001 de *Agrobacterium* (pBPSEW008) (I, II, III: ejemplos para diversos explantes). SHA001 (pBPSEW008) es una cepa de variante de K599 de *Agrobacterium* transgénica desarmada (pRi2659Δtet).

10 Fig. 5 Plántulas de tomate transgénicas (A) usando SHA001 recombinante que contiene pBPSMM192b y expresión de GUS en las hojas transgénicas (B). SHA001 (pBPSMM192b) es una cepa de variante de K599 de *Agrobacterium* transgénica desarmada (pRi2659Δtet).

Fig. 6 Hibridación Southern de K599 marcada con tetraciclina desarmada (pRi2659Δtet). La pérdida de una banda de hibridación en eventos de doble cruce, cuando se sonda con límite derecho, indica la delección de la región de ADN-T de pRi2659 (Southern inferior). La banda de hibridación en Southern superior indica la presencia de ADN flanqueante fuera de la delección de ADN-T.

15 FD = hibridación con sonda del flanco derecho

FI = hibridación con sonda del flanco izquierdo

WT = no mutante

S = clon resultante de un cruce simple con respecto a la recombinación que produce una inserción que comprende tanto ADN-T no mutante como ADN-T de delección

20 CS = clon simple confirmado resultante del cruce simple con respecto al patrón de banda que coincide con el tamaño de banda calculado (producto intermedio)

D = clon resultante del cruce doble con respecto a la recombinación que produce la delección de ADN-T prevista (producto final previsto)

Fig. 7 Ensayo de raíz pilosa en cotiledones de soja

25 [a] La infección con K599 desarmada no produce raíces pilosas.

[b] La infección con K599 no mutante produce raíces pilosas.

Fig. 8 Expresión transitoria de GUS en células vegetales (para la descripción de la construcción véanse los ejemplos más adelante).

30 A: Transformación de embriones de maíz. SHA001 es una cepa de variante de K599 de *Agrobacterium* desarmada. LBA4404 es una cepa de control.

B: Transformación de otros tejidos de plantas con SHA001 en combinación con diversos vectores binarios (indicados debajo de las figuras; descripción véanse los ejemplos). I: Nodos axilares de soja en planta de semillero; II: Callo organogénico de soja; III: Cotiledones de tomate

35 Fig. 9: *Arabidopsis* transgénica T1 estable seleccionada con AHAS. La transformación se llevó a cabo con cepas MP90 de *Agrobacterium* (cepa 1 de control), cepa K599 de *Agrobacterium* no mutante (cepa 2 de control) y cepa K599 de *Agrobacterium* desarmada (SHA001), comprendiendo cada una tanto plásmido binario pBPSEW008 como pBPSMM192b, respectivamente.

40 Fig. 10: Tinción de GUS de *Arabidopsis* transgénica T1 estable. *Arabidopsis* transgénica T1 estable seleccionada con AHAS. La transformación se llevó a cabo con cepas MP90 de *Agrobacterium* (cepa 1 de control), cepa K599 de *Agrobacterium* no mutante (cepa 2 de control) y cepa K599 de *Agrobacterium* desarmada (SHA001), comprendiendo cada una tanto plásmido binario pBPSEW008 como pBPSMM192b, respectivamente.

Fig. 11: Mapa de la región de ADN-T del plásmido pRi2659 que incluye regiones flanqueantes derecha e izquierda.

45 Fig. 12: Diagrama de flujo que detalla las etapas usadas para construir los casetes de delección usados para desarmar la cepa K599.

Fig. 13:

A: Mapas de plásmidos del vector pBPSMM192b y pBPSMM232

B: Mapa de plásmidos del vector pBPSEW008

50 Fig. 14: A-E: Alineamiento de diversas regiones de secuencias intergénicas de ARNr 16S-23S de bacterias transmitidas por la tierra.

K599: Cepa K599 de *Agrobacterium* (NCPBPB 2659)

AE008980: C58 de *Agrobacterium tumefaciens*

AE009348: C58 de *Agrobacterium tumefaciens*

55 AE008265: C58 de *Agrobacterium tumefaciens*

AE007948: C58 de *Agrobacterium tumefaciens*

AE009201: C58 de *Agrobacterium tumefaciens*

U45329: *Agrobacterium vitis*. NCPBPB3554

60 AE102735: *Agrobacterium tumefaciens* (*Rhizobium radiobacter*) MAFF301001. La cepa C58 de *Agrobacterium* tiene 4 operones de ARNr. Éstos son los parientes conocidos más cercanos a la secuencia intergénica de ARNr 16S-23S de K599. Otra secuencia intergénica de ARNr 16S-23S de otras cepas de *Agrobacterium* tiene baja homología y no

se apiló bien. Esto muestra que esta región presenta variabilidad suficiente para ser usada como secuencia distintiva para diferenciar la cepa K599 de *Agrobacterium* de otras especies estrechamente relacionadas. La secuencia intergénica de ARNr 16S-23S es una región entre el ARNr 16S y 23S que normalmente codifica ARNt (tal como, por ejemplo, Ile, Ala, Asp, Trp).

5 Fig. 15 Hibridación Southern de plantas T1 y T0 de soja transformadas con la cepa K599 de *Agrobacterium* desarmada (pRi2659Δ). Se digirió ADN genómico con HindIII y se sondó con un gen *gus/INT*. Un único sitio HindIII está presente en el ADN-T. M = marcador de 1 kb; wt = ADN genómico no transformado; carriles 1-7, líneas T1 individuales; carril 8, planta T0.

10 Fig. 16 Alineamiento de diversas secuencias de aminoácidos de virD2 de especies de *Agrobacterium*. Mutaciones únicas que distinguen la proteína virD2 codificada por pRi2659 (SEC ID N°: 112) de sus homólogos conocidos están marcadas con asteriscos (*).

TiAB2/73: *Agrobacterium tumefaciens*

TiA6: *Agrobacterium tumefaciens*

Ti-SUKURA: *Agrobacterium tumefaciens*

15 RiA4: *Agrobacterium rhizogenes*

Ri1724: *Agrobacterium rhizogenes*

Ri2659: Cepa K599 de *Agrobacterium*

Definiciones generales

20 Abreviaturas: BAP - 6-bencilaminopurina; 2,4-D - ácido 2,4-diclorofenoxiacético; MS - medio de Mura-shige y Skoog; NAA - ácido 1-naftalenoacético; MES, ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico, IAA ácido indolacético; Kan: sulfato de kanamicina; GA3 - ácido giberélico; Timentin™: ticarcilina disódica/clavulanato potásico.

25 Debe entenderse que la presente invención no se limita a la metodología particular, protocolos, líneas celulares, especies o géneros de plantas, construcciones y reactivos descritos como tales. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento es con el fin de describir realizaciones particulares solo, y no pretende limitar el alcance de la presente invención, que se limitará solo por las reivindicaciones adjuntas. Debe observarse que, como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular “un”, “una”, “el” y “la” incluyen referencia plural, a menos que el contexto dicte claramente de otro modo. Así, por ejemplo, referencia a “un vector” es una referencia a uno o más vectores e incluye equivalentes de los mismos conocidos para aquellos expertos en la materia, etc.

30 El término “más o menos” se usa en el presente documento para significar aproximadamente, alrededor de, o en la región de. Cuando el término “aproximadamente” se usa conjuntamente con un intervalo numérico, modifica ese intervalo extendiendo los límites por encima y por debajo de los valores numéricos expuestos. En general, el término “más o menos” se usa en el presente documento para modificar un valor numérico por encima y por debajo del valor establecido por una varianza del 20 por ciento, preferentemente del 10 por ciento, arriba o abajo (mayor o menor).

35 Como se usa en el presente documento, la palabra “o” significa un miembro cualquiera de una lista particular y también incluye cualquier combinación de miembros de esa lista.

40 “Rasgo agrónomicamente valioso” incluye cualquier fenotipo en un organismo de planta que es útil o ventajoso para la producción de alimentos o productos alimenticios, que incluye partes de plantas y productos de plantas. También están incluidos productos agrícolas no alimenticios tales como papel, etc. Una lista parcial de rasgos agrónomicamente valiosos incluye resistencia a plagas, vigor, tiempo de desarrollo (tiempo hasta la recogida), contenido potenciado de nutrientes, novedosos patrones de crecimiento, aromas o colores, tolerancia a las sales, al calor, a la sequía y al frío y similares. Preferentemente, los rasgos agrónomicamente valiosos no incluyen genes marcadores de selección (por ejemplo, genes que codifican la resistencia a herbicidas o antibióticos usados solo para facilitar la detección o selección de células transformadas), genes de biosíntesis de hormonas que conducen a la producción de una hormona de planta (por ejemplo, auxinas, giberelinas, citoquininas, ácido abscísico y etileno que se usan solo para la selección), o genes indicadores (por ejemplo, luciferasa, glucuronidasa, cloranfenicol acetil transferasa (CAT, etc.)). Tales rasgos agrónomicamente valiosos importantes pueden incluir mejora de la resistencia a plagas (por ejemplo, Melchers 2000), vigor, tiempo de desarrollo (tiempo hasta la recogida), contenido potenciado de nutrientes, novedosos patrones de crecimiento, aromas o colores, tolerancia a las sales, al calor, a la sequía y al frío (por ejemplo, Sakamoto 2000; Saijo 2000; Yeo 2000; Cushman 2000) y similares. Aquellos expertos reconocerán que hay numerosos polinucleótidos de los que elegir para conferir estos y otros rasgos agrónomicamente valiosos.

55 El término “ácido nucleico” se refiere a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros o híbridos de los mismos en tanto forma mono como bicatenaria, sentido o antisentido. A menos que se indique lo contrario, una secuencia de ácidos nucleicos particular también engloba implícitamente variantes conservativamente modificadas de la misma (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados) y secuencias complementarias, además de la secuencia explícitamente indicada. El término “ácido nucleico” se usa intercambiamente en el presente documento con “gen”, “ADNc”, “ARNm”, “oligonucleótido” y “polinucleótido”.

60 La expresión “secuencia de ácidos nucleicos” se refiere a un polímero mono o bicatenario de bases de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos leídas del extremo 5' al 3'. Incluye ADN cromosómico, plásmidos auto-

replicantes, polímeros infecciosos de ADN o ARN y ADN o ARN que realiza una función principalmente estructural. “Secuencia de ácidos nucleicos” también se refiere a una lista consecutiva de abreviaturas, letras, caracteres o palabras, que representan nucleótidos. En una realización, un ácido nucleico puede ser una “sonda” que es un ácido nucleico relativamente corto, normalmente menos de 100 nucleótidos de longitud. Frecuentemente, una sonda de ácido nucleico tiene de aproximadamente 50 nucleótidos de longitud a aproximadamente 10 nucleótidos de longitud. Una “región diana” de un ácido nucleico es una porción de un ácido nucleico que se identifica que es de interés. Una “región codificante” de un ácido nucleico es la porción del ácido nucleico que se transcribe y traduce de un modo específico de secuencia para producir un polipéptido o proteína particular cuando se pone bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Se dice que la región codificante codifica un polipéptido o proteína tal.

El término “secuencia de nucleótidos de interés” se refiere a cualquier secuencia de nucleótidos, cuya manipulación puede considerarse deseable por cualquier motivo (por ejemplo, confieren cualidades mejoradas), por un experto habitual en la materia. Tales secuencias de nucleótidos incluyen, pero no se limitan a, secuencias codificantes de genes estructurales (por ejemplo, genes indicadores, genes de marcadores de selección, genes de resistencia a fármacos, factores de crecimiento, etc.) y secuencias reguladoras no codificantes que no codifican un ARNm o producto de proteína (por ejemplo, secuencia promotora, secuencia de poliadenilación, secuencia de terminación, secuencia potenciadora, etc.). Una secuencia de ácidos nucleicos de interés puede codificar preferentemente un rasgo agrónomicamente valioso.

El término “antisentido” se entiende que significa un ácido nucleico que tiene una secuencia complementaria a una secuencia diana, por ejemplo, una secuencia de ARN mensajero (ARNm), el bloqueo de cuya expresión se busca iniciar por hibridación con la secuencia diana.

El término “sentido” se entiende que significa un ácido nucleico que tiene una secuencia que es homóloga o idéntica a una secuencia diana, por ejemplo, una secuencia que se une a un factor de transcripción de proteínas y que participa en la expresión de un gen dado. Según una realización preferida, el ácido nucleico comprende un gen de interés y elementos que permiten la expresión de dicho gen de interés.

El término “gen” se refiere a una región codificante operativamente unida a secuencias reguladoras apropiadas que pueden regular de alguna manera la expresión del polipéptido. Un gen incluye regiones reguladoras sin traducir de ADN (por ejemplo, promotores, potenciadores, represores, etc.) que preceden (en la dirección 5') y que siguen (en la dirección 3') a la región codificante (marco de lectura abierto, ORF) además de, si procede, secuencias intercaladas (es decir, intrones) entre regiones codificantes individuales (es decir, exones). El término “gen estructural”, como se usa en el presente documento, pretende significar una secuencia de ADN que se transcribe en ARNm, que entonces se traduce en una secuencia de aminoácidos característica de un polipéptido específico.

El término “genoma” o “ADN genómico” es con referencia a la información genética heredable de un organismo huésped. Dicho ADN genómico comprende el ADN del núcleo (también denominado ADN cromosómico), pero también el ADN de los plástidos (por ejemplo, cloroplastos) y otros orgánulos celulares (por ejemplo, mitocondrias). Preferentemente, los términos genoma o ADN genómico es con referencia al ADN cromosómico del núcleo.

El término “ADN cromosómico” o “secuencia de ADN cromosómico” debe entenderse como el ADN genómico del núcleo celular independiente del estado del ciclo celular. Por tanto, el ADN cromosómico podría organizarse en cromosomas o cromátidas, podría condensarse o desenrollarse. Una inserción en el ADN cromosómico puede demostrarse y analizarse por diversos procedimientos conocidos en la técnica como, por ejemplo, análisis de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), análisis de transferencia Southern, hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH) y PCR *in situ*.

Como se usa en el presente documento, el término “región codificante”, cuando se usa en referencia a un gen estructural, se refiere a las secuencias de nucleótidos que codifican los aminoácidos encontrados en el polipéptido naciente como resultado de la traducción de una molécula de ARNm. La región codificante está limitada, en eucariotas, en el extremo 5' por el triplete de nucleótidos “ATG” que codifica la metionina iniciadora y en el extremo 3' por uno de los tres tripletes, que especifican codones de terminación (es decir, TAA, TAG, TGA). Además de contener intrones, formas genómicas de un gen también pueden incluir secuencias localizadas en tanto el extremo 5' como 3' de las secuencias que están presentes en el transcrito de ARN. Estas secuencias se denominan secuencias o regiones “flanqueantes” (estas secuencias flanqueantes se localizan 5' o 3' con respecto a las secuencias no traducidas presentes en el transcrito de ARNm). La región flanqueante de 5' puede contener secuencias reguladoras tales como promotores y potenciadores, que controlan o influyen en la transcripción del gen. La región flanqueante de 3' puede contener secuencias, que dirigen la terminación de la transcripción, después de la escisión y poliadenilación transcripcional.

Como se usa en el presente documento, el término “secuencia de aminoácidos” se refiere a una lista de abreviaturas, letras, caracteres o palabras que representan residuos de aminoácidos. Los aminoácidos pueden denominarse en el presente documento por tanto sus símbolos de tres letras como por los símbolos de una letra comúnmente conocidos recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB. Asimismo, los nucleótidos pueden denominarse por sus códigos de una letra comúnmente aceptados.

Los términos “polipéptido”, “péptido”, “oligopéptido”, “polipéptido”, “producto génico”, “producto de expresión” y “proteína” se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un polímero u oligómero de residuos de aminoácidos consecutivos.

5 El término “aislado”, como se usa en el presente documento, significa que un material se ha sacado de su entorno original. Por ejemplo, un polinucleótido o polipéptido que se produce naturalmente presente en un animal vivo no está aislado, pero el mismo polinucleótido o polipéptido, separado de algunos o todos los materiales coexistentes en el sistema natural, está aislado. Tales polinucleótidos pueden ser parte de un vector y/o tales polinucleótidos o polipéptidos podrían ser parte de una composición, y se aislarían porque tal vector o composición no es parte de su entorno original. Preferentemente, el término “aislado”, cuando se usa en relación con un ácido nucleico, como en
10 “una secuencia de ácidos nucleicos aislada”, se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que se identifica y se separa de al menos un ácido nucleico contaminante con el que está generalmente asociado en su fuente natural. Ácido nucleico aislado es ácido nucleico presente en una forma o escenario que es diferente de aquél en el que se encuentra en la naturaleza. A diferencia, los ácidos nucleicos no aislados son ácidos nucleicos tales como ADN y ARN que se encuentran en el estado en el que existen en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de ADN dada
15 (por ejemplo, un gen) se encuentra en el cromosoma de la célula huésped en proximidad a los genes vecinos; las secuencias de ARN, tales como una secuencia de ARNm específica que codifica una proteína específica, se encuentran en la célula como una mezcla con numerosos otros ARNm, que codifican una multitud de proteínas. Sin embargo, una secuencia de ácidos nucleicos aislada que comprende, por ejemplo, SEC ID N°: 18 incluye, a modo de ejemplo, tales secuencias de ácidos nucleicos en células que generalmente contienen SEC ID N°: 18 en la que la secuencia de ácidos nucleicos está en una localización cromosómica o extracromosómica diferente de la de las células naturales, o está de otro modo flanqueada por una secuencia de ácidos nucleicos diferente de aquella encontrada en la naturaleza. La secuencia de ácidos nucleicos aislada puede estar presente en forma monocatenaria o bicatenaria. Cuando una secuencia de ácidos nucleicos aislada va a utilizarse para expresar una proteína, la secuencia de ácidos nucleicos contendrá como mínimo al menos una porción de la hebra sentido o
20 codificante (es decir, la secuencia de ácidos nucleicos puede ser monocatenaria). Alternativamente, puede contener tanto las hebras sentido como antisentido (es decir, la secuencia de ácidos nucleicos puede ser bicatenaria).

Como se usa en el presente documento, el término “purificado” se refiere a moléculas, tanto secuencias nucleicas como de aminoácidos, que están sacadas de su entorno natural, aisladas o separadas. Una “secuencia de ácidos nucleicos aislada” es, por tanto, una secuencia de ácidos nucleicos purificada. Las moléculas “sustancialmente purificadas” están al menos el 60 % libres, preferentemente al menos el 75 % libres, y más preferentemente al menos el 90 % libres de otros componentes con los que están naturalmente asociados.
30

El término “no mutante”, “natural” o de “origen natural” significa, con respecto a un organismo, secuencia de polipéptidos o de ácidos nucleicos, que dicho organismo se produce naturalmente o está disponible en al menos un organismo que se produce naturalmente que no ha sido cambiado, mutado o manipulado de otro modo por el hombre.
35

Una “construcción de polinucleótido” se refiere a un ácido nucleico creado al menos parcialmente por procedimientos recombinantes. El término “construcción de ADN” es con referencia a una construcción de polinucleótido que consiste en desoxirribonucleótidos. La construcción puede ser mono- o, preferentemente, bicatenaria. La construcción puede ser circular o lineal. El experto está familiarizado con una variedad de formas para obtener una de una construcción de ADN. Las construcciones pueden prepararse por medio de técnicas de recombinación y clonación habituales como se describen, por ejemplo, en Maniatis 1989, Silhavy 1984 y Ausubel 1987.
40

Como se usa en el presente documento, los términos “complementario” o “complementariedad” se usan en referencia a secuencias de nucleótidos relacionadas por las reglas de apareamiento de bases. Por ejemplo, la secuencia 5'-AGT-3' es complementaria a la secuencia 5'-ACT-3'. La complementariedad puede ser “parcial” o “total”. Complementariedad “parcial” es cuando una o más bases de ácidos nucleicos no están emparejadas según las reglas de apareamiento de bases. Complementariedad “total” o “completa” entre ácidos nucleicos es cuando todas y cada una de las bases de ácidos nucleicos están emparejadas con otra base bajo las reglas de apareamiento de bases. El grado de complementariedad entre las hebras de ácidos nucleicos tiene efectos significativos sobre la eficiencia y fuerza de la hibridación entre hebras de ácidos nucleicos. Un “complemento” de una secuencia de ácidos nucleicos, como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de nucleótidos cuyos ácidos nucleicos muestran complementariedad total con los ácidos nucleicos de la secuencia de ácidos nucleicos.
45
50

Los términos “homología” o “identidad”, cuando se usan en relación con ácidos nucleicos, se refieren a un grado de complementariedad. Homología o identidad entre dos ácidos nucleicos se entiende como mediar en la identidad de la secuencia de ácidos nucleicos a lo largo, en cada caso, de la longitud entera de la secuencia, que se calcula comparando con ayuda del algoritmo de programa GAP (Wisconsin Package Versión 10.0, Universidad de Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), Madison, EE.UU.), fijándose los parámetros del siguiente modo:
55

Peso por hueco: 12

Peso de la longitud: 4

Apareamiento promedio: 2.912

Desapareamiento promedio: 2.003

Por ejemplo, una secuencia con al menos el 95 % de homología (o identidad) con la secuencia SEC ID N°: 20 al nivel de ácido nucleico se entiende que significa la secuencia que, tras la comparación con la secuencia SEC ID N°: 20 por el algoritmo de programa anterior con el parámetro anterior fijado, tiene al menos el 95 % de homología. Puede ser homología parcial (es decir, identidad parcial de menos del 100 %) u homología completa (es decir, identidad completa del 100 %).

Alternativamente, una secuencia parcialmente complementaria se entiende que es una que inhibe al menos parcialmente que una secuencia completamente complementaria se hibride con un ácido nucleico diana y se refiere a usar el término funcional "sustancialmente homólogo". La inhibición de la hibridación de la secuencia completamente complementaria con la secuencia diana puede examinarse usando un ensayo de hibridación (transferencia Southern o Northern, hibridación en disolución y similares) en condiciones de baja rigurosidad. Una secuencia sustancialmente homóloga o sonda (es decir, un oligonucleótido que puede hibridarse con otro oligonucleótido de interés) competirá con e inhibirá la unión (es decir, la hibridación) de una secuencia completamente homóloga con una diana en condiciones de baja rigurosidad. Esto no significa que las condiciones de baja rigurosidad sean tales que se permita la unión no específica; las condiciones de baja rigurosidad requieren que la unión de dos secuencias entre sí sea una interacción específica (es decir, selectiva). La ausencia de unión no específica puede probarse por el uso de una segunda diana que carece incluso de un grado parcial de complementariedad (por ejemplo, inferior a aproximadamente el 30 % de identidad); en ausencia de unión no específica la sonda no se hibridará con la segunda diana no complementaria.

Cuando se usa en referencia a una secuencia de ácidos nucleicos bicatenaria tal como un ADNc o clon genómico, el término "sustancialmente homólogo" se refiere a cualquier sonda que pueda hibridarse con cualquiera o ambas hebras de la secuencia de ácidos nucleicos bicatenaria en condiciones de baja rigurosidad como se describe más adelante. Cuando se usa en referencia a una secuencia de ácidos nucleicos monocatenaria, el término "sustancialmente homólogo" se refiere a cualquier sonda que pueda hibridarse con la secuencia de ácidos nucleicos monocatenaria en condiciones de baja rigurosidad como se describe más adelante.

El término "hibridación", como se usa en el presente documento, incluye "cualquier procedimiento por el que una hebra de ácido nucleico se une con una hebra complementaria mediante apareamiento de bases" (Coombs 1994). La hibridación y la fuerza de la hibridación (es decir, la fuerza de la asociación entre los ácidos nucleicos) está afectada por factores tales como el grado de complementariedad entre los ácidos nucleicos, rigurosidad de las condiciones implicadas, la Tm del híbrido formado y la relación de G:C dentro de los ácidos nucleicos.

Como se usa en el presente documento, el término "Tm" se usa en referencia a la "temperatura de fusión". La temperatura de fusión es la temperatura a la que una población de moléculas de ácidos nucleicos bicatenarias se disocia la mitad en hebras individuales. La ecuación para calcular la Tm de los ácidos nucleicos es muy conocida en la técnica. Como se indica por referencias estándar, puede calcularse una simple estimación del valor de Tm por la ecuación: $T_m = 81,5 + 0,41(\% \text{ de G+C})$, cuando un ácido nucleico está en disolución acuosa a NaCl 1 M [véase, por ejemplo, Anderson y Young, Quantitative Filter Hybridization, en Nucleic Acid Hybridization (1985)]. Otras referencias incluyen cálculos más sofisticados que tienen en cuenta características estructurales, así como de secuencia, para el cálculo de Tm.

Condiciones de baja rigurosidad cuando se usa en referencia a la hibridación de ácidos nucleicos comprenden condiciones equivalentes a la unión o hibridación a 68 °C en una disolución que consiste en 5x SSPE (43,8 g/l de NaCl, 6,9 g/l de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y 1,85 g/l de EDTA, pH ajustado a 7,4 con NaOH), 1 % de SDS, 5x reactivo de Denhardt [50x Denhardt contiene lo siguiente por 500 ml: 5 g de Ficoll (Tipo 400, Pharmacia), 5 g de BSA (fracción V; Sigma)] y 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado, seguido de lavado en una disolución que comprende 0,2x SSPE y 0,1 % de SDS a temperatura ambiente cuando se emplea una sonda de ADN de aproximadamente 100 a aproximadamente 1.000 nucleótidos de longitud.

Condiciones de alta rigurosidad cuando se usa en referencia a la hibridación de ácidos nucleicos comprenden condiciones equivalentes a la unión o hibridación a 68 °C en una disolución que consiste en 5x SSPE, 1 % de SDS, 5x reactivo de Denhardt y 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado, seguido de lavado en una disolución que comprende 0,1x SSPE y 0,1 % de SDS a 68 °C cuando se emplea una sonda de aproximadamente 100 a aproximadamente 1.000 nucleótidos de longitud.

El término "equivalente", cuando se hace en referencia a una condición de hibridación como se refiere a una condición de hibridación de interés, significa que la condición de hibridación y la condición de hibridación de interés producen la hibridación de secuencias de ácidos nucleicos que tienen el mismo intervalo de porcentaje (%) de homología. Por ejemplo, si una condición de hibridación de interés produce la hibridación de una primera secuencia de ácidos nucleicos con otras secuencias de ácidos nucleicos que tienen del 80% al 90 % de homología con la primera secuencia de ácidos nucleicos, entonces otra condición de hibridación se dice que es equivalente a la

condición de hibridación de interés si esta otra condición de hibridación también produce la hibridación de la primera secuencia de ácidos nucleicos con las otras secuencias de ácidos nucleicos que tienen del 80% al 90 % de homología con la primera secuencia de ácidos nucleicos.

5 Cuando se usa en referencia a la hibridación de ácidos nucleicos, la materia sabe bien que pueden emplearse numerosas condiciones equivalentes que comprenden tanto condiciones de baja como de alta rigurosidad; se consideran factores tales como la longitud y la naturaleza (ADN, ARN, composición de bases) de la sonda y naturaleza de la diana (ADN, ARN, composición de bases, presentes en disolución o inmovilizadas, etc.) y la concentración de las sales y otros componentes (por ejemplo, la presencia o ausencia de formamida, sulfato de dextrano, polietilenglicol) y la disolución de hibridación puede variarse para generar condiciones de tanto hibridación
10 de baja como de alta rigurosidad diferentes de, pero equivalentes a, las condiciones enumeradas anteriormente. Aquellos expertos en la materia saben que, aunque pueden preferirse mayores rigurosidades para reducir o eliminar la unión no específica, pueden preferirse menores rigurosidades para detectar un mayor número de secuencias de ácidos nucleicos que tienen diferentes homologías.

15 “Transgén”, “transgénico” o “recombinante” se refiere a un polinucleótido manipulado por el hombre o una copia o complemento de un polinucleótido manipulado por el hombre. Por ejemplo, un casete de expresión transgénico que comprende un promotor operativamente ligado a un segundo polinucleótido puede incluir un promotor que es heterólogo al segundo polinucleótido como resultado de la manipulación por el hombre (por ejemplo, por procedimientos descritos en Sambrook 1989, o Current Protocols in Molecular Biology, volúmenes 1-3, John Wiley & Sons, Inc. (1994-1998)) de un ácido nucleico aislado que comprende el casete de expresión. En otro ejemplo, un
20 casete de expresión recombinante puede comprender polinucleótidos combinados de tal forma que sea extremadamente poco probable que los polinucleótidos se encuentren en la naturaleza. Por ejemplo, sitios de restricción o secuencias de vectores plasmídicos manipuladas por el hombre pueden flanquearse o separarse de un promotor del segundo polinucleótido. Un experto reconocerá que los polinucleótidos pueden manipularse de muchas formas y no se limitan a los ejemplos anteriores.

25 El término “transgénico” o “recombinante”, como se usa en el presente documento (por ejemplo, con respecto a una célula de planta o planta), pretende referirse a células y/o plantas que contienen un transgén, o cuyo genoma ha sido alterado por la introducción de un transgén, o que tienen genes exógenos o secuencias de ADN incorporadas, que incluyen, pero no se limitan a, genes o secuencias de ADN que quizás no están normalmente presentes, genes normalmente no transcritos y traducidos (“expresados”) en un tipo de célula dado, o cualquier otro gen o secuencia
30 de ADN que se desee introducir en la célula no transformada y/o planta, tal como genes que normalmente pueden estar presentes en la célula no transformada y/o planta, pero que se desea que tenga expresión alterada. Preferentemente, el término “recombinante”, con respecto a los ácidos nucleicos como se usa en el presente documento, significa que el ácido nucleico está covalentemente unido y es adyacente a un ácido nucleico con el que no es adyacente en su entorno natural. Pueden producirse células, tejidos y plantas transgénicos por varios procedimientos que incluyen la introducción de un “transgén” que comprende ácido nucleico (normalmente ADN) en
35 una célula diana o integración del transgén en un cromosoma de una célula diana a modo de intervención humana, tal como por los procedimientos descritos en el presente documento.

40 El término “transgén”, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier secuencia de ácidos nucleicos que se introduce en el genoma de una célula por manipulaciones experimentales. Un transgén puede ser una “secuencia de ADN endógena”, o una “secuencia de ADN heteróloga” (es decir, “ADN extraño”). El término “secuencia de ADN endógena” se refiere a una secuencia de nucleótidos que se encuentra naturalmente en la célula en la que se introduce, mientras que no contenga ninguna modificación (por ejemplo, una mutación puntual, la presencia de un gen marcador de selección, etc.) con respecto a la secuencia que se produce naturalmente.

45 El término “transgén” o “transgénico” con respecto a, por ejemplo, una secuencia de ácidos nucleicos (o un organismo, construcción de expresión o vector que comprende dichas secuencias de ácidos nucleicos) se refiere a todas aquellas construcciones que se originan por manipulaciones experimentales en las que tanto

a) dichas secuencias de ácidos nucleicos, o

b) una secuencia de control genético operativamente asociada a dichas secuencias de ácidos nucleicos a), por ejemplo, un promotor, como

50 c) (a) y (b)

no está localizada en su entorno genético natural o se ha modificado por manipulaciones experimentales, siendo un ejemplo de una modificación una sustitución, adición, delección, inversión o inserción de uno o más residuos de nucleótidos. Entorno genético natural se refiere al locus cromosómico natural en el organismo de origen, o a la presencia en una biblioteca genómica. En el caso de una biblioteca genómica, el entorno genético natural de la
55 secuencia de ácidos nucleicos se retiene preferentemente, al menos en parte. El entorno flanquea la secuencia de ácidos nucleicos al menos en un lado y tiene una secuencia de al menos 50 pb, preferentemente al menos 500 pb, especialmente preferentemente al menos 1.000 pb, muy especialmente preferentemente al menos 5.000 pb, de longitud. Una construcción de expresión que se produce naturalmente, por ejemplo, la combinación que se produce

naturalmente de un promotor con el gen correspondiente, se vuelve una construcción de expresión transgénica cuando se modifica por procedimientos "artificiales" sintéticos no naturales tales como, por ejemplo, mutagenización. Tales procedimientos se han descrito (documentos US 5.565.350; WO 00/15815).

5 Los términos "secuencia de ácidos nucleicos heteróloga" o "ADN heterólogo" se usan indistintamente para referirse a una secuencia de nucleótidos, que se liga a, o se manipula para ligarse a, una secuencia de ácidos nucleicos con la que no está ligada en la naturaleza, o con la que se liga en una localización diferente en la naturaleza. El ADN heterólogo no es endógeno para la célula en la que se introduce, pero ha sido obtenido a partir de otra célula. El ADN heterólogo también incluye una secuencia de ADN endógena, que contiene alguna modificación. Generalmente, aunque no necesariamente, el ADN heterólogo codifica ARN y proteínas que normalmente no se producen por la célula en la que se expresa. Ejemplos de ADN heterólogo incluyen genes indicadores, secuencias reguladoras de la transcripción y traducción, proteínas de marcador de selección (por ejemplo, proteínas que confieren resistencia a fármacos), etc. Preferentemente, el término "transgénico" o "recombinante" con respecto a una secuencia reguladora (por ejemplo, un promotor de la invención) significa que dicha secuencia reguladora está covalentemente unida y es adyacente a un ácido nucleico al que no es adyacente en su entorno natural.

15 El término "gen extraño" se refiere a cualquier ácido nucleico (por ejemplo, secuencia de genes) que se introduce en el genoma de una célula por manipulaciones experimentales y puede incluir secuencias de genes encontradas en esa célula mientras que el gen introducido contiene alguna modificación (por ejemplo, una mutación puntual, la presencia de un gen marcador de selección, etc.) con respecto al gen que se produce naturalmente.

20 Polipéptidos o proteínas "recombinantes" se refieren a polipéptidos o proteínas producidos por técnicas de ADN recombinante, es decir, producidos a partir de células transformadas por una construcción de ADN recombinante exógena que codifica el polipéptido o proteína deseada. Los ácidos nucleicos recombinantes y polipéptido también pueden comprender moléculas, que como tales no existen en la naturaleza, pero están modificadas, cambiadas, mutadas o manipuladas de otro modo por el hombre. Preferentemente, un "polipéptido recombinante" es un polipéptido que no se produce naturalmente que se diferencia en la secuencia de un polipéptido que se produce naturalmente por al menos un residuo de aminoácido. Procedimientos preferidos para producir dicho polipéptido recombinante y/o ácido nucleico pueden comprender mutagénesis dirigida o no dirigida, barajado de ADN u otros procedimientos de recombinación recursiva.

El término "organismo genéticamente modificado" u "OGM" se refiere a cualquier organismo que comprenda ADN de transgén. Organismos a modo de ejemplo incluyen plantas, animales y microorganismos.

30 El término "célula" o "célula de planta", como se usa en el presente documento, se refiere a una célula individual. El término "células" se refiere a una población de células. La población puede ser una población pura que comprende un tipo de célula. Asimismo, la población puede comprender más de un tipo de célula. En la presente invención, no hay límite al número de tipos de células que una población de células puede comprender. Las células pueden estar sincronizadas o no sincronizadas. Una célula de planta dentro del significado de la presente invención puede estar aislada (por ejemplo, en cultivo en suspensión) o estar comprendida en un tejido de planta, órgano de planta o planta en cualquier etapa de desarrollo.

El término "órgano", con respecto a una planta (u "órgano de planta"), significa partes de una planta y puede incluir (pero no debe limitarse a), por ejemplo, raíces, frutos, brotes, tallo, hojas, anteras, sépalos, pétalos, polen, semillas, etc.

40 El término "tejido", con respecto a una planta (o "tejido de planta"), significa la disposición de múltiples células vegetales que incluyen tejidos de plantas diferenciados y no diferenciados. Los tejidos de planta pueden constituir parte de un órgano de planta (por ejemplo, la epidermis de una hoja de planta), pero también pueden constituir tejidos tumorales (por ejemplo, tejido de callo) y diversos tipos de células en cultivo (por ejemplo, células individuales, protoplastos, embriones, callos, cuerpos similares a protocormos, etc.). El tejido de planta puede estar en planta, en cultivo de órgano, cultivo de tejido o cultivo celular.

El término "planta", como se usa en el presente documento, se refiere a una pluralidad de células vegetales, que se diferencian en gran medida en una estructura que está presente en cualquier etapa de desarrollo de una planta. Tales estructuras incluyen uno o más órganos de planta que incluyen, pero no se limitan a, fruto, brote, tallo, hoja, pétalo de flor, etc. Preferentemente, el término "planta" incluye plantas enteras, órganos/estructuras vegetativas del brote (por ejemplo, hojas, tallos y tubérculos), raíces, flores y órganos/estructuras florales (por ejemplo, brácteas, sépalos, pétalos, estámenes, carpelos, anteras y óvulos), semillas (incluyendo embrión, endospermo y envuelta de la semilla) y frutos (el ovario maduro), tejidos de planta (por ejemplo, tejido vascular, tejido fundamental y similares) y células (por ejemplo, células guarda, óvulos, tricomas y similares) y progenie de la misma. La clase de plantas que pueden usarse en el procedimiento de la invención es generalmente tan amplia como la clase de plantas superiores e inferiores aceptadas para las técnicas de transformación, que incluyen angiospermas (plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas), gimnospermas, helechos y algas multicelulares. Incluye plantas de una variedad de niveles de ploidía, que incluyen aneuploide, poliploide, diploide, haploide y hemigigótica. Incluido dentro del alcance de la invención están todos los géneros y especies de plantas superiores e inferiores del reino de las plantas. Además, están incluidas las plantas maduras, semilla, brotes y plantas de semillero, y partes, material de propagación (por

ejemplo, semillas y fruto) y cultivos, por ejemplo, cultivos celulares, derivados de las mismas. Se prefieren plantas y materiales de planta de las siguientes familias de plantas: *Amaranthaceae*, *Brassicaceae*, *Caryophyllaceae*, *Chenopodiaceae*, *Compositae*, *Cucurbitaceae*, *Labiatae*, *Leguminosae*, *Papilionoideae*, *Liliaceae*, *Linaceae*, *Malvaceae*, *Rosaceae*, *Saxifragaceae*, *Scrophulariaceae*, *Solanaceae*, *Tetragoniaceae*.

- 5 Las plantas anuales, perennes, monocotiledóneas y dicotiledóneas son organismos huésped preferidos para la generación de plantas transgénicas. El uso del sistema de recombinación, o procedimiento según la invención, es además ventajoso en todas las plantas ornamentales, árboles forestales, frutales u ornamentales, flores, flores cortadas, arbustos o césped. Dicha planta puede incluir, pero no debe limitarse a, briofitas tales como, por ejemplo, Hepaticae (hepáticas) y Musci (musgos); pteridofitas tales como helechos, cola de caballo y licopodios;
- 10 gimnospermas tales como coníferas, cicadáceas, Ginkgo y Gnetales; algas tales como Chlorophyceae, Phaeophyceae, Rhodophyceae, Myxophyceae, Xanthophyceae, Bacillariophyceae (diatomeas) y Euglenophyceae.

- Plantas para los fines de la invención pueden comprender las familias de Rosaceae tales como rosa, Ericaceae tales como rododendros y azaleas, *Euphorbiaceae* tales como poinsetias y crotón, *Caryophyllaceae* tales como claveles, *Solanaceae* tales como petunias, *Gesneriaceae* tal como violeta africana, *Balsaminaceae* tal como mimosa, *Orchidaceae* tal como orquídeas, *Iridaceae* tal como gladiolos, iris, fresias y crocus, *Compositae* tales como caléndula, *Geraniaceae* tales como geranios, *Liliaceae* tal como *Drachaena*, *Moraceae* tal como ficus, *Araceae* tal como filodendro y muchas otras.
- 15

- Las plantas transgénicas según la invención se seleccionan además en particular de entre plantas de cultivo dicotiledóneas tales como, por ejemplo, de las familias de las Leguminosae tales como guisante, alfalfa y soja; la familia de las *Umbelliferae*, particularmente el género *Daucus* (muy particularmente las especies carota (zanahoria)) y *Apium* (muy particularmente las especies *graveolens* var. dulce (apio)) y muchas otras; la familia de las *Solanaceae*, particularmente el género *Lycopersicon*, muy particularmente las especies *esculentum* (tomate) y el género *Solanum*, muy particularmente las especies *tuberosum* (patata) y *melongena* (berenjena), tabaco y muchas otras; y el género *Capsicum*, muy particularmente las especies *annum* (pimienta) y muchas otras; la familia de las Leguminosae, particularmente el género *Glycine*, muy particularmente las especies *max* (soja) y muchas otras; y la familia de las Cruciferae, particularmente el género *Brassica*, muy particularmente las especies *napus* (colza oleaginosa), *campestris* (remolacha), *oleracea* cv Tastie (col), *oleracea* cv Snowball Y (coliflor) y *oleracea* cv Emperor (brócoli); y el género *Arabidopsis*, muy particularmente las especies *thaliana* y muchas otras; la familia de las *Compositae*, particularmente el género *Lactuca*, muy particularmente las especies *sativa* (lechuga) y muchas otras.
- 20
- 25
- 30

- Las plantas transgénicas según la invención se seleccionan en particular de entre plantas de cultivo monocotiledóneas, tales como, por ejemplo, cereales tales como trigo, cebada, sorgo y mijo, centeno, tritical, maíz, arroz o avena, y caña de azúcar. Adicionalmente se prefieren árboles tales como manzano, peral, membrillero, ciruelo, cerezo, melocotonero, nectarino, albaricoquero, papayo, mango, y otras especies leñosas que incluyen árboles coníferos y caducifolios tales como chopo, pino, secuoya, cedro, roble, etc. Son especialmente preferidos *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum*, colza oleaginosa, soja, grano (maíz), trigo, linaza, patata y tagetes.
- 35

- La “eficiencia de transformación” o “frecuencia de transformación”, como se usa en el presente documento, puede medirse por el número de células transformadas (u organismos transgénicos cultivados a partir de células transformadas individuales) que se recuperan bajo condiciones experimentales estándar (es decir, estandarizadas o normalizadas con respecto a la cantidad de células puestas en contacto con ADN extraño, cantidad de ADN administrado, tipo y condiciones de administración de ADN, condiciones generales de cultivo, etc.). Por ejemplo, cuando se usan pecíolos aislados como material de partida para la transformación, la frecuencia de transformación puede expresarse como el número de brotes transgénicos (o líneas de plantas fértiles resultantes) obtenidos por pecíolo transformado.
- 40

- El término “expresión” se refiere a la biosíntesis de un producto génico. Por ejemplo, en el caso de un gen estructural, la expresión implica la transcripción del gen estructural en ARNm y, opcionalmente, la posterior traducción de ARNm en uno o más polipéptidos.
- 45

- El término “casete de expresión” o “construcción de expresión”, como se usa en el presente documento, pretende significar la combinación de cualquier secuencia de ácidos nucleicos que va a expresarse en enlace operable con una secuencia promotora y, opcionalmente, elementos adicionales (como, por ejemplo, secuencias terminadoras y/o de poliadenilación) que facilitan la expresión de dichas secuencias de ácidos nucleicos.
- 50

- El término “promotor”, “elemento promotor” o “secuencia promotora”, como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de ADN que cuando se liga a una secuencia de nucleótidos de interés puede controlar la transcripción de la secuencia de nucleótidos de interés en ARNm. Un promotor está normalmente localizado, aunque no necesariamente, 5' (es decir, en la dirección 5') de una secuencia de nucleótidos de interés (por ejemplo, proximal al sitio de iniciación de la transcripción de un gen estructural) cuya transcripción en ARNm controla, y proporciona un sitio para la unión específica por ARN polimerasa y otros factores de transcripción para la iniciación de la transcripción. Una secuencia de polinucleótidos es “heteróloga a” un organismo o una segunda secuencia de polinucleótidos si se origina a partir de una especie extraña, o, si es de la misma especie, se modifica a partir de su
- 55

forma original. Por ejemplo, un promotor operativamente ligado a una secuencia codificante heteróloga se refiere a una secuencia codificante de una especie diferente de la que se derivó un promotor, o, si es de la misma especie, una secuencia codificante que no está naturalmente asociada a un promotor (por ejemplo, una secuencia codificante genéticamente manipulada o un alelo de un ecotipo o variedad diferente). Promotores adecuados pueden derivarse de plantas o patógenos de plantas como, por ejemplo, virus de plantas.

Si un promotor es un promotor inducible, entonces la tasa de transcripción aumenta en respuesta a un agente inductor. A diferencia, la tasa de transcripción no está regulada por un agente inductor si un promotor es un promotor constitutivo. Es decir, un promotor puede regularse en una manera específica de tejido o preferida de tejido de forma que solo sea activa en la transcripción de la región codificante asociada en un tipo(s) de tejido específico tal como hojas, raíces o meristemo. El término “específico de tejido”, como se aplica a un promotor, se refiere a un promotor que puede dirigir la expresión selectiva de una secuencia de nucleótidos de interés a un tipo específico de tejido (por ejemplo, pétalos) en ausencia relativa de expresión de la misma secuencia de nucleótidos de interés en un tipo diferente de tejido (por ejemplo, raíces). La especificidad por tejido de un promotor puede evaluarse, por ejemplo, ligando operativamente un gen indicador a la secuencia promotora para generar una construcción indicadora, introduciendo la construcción indicadora en el genoma de una planta de forma que la construcción indicadora se integre en cada tejido de la planta transgénica resultante y detectando la expresión del gen indicador (por ejemplo, detectando ARNm, proteína, o la actividad de una proteína codificada por el gen indicador) en diferentes tejidos de la planta transgénica. La detección de un mayor nivel de expresión del gen indicador en uno o más tejidos con respecto al nivel de expresión del gen indicador en otros tejidos muestra que un promotor es específico para los tejidos en los que se detectan mayores niveles de expresión. El término “específico del tipo de célula”, como se aplica a un promotor, se refiere a un promotor que puede dirigir la expresión selectiva de una secuencia de nucleótidos de interés a un tipo específico de célula en ausencia relativa de expresión de la misma secuencia de nucleótidos de interés en un tipo de célula diferente dentro del mismo tejido. El término “específico del tipo de célula”, cuando se aplica a un promotor, también significa un promotor que puede promover la expresión selectiva de una secuencia de nucleótidos de interés en una región dentro de un tejido individual. La especificidad por el tipo de célula de un promotor puede evaluarse usando procedimientos muy conocidos en la técnica, por ejemplo, tinción de la actividad de GUS (como se describe, por ejemplo, en el Ejemplo 7) o tinción inmunohistoquímica. Brevemente, se incorporan secciones de tejido en parafina y se hacen reaccionar las secciones de parafina con un anticuerpo primario que es específico para el producto de polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos de interés cuya expresión está controlada por un promotor. Se dejó que un anticuerpo secundario marcado (por ejemplo, conjugado con peroxidasa), que es específico para el anticuerpo primario, se uniera al tejido seccionado y la unión específica se detectó (por ejemplo, con avidina/biotina) por microscopía. Los promotores pueden ser constitutivos o regulables. El término “constitutivo”, cuando se hace en referencia a un promotor, significa que un promotor puede dirigir la transcripción de una secuencia de ácidos nucleicos operativamente ligada en ausencia de un estímulo (por ejemplo, choque térmico, sustancias químicas, luz, etc.). Normalmente, los promotores constitutivos pueden dirigir la expresión de un transgén en sustancialmente cualquier célula y cualquier tejido. A diferencia, un promotor “regulable” es uno que puede dirigir un nivel de transcripción de una secuencia de ácidos nucleicos operativamente ligada en presencia de un estímulo (por ejemplo, choque térmico, sustancias químicas, luz, etc.) que es diferente del nivel de transcripción de la secuencia de ácidos nucleicos operativamente ligada en ausencia del estímulo.

Si se desea la expresión de un gen en todos los tejidos de una planta transgénica u otro organismo, puede usarse un promotor “constitutivo”, que es generalmente activo bajo la mayoría de las condiciones y estados medioambientales de desarrollo o diferenciación celular (Benfey 1989). Promotores útiles para plantas también incluyen aquellos obtenidos de plásmidos Ti o Ri, de células vegetales, virus de plantas u otros organismos cuyos promotores se encuentra que son funcionales en plantas. Promotores bacterianos que funcionan en las plantas, y así son adecuados para su uso en los procedimientos de la invención, incluyen el promotor de la octopina sintetasa, el promotor de la nopalina sintasa y el promotor de la manopina sintetasa. Un promotor que controla la expresión del gen del rasgo y/o marcador de selección puede ser constitutivo. Promotores constitutivos adecuados para su uso en plantas incluyen, por ejemplo, la región de iniciación de la transcripción 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) (Franck 1980; Odell 1985; Shewmaker 1985; Gardner 1986), la región de iniciación de la transcripción 19S (documentos US 5.352.605 y WO 84/02913) y promotores de la región VI, el 1'- o 2'-promotor derivado de ADN-T de *Agrobacterium tumefaciens*, y otros promotores activos en células vegetales que son conocidos para aquellos expertos en la materia. Otros promotores adecuados incluyen el promotor de transcrito de longitud completa del virus del mosaico de la escrofularia, promotores de actina (por ejemplo, el promotor de la actina de arroz; McElroy 1990), promotores de histona, promotores de tubulina o el promotor de manopina sintasa (MAS). Otros promotores de plantas constitutivos incluyen diversos promotores de ubiquitina o poliubiquitina (Sun 1997; Christensen 1989, 1992; Bruce 1989; Holtorf 1995), los promotores mas, Mac o DoubleMac (documento US 5.106.739; Comai 1990), el promotor de ubiquitina (Holtorf 1995), promotor de la subunidad pequeña de Rubisco (SSU) (documento US 4.962.028), el promotor de legumina B (nº de acceso de GenBank X03677), un promotor de la nopalina sintasa (NOS) de *Agrobacterium*, el promotor dual TR, el promotor de la octopina sintasa (OCS) de *Agrobacterium*, el promotor Smas, el promotor cinamil alcohol deshidrogenasa (documento US 5.683.439), los promotores de las subunidades de ATPasa vacuolar, el promotor pEMU (Last 1991); el promotor MAS (Velten 1984), el promotor de la histona H3 de maíz (Lepetit 1992; Atanassova 1992), promotor de α -conglucina, el promotor de faseolina, el promotor de ADH y promotores de choque térmico, el promotor de nitrilasa de *Arabidopsis thaliana* (documento WO 03/008596; nº de acceso de GenBank: U38846, nucleótidos 3.862 a 5.325 o incluso 5342), promotor de una proteína

rica en prolina de trigo (documento WO 91/13991), un promotor del gen *ptxA* de *Pisum sativum*, y otras regiones de iniciación de la transcripción de diversos genes de plantas conocidas para aquellos expertos en la materia.

Por supuesto, los promotores pueden regular la expresión todo el tiempo en solo uno o algunos tejidos. Alternativamente, un promotor puede regular la expresión en todos los tejidos, pero solo en un momento de tiempo del desarrollo específico. Como se observa anteriormente, el promotor de la escisión (es decir, un promotor que está asociado al polinucleótido que escinde ADN específico de secuencia) es generalmente no constitutivo, pero en su lugar es activo durante solo parte del ciclo de vida o al menos un tejido del organismo transgénico. Puede usarse un promotor que dirija la expresión de un gen de interés en un tejido específico o esté de otro modo bajo control medioambiental o de desarrollo más preciso. Ejemplos de condiciones medioambientales que pueden afectar la transcripción por promotores inducibles incluyen ataque por patógenos, condiciones anaerobias, etileno o la presencia de luz. Promotores bajo el control del desarrollo incluyen promotores que inician la transcripción solo en ciertos tejidos u órganos, tales como hojas, raíces, fruto, semillas o flores, o partes de los mismos. La operación de un promotor puede también variar dependiendo de su localización en el genoma. Así, un promotor inducible puede ser completamente o parcialmente constitutivo en ciertas localizaciones. Ejemplos de promotores de plantas específicos de tejido bajo el control del desarrollo incluyen promotores que inician la transcripción solo en ciertos tejidos, tales como fruto, semillas, flores, anteras, ovario, polen, el meristemo, flores, hojas, tallos, raíces y semillas. El promotor ES específico de tejido del tomate es particularmente útil para dirigir la expresión génica de manera que un producto génico deseado se localice en frutos (véanse, por ejemplo, Lincoln 1988; Deikman 1988, 1992). Otros promotores específicos de semilla adecuados incluyen aquellos derivados de los siguientes genes: MAC1 de maíz (Sheridan 1996), Cat3 de maíz (GenBank nº L05934, Abler 1993), el gen que codifica oleosina 18kD de maíz (GenBank nº J05212, Lee 1994) *viviparous-1* de *Arabidopsis* (nº de acceso de Genbank U93215), el gen que codifica oleosina de *Arabidopsis* (nº de acceso de Genbank Z17657), *Atmyc1* de *Arabidopsis* (Urao 1996), la familia de genes de la proteína de almacenamiento de semillas 2S de *Arabidopsis* (Conceicao 1994), el gen que codifica oleosina 20kD de *Brassica napus* (GenBank nº M63985), *napina* de *Brassica napus* (GenBank nº J02798, Josefsson 1987), la familia del gen de *napina* (por ejemplo, de *Brassica napus*; Sjobahl 1995), documento US 5.608.152; Stalberg 1996), el gen que codifica la proteína de almacenamiento de semillas 2S de *Brassica napus* (Dasgupta 1993), los genes que codifican oleosina A (nº de acceso de Genbank U09118) y oleosina B (GenBank nº U09119) de soja, el gen que codifica la proteína rica en azufre de bajo peso molecular de soja (Choi 1995), el gen faseolina (documento US 5.504.200, Bustos 1989; Murai 1983; Sengupta-Gopalan 1985), el gen de albúmina 2S (Joseffson 1987), el gen de legumina (Shirsa 1989), el gen USP (proteína de semilla desconocida) (Baumlein 1991), el gen de la proteína de unión a sacarosa (documento WO 00/26388), el gen B4 de legumina (LeB4; Baumlein 1991a,b; 1992; Fiedler 1995), el gen de oleosina de *Arabidopsis* (documento WO 98/45461), el gen *Bce4* de *Brassica* (documento WO 91/13980), genes que codifican la "glutenina de alto peso molecular" (HMWG), gliadina, enzima de ramificación, ADP-glucosa piro-fosfatasa (AGPasa) o almidón sintasa. Otros promotores preferidos son aquellos que permiten la expresión específica de semillas en monocotiledóneas tales como maíz, cebada, trigo, centeno, arroz y similares. Promotores que pueden emplearse ventajosamente son un promotor del gen *lpt2* o *lpt1* (documentos WO 95/15389, WO 95/23230) o los promotores descritos en el documento WO 99/16890 (promotores del gen hordeína, el gen glutelina, el gen orizina, el gen prolamina, el gen gliadina, el gen zeina, el gen kasirina o el gen secalina). Adicionalmente se prefiere un promotor específico de hojas e inducido por la luz tal como aquel de *cab* o Rubisco (Simpson 1985; Timko 1985); un promotor específico de anteras tal como aquel de LAT52 (Twell 1989b); un promotor específico de polen tal como aquel de *Zml3* (Guerrero 1993); y un promotor preferido de microsporas tal como aquel de *apg* (Twell 1993). Otros promotores adecuados son, por ejemplo, promotores específicos para tubérculos, raíces de almacenamiento o raíces tales como, por ejemplo, el promotor de patatina de clase I (B33), el promotor inhibidor de la catepsina D de patata, el promotor de la almidón sintasa (GBSS1) o el promotor de esporamina, y promotores específicos de frutos tales como, por ejemplo, el promotor específico del fruto de la tomatera (documento EP-A 409 625).

Promotores que son además adecuados son aquellos que garantizan la expresión específica de hojas. Promotores que pueden mencionarse son el promotor de FBPasa citosólica de la patata (documento WO 98/18940), el promotor SSU (subunidad pequeña) de Rubisco (ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa) o el promotor ST-LSI de la patata (Stockhaus 1989). Otros promotores preferidos son aquellos que gobiernan la expresión en semillas y embriones de plantas.

Otros promotores adecuados son, por ejemplo, promotores específicos de la maduración del fruto tales como, por ejemplo, los promotores específicos de la maduración del fruto de la tomatera (documento WO 94/21794), promotores específicos de flores tales como, por ejemplo, el promotor de la fitoeno sintasa (documento WO 92/16635) o un promotor del gen P1-rr (documento WO 98/22593), o puede usarse ventajosamente otro promotor específico de nodos como se describe en el documento EP-A 249676. Un promotor también puede ser un promotor específico de médula, tal como un promotor aislado de un gen *TrpA* de planta como se describe en el documento WO 93/07278. Se describe, entre otros, un promotor regulado por el desarrollo (Baerson 1993).

Un casete de expresión también puede contener un promotor químicamente inducible (artículo de revisión: Gatz 1997), por medio del cual la expresión del gen exógeno en la planta puede controlarse en un momento particular en el tiempo. Asimismo, pueden usarse promotores tales como, por ejemplo, el promotor de PRP1 (Ward 1993), un promotor inducible por ácido salicílico (documento WO 95/19443), un promotor inducible por bencenosulfonamida (documento EP 0 388 186), un promotor inducible por tetraciclina (Gatz 1991, 1992), un promotor inducible por ácido

abscísico (documento EP 0 335 528) o un promotor inducible por etanol-ciclohexanona (documento WO 93/21334). También es adecuado un promotor del gen de la isoforma II de glutatión-S transferasa (GST-II-27) que puede activarse por protectores exógenamente aplicados tales como, por ejemplo, N,N-dialil-2,2-dicloroacetamida (documento WO 93/01294) y que es operable en un gran número de tejidos de tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas. Adicionalmente, promotores inducibles a modo de ejemplo que pueden utilizarse en la presente invención incluyen aquellos del sistema de ACE1 que responde a cobre (Mett 1993); o el promotor In2 de maíz que responde a protectores de herbicidas de bencenosulfonamida (Hershey 1991; Gatz 1994). Puede utilizarse un promotor que responde a un agente inductor al que las plantas normalmente no responden. Un promotor inducible a modo de ejemplo es un promotor inducible por un gen de hormona esteroidea, cuya actividad transcripcional se induce por una hormona glucocorticosteroidea (Schena 1991). Otros promotores preferidos son promotores inducidos por estrés biótico o abiótico, tales como, por ejemplo, el promotor inducible por patógenos del gen PRP1 (Ward 1993), el promotor hsp80 inducible por calor del tomate (documento US 5.187.267), el promotor de alfa-amilasa inducible por el frío de patata (documento WO 96/12814) o el promotor pinII inducido por herida (documento EP-A1 0 375 091).

Los promotores también pueden englobar otros promotores, elementos promotores o promotores mínimos que pueden modificar las características específicas de la expresión. Así, por ejemplo, la expresión específica de tejido puede tener lugar además, en función de ciertos factores de estrés, debido a secuencias de control genético. Tales elementos se describen, por ejemplo, para estrés por agua, ácido abscísico (Lam 1991) y estrés por calor (Schoffl 1989).

El término "enlace operable" u "operativamente ligado" debe entenderse como que significa, por ejemplo, la disposición secuencial de un elemento regulador (por ejemplo, un promotor) con una secuencia de ácidos nucleicos que va a expresarse y, si es apropiado, elementos reguladores adicionales (tal como, por ejemplo, un terminador) de tal forma que cada uno de los elementos reguladores pueda cumplir su función prevista para permitir, modificar, facilitar o influir de otro modo en la expresión de dichas secuencias de ácidos nucleicos. La expresión puede producirse, dependiendo de la disposición de las secuencias de ácidos nucleicos, en relación con el ARN sentido o antisentido. Para este fin, no se requiere necesariamente el enlace directo en el sentido químico. Las secuencias de control genético tales como, por ejemplo, secuencias potenciadoras, también pueden ejercer su función sobre la secuencia diana de posiciones que están más alejadas, o de hecho de otras moléculas de ADN. Disposiciones preferidas son aquellas en las que la secuencia de ácidos nucleicos que va a expresarse recombinantemente está posicionada más allá de la secuencia que actúa de promotor, de manera que las dos secuencias estén asociadas covalentemente entre sí. La distancia entre la secuencia promotora y la secuencia de ácidos nucleicos que va a expresarse recombinantemente es preferentemente inferior a 200 pares de bases, especialmente preferentemente inferior a 100 pares de bases, muy especialmente preferentemente inferior a 50 pares de bases. Pueden generarse enlace operable, y una construcción de expresión, por medio de técnicas de recombinación y clonación usuales como se ha descrito (por ejemplo, en Maniatis 1989; Silhavy 1984; Ausubel 1987; Gelvin 1990). Sin embargo, secuencias adicionales que, por ejemplo, actúan de conector con sitios de escisión específicos para enzimas de restricción, o como péptido señal, también pueden posicionarse entre las dos secuencias. La inserción de secuencias también puede conducir a la expresión de proteínas de fusión. Preferentemente, la construcción de expresión, que consiste en un enlace de promotor y secuencia de ácidos nucleicos que va a expresarse, puede existir en una forma integrada en vector e insertarse en un genoma de planta, por ejemplo, por transformación.

El término "transformación", como se usa en el presente documento, se refiere a la introducción de material genético (por ejemplo, un transgén) en una célula. La transformación de una célula puede ser estable o transitoria. El término "transformación transitoria" o "transitoriamente transformado" se refiere a la introducción de uno o más transgenes en una célula en ausencia de integración del transgén en el genoma de la célula huésped. La transformación transitoria puede detectarse por, por ejemplo, enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA) que detecta la presencia de un polipéptido codificado por uno o más de los transgenes. Alternativamente, la transformación transitoria puede detectarse detectando la actividad de la proteína (por ejemplo, β -glucuronidasa) codificada por el transgén (por ejemplo, el gen uid A) como se demuestra en el presente documento [por ejemplo, ensayo histoquímico de la actividad enzimática de GUS por tinción con X-gluc que da un precipitado azul en presencia de la enzima GUS; y un ensayo quimioluminiscente de la actividad enzimática de GUS usando el kit GUS-Light (Tropix)]. El término "transformante transitorio" se refiere a una célula que ha incorporado transitoriamente uno o más transgenes. A diferencia, el término "transformación estable" o "establemente transformado" se refiere a la introducción e integración de uno o más transgenes en el genoma de una célula, preferentemente produciendo integración cromosómica y heredabilidad estable mediante meiosis. La transformación estable de una célula puede detectarse por hibridación por transferencia Southern de ADN genómico de la célula con secuencias de ácidos nucleicos que pueden unirse a uno o más de los transgenes. Alternativamente, la transformación estable de una célula puede también detectarse por la reacción en cadena de la polimerasa de ADN genómico de la célula para amplificar secuencias de transgenes. El término "transformante estable" se refiere a una célula que ha integrado establemente uno o más transgenes en el ADN genómico. Así, un transformante estable se distingue de un transformante transitorio en que, mientras que el ADN genómico del transformante estable contiene uno o más transgenes, el ADN genómico del transformante transitorio no contiene un transgén. La transformación también incluye la introducción de material genético en células vegetales en forma de vectores virales de planta que implican replicación epicromosómica y expresión génica que puede presentar propiedades variables con respecto a la estabilidad

meiótica.

Los términos “infectar” e “infección” con una bacteria se refieren a la co-incubación de una muestra biológica diana (por ejemplo, célula, tejido, etc.) con la bacteria en condiciones tales que las secuencias de ácidos nucleicos contenidas dentro de la bacteria se introduzcan en una o más células de la muestra biológica diana.

- 5 Los términos “meristemo” o “células meristemáticas” o “tejido meristemático” pueden usarse indistintamente y pretenden significar tejido de planta no diferenciado, que se divide continuamente, formando nuevas células, como aquellas encontradas en la punta de un tallo o raíz.

El término “nodo” pretende significar el punto sobre un tallo en el que una hoja está unida o se ha unido. El término “entrenudo” pretende significar la sección o parte entre dos nudos en un tallo.

- 10 El término “peciolo” pretende significar el tallo por el que una hoja se une a un tallo, también llamado un tallo de la hoja.

El término “yema axilar” pretende significar una pequeña protuberancia a lo largo de un tallo o rama, algunas veces encerrada en escamas protectoras y que contiene un brote sin desarrollar, hoja o flor; también llamada una yema lateral.

- 15 El término “hipocótilo” pretende significar la parte del tallo entre las hojas de semilla (los cotiledones) y la raíz. El término “axila de la hoja” pretende significar el ángulo entre una hoja y el tallo sobre el que está cargada. La yema axilar se produce en la axila de la hoja.

- 20 El término “cotiledón” pretende significar una hoja del embrión de una planta de semilla, que tras la germinación tanto sigue en la semilla como emerge, se ensancha y se vuelve verde; también se llama una hoja de semilla. La semilla de soja consiste en dos mitades de semilla, que son cotiledones u hojas de semilla. Los dos cotiledones contienen reservas de alimentos y nutrientes que alimentan la planta de semillero hasta que se establece. El color del cotiledón es verde en la vaina en desarrollo en las presentes variedades de grano, se vuelve amarilla a medida que las plantas maduran. El eje del embrión está localizado entre los cotiledones y está unido a ellos cerca del extremo más próximo al micrópilo.

- 25 El término “*Agrobacterium*”, como se usa en el presente documento, se refiere a una bacteria fitopatógena con forma de bacilo Gram-negativa transmitida por la tierra. *Agrobacterium* junto con *Rhizobium*, *Sinorhizobium* y *Allorhizobium* son géneros dentro de la familia bacteriana *Rhizobiaceae* (Kerstens y De Ley. 1984) que se ha incluido en la subclase alfa-2 de las proteobacterias basándose en las características ribosómicas (Willems y Collins. 1993). Los miembros de esta familia son Gram-negativos aerobios. Las células tienen normalmente forma de bacilo (0,6-1,0 µm por 1,5-3,0 µm), se producen individualmente o en pares, sin endospora, y son móviles por uno a seis flagelos peritricos. Normalmente se produce considerable baba extracelular de polisacáridos durante el crecimiento sobre medios que contienen hidratos de carbono. Las especies de *Agrobacterium*, *Agrobacterium tumefaciens* (sin. *Agrobacterium radiobacter*), *Agrobacterium rhizogenes*, *Agrobacterium rubi* y *Agrobacterium vitis*, junto con *Allorhizobium undicola*, forman un grupo monofilético con todas las especies de *Rhizobium*, basándose en análisis de ARNr 16S comparativos (Sawada 1993, Young 2003). *Agrobacterium* es un género artificial que comprende especies patógenas de plantas. La naturaleza monofilética de *Agrobacterium*, *Allorhizobium* y *Rhizobium* y su circunscripción genérica fenotípica común soportan su fusión en un único género, *Rhizobium*. La clasificación y caracterización de cepas de *Agrobacterium* que incluyen diferenciación de *Agrobacterium tumefaciens* y *Agrobacterium rhizogenes* y sus diversas clases de tipo opina es un práctica muy conocida en la técnica (véase, por ejemplo, Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria, 3rd edition. (2001) N. W. Schaad, J. B. Jones, and W. Chun (eds.) ISBN 0890542635; por ejemplo, el artículo de Moore y col. publicado en su interior).

- 45 Análisis recientes demuestran que la clasificación por sus propiedades patógenas de plantas no está justificada. Por consiguiente, se emplean procedimientos más avanzados basados en el análisis del genoma y comparación (tales como secuenciación de ARNr 16S; RFLP, Rep-PCR, etc.) para elucidar la relación de las diversas cepas (véanse, por ejemplo, Young 2003, Farrand 2003, de Bruijn 1996, Vinuesa 1998). Las *Agrobacteria* pueden diferenciarse en al menos tres biovariedades, correspondientes a las divisiones de especies basándose en pruebas bioquímicas y fisiológicas diferenciales. Cepas patógenas de *Agrobacterium* comparten una característica común; contienen al menos un plásmido grande, el plásmido inductor de tumor o de raíz (Ti y Ri, respectivamente). La virulencia se determina por diferentes regiones del plásmido que incluyen el ADN transferido (ADN-T) y los genes de virulencia (*vir*). Los genes de virulencia median en la transferencia de ADN-T en células vegetales infectadas, en las que se integra en el ADN de la planta. Según la clasificación “tradicional”, *Agrobacteria* incluyen, pero no se limitan a, cepas de *Agrobacterium tumefaciens* (que por su plásmido Ti “armado” natural normalmente producen agallas de la corona en plantas infectadas) y *Agrobacterium rhizogenes* (que por su plásmido Ri “armado” natural producen enfermedad de las raíces pilosas en plantas huésped infectadas), *Agrobacterium rubi* (que en su forma “armada” natural producen agallas de la caña en *Rubus*), *Agrobacterium vitis* y *Agrobacterium radiobacter* (agrupación de *Agrobacteria* no patógenas).

- 55 Las relaciones filogenéticas de miembros del género *Agrobacterium* por dos procedimientos que demuestran la relación de cepas K599 de *Agrobacterium* se presentan en la Fig. 1A (basado en RAPD (ADN polimórfico

ES 2 543 086 T3

amplificado al azar); tomado de Llob 2003; Figura 2) y 1B (basado en secuenciación de ARNr 16S).

Tabla 1: Cepas de *Agrobacterium* (de Llob 2003: Tabla 1)

Referencia de cepa	Origen	Biovariedad	Tipo de opina	Huésped
A281 (=C58 con plásmido pTiBo542)		1	Agropina	
Ach5	EE.UU.	1	Octopina	<i>Prunus</i> sp.
ATCC 15834	EE.UU.	<i>A. rizhogenes</i>	ND	No conocido
B6	EE.UU.	1	ND	No conocido
CFBP 42	Francia	1	ND	Tomate
CFBP 1903 (C58)	EE.UU.	1	Nopalina	<i>Prunus cerasus</i>
IVIA 014	Zaragoza, España	2	Nopalina	Melocotón
IVIA 66R	Sevilla, España	2	ND	Rosa
IVIA 251-1	Badajoz, España	1	Nopalina	Almendra
IVIA 251-21	Badajoz, España	2	Nopalina	Cereza
IVIA 25 1-22	Badajoz, España	1	Nopalina	Cereza
IVIA 254- 1	Valencia, España	ND	Desconocido	Melocotón
IVIA 254-2	Valencia, España	2	Nopalina	Melocotón
IVIA 260-67	Badajoz, España	2	Nopalina	Álamo
IVIA 282-64	Tenerife, España	2	Nopalina	Rosa
IVIA 325-4	Tarragona, España	1	Nopalina	Melocotón x almendra
IVIA 325-7	Tarragona, España	2	Nopalina	Melocotón x almendra
IVIA 339-26	Orense, España	3	ND	Uva de vino
IVIA 347-4	Valencia, España	1	Nopalina	Melocotón
IVIA 354-35	Valencia, España	2	Nopalina	Almendra
IVIA 360-54	Navarra, España	1	ND	Uva de vino
IVIA 388-30	Zaragoza, España	2	Nopalina	Almendra
IVIA 436-46	Zaragoza, España	1	Nopalina/manopina	Melocotón x almendra
IVIA 545-45	Castellón, España	2	Nopalina	Membrillo
IVIA 576-80	Cuenca, España	1	Nopalina	Mimbres
IVIA 678-2	Valencia, España	1	ND	Melocotón x almendra
IVIA 796-6	Valencia, España	2	ND	Melocotón x almendra
IVIA 1,102	Valencia, España	1	Crisopina	Crisantemo
IVIA 1853-2	Zaragoza, España	2	ND	Melocotón
172-17T**	Orense, España	1	Octopina	Uva de vino
225-226P	Orense, España	1	Octopina	Uva de vino
194-459Y	Orense, España	3	Octopina	Uva de vino

(continuación)

Referencia de cepa	Origen	Biovariedad	Tipo de opina	Huésped
K84	Australia	<i>A. radiobacter</i>	Nopalina/octopina	Tierra
NCIB 8196	Desconocido	<i>A. rhizogenes</i>	ND	No conocido
NCPPB 1649	Sudáfrica	2	ND	Rosa
NCPPB 2437	EE.UU.	1	ND	No conocido
NCPPB 2659 (K599)	RU	<i>A. rhizogenes</i>	Cucumopina	Pepino
<u>NCPPB 3554</u>	Australia	3	ND	Uva de vino

ATCC: American Type Culture Collection, EE.UU.; CFRP: Collection Francaise des Bacteries Phytopatogenes, Francia; IVIA: Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, España; NCIB: National Collection of Industrial Bacteria, RU; NCPPB: National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, RU; ND: No determinado.

El término plásmido Ti, como se usa en el presente documento, es con referencia a un plásmido que es replicable en *Agrobacterium* y está en su forma “armada” natural que media en agallas de la corona en plantas infectadas con *Agrobacterium*. La infección de una célula de planta con una forma “armada” natural de un plásmido Ti de *Agrobacterium* produce generalmente la producción de opinas (por ejemplo, nopalina, agropina, octopina, etc.) por la célula infectada. Así, las cepas de *Agrobacterium* que producen la producción de nopalina (por ejemplo, cepa LBA4301, C58, A208) se denominan *Agrobacteria* “tipo nopalina”; cepas de *Agrobacterium* que producen la producción de octopina (por ejemplo, cepa LBA4404, Ach5, B6) se denominan *Agrobacteria* “tipo octopina”; y cepas de *Agrobacterium* que producen la producción de agropina (por ejemplo, cepa EHA105, EHA101, A281) se denominan *Agrobacteria* “tipo agropina”. Un plásmido Ti desarmado se entiende como un plásmido Ti que carece de su agalla de la corona que media en las propiedades, pero que de otro modo proporciona las funciones para la infección de la planta. Preferentemente, la región de ADN-T de dicho plásmido “desarmado” se modificó de una forma que, además de las secuencias de límite, las secuencias de Ti internas no funcionales pudieran transferirse al genoma de la planta. En una realización preferida, cuando se usa con un sistema de vector binario, la región de ADN-T entera (que incluye el límite de ADN-T) está delecionada.

El término plásmido Ri, como se usa en el presente documento, es con referencia a un plásmido, que es replicable en *Agrobacterium* y está en su forma “armada” natural que media en la enfermedad de las raíces pilosas de las plantas infectadas por *Agrobacterium*. La infección de una célula de planta con una forma “armada” natural de un plásmido Ri de *Agrobacterium* generalmente produce la producción de opinas (derivados de aminoazúcares específicos producidos en células vegetales transformadas tales como, por ejemplo, agropina, cucumopina, octopina, mikimopina, etc.) por la célula infectada. Las cepas de *Agrobacterium rhizogenes* se distinguen tradicionalmente en subclases de la misma forma que las cepas de *A. tumefaciens*. Las cepas más comunes son cepas de tipo agropina (por ejemplo, caracterizadas por el plásmido Ri pRi-A4), cepas de tipo manopina (por ejemplo, caracterizadas por el plásmido Ri pRi8196) y cepas de tipo cucumopina (por ejemplo, caracterizadas por el plásmido Ri pRi2659). Algunas otras cepas son del tipo mikimopina (por ejemplo, caracterizadas por el plásmido Ri pRi1724). La mikimopina y la cucumopina son estereoisómeros, pero no se encontró homología entre los plásmidos pRi al nivel de nucleótido (Suzuki 2001). Un plásmido Ri desarmado se entiende como un plásmido Ri que carece de sus propiedades que median en la enfermedad de las raíces pilosas, pero que de otro modo proporcionan las funciones para la infección de la planta. Preferentemente, la región de ADN-T de dicho plásmido Ri “desarmado” se modificó de una forma que, además de las secuencias de límite, las secuencias Ri internas no funcionales pudieran transferirse al genoma de la planta. En una realización preferida, cuando se usa con un sistema de vector binario, la región de ADN-T entera (que incluyen los límites de ADN-T) está delecionada.

Aunque los plásmidos Ti y Ri varían considerablemente entre cepas, todos llevan genes *vir* similares.

El término “secuencia intergénica de ARNr 16S-23S”, como se usa en el presente documento, pretende significar la región de ADN genómico localizada entre las secuencias que codifican el ARNr 16S y el ARNr 23S. Dicha secuencia intergénica puede solaparse con las secuencias que codifican el ARNr 16S y el ARNr 23S.

Descripción detallada de la invención

La presente invención usa variantes de cepas “desarmadas” de la cepa K599 de *Agrobacterium* (NCPPB 2659) para la administración de ADN-T en células de plantas. En el presente documento más adelante no se emplea la clasificación previa de la cepa K599 como una cepa de “*A. rhizogenes*”, debido a que además del fenotipo inductor de raíces pilosas (que es un resultado del plásmido Ri, pero no del genoma bacteriano), la cepa parece estar solo remotamente relacionada con otras cepas de *A. rhizogenes* basadas en un análisis de comparación de secuencias de ADN ribosómico. Así, se considera que la cepa es un espécimen único que tampoco es inequívocamente un tipo

de cepa de *A. tumefaciens* o de *A. rhizogenes*.

Una primera realización de la invención se refiere a un procedimiento para producir una célula de planta transgénica que comprende las etapas de:

- 5 a) proporcionar bacterias de una variante de cepa no patógena transgénica de la cepa K599 de *Agrobacterium* (NCPPB 2659) o de un derivado de dicha cepa, en el que dicha variante de cepa es capaz de infectar células vegetales, pero carece de propiedades inductoras del fenotipo de raíces pilosas y en el que dicha variante de cepa comprende además un ADN-T transgénico, y
- b) co-cultivar una célula de planta con dichas bacterias, y
- 10 c) aislar o seleccionar células vegetales que comprenden establemente integrado en su genoma dicho ADN-T transgénico.

Otra realización de la invención se refiere a un procedimiento para producir una planta transgénica que comprende las etapas de:

- 15 a) proporcionar bacterias de una variante de cepa no patógena transgénica de la cepa K599 de *Agrobacterium* (NCPPB 2659) o de un derivado de dicha cepa, en el que dicha variante de cepa es capaz de infectar células vegetales, pero carece de propiedades inductoras del fenotipo de raíces pilosas y en el que dicha variante de cepa comprende además un ADN-T transgénico, y
- b) co-cultivar una planta, célula de planta o tejido de planta con dichas bacterias, y
- c) aislar o seleccionar y - opcionalmente - regenerar plantas que comprenden establemente integrado en su genoma dicho ADN-T transgénico.

20 El procedimiento de la invención tiene una o más de las siguientes ventajas con respecto al estado de la técnica:

- 25 a) Es muy eficaz para la transformación de especies de plantas resistentes a la transformación mediada por las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* conocidas en la técnica, especialmente sojas y árboles como álamo y castaño. Sorprendentemente, el derivado desarmado de *Agrobacterium rhizogenes* K599 (pRi2659A y pRi2659Δtet, respectivamente) proporcionado en el presente documento demuestra una alta tasa de infección para soja y proporciona una mejora con respecto a cepas convencionales de *Agrobacterium* para la transformación de plantas.
- 30 b) Debido a sus vigorosas propiedades infecciosas, puede emplearse en una concentración mucho menor que *Agrobacterium tumefaciens*. Esto permite elegir como diana tejidos que son muy sensibles al co-cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* normal (tales como, por ejemplo, cigotos o embriones inmaduros de plantas como trigo).
- c) Adicionalmente, el límite de ADN-T del plásmido pRi2659 se usa para crear un nuevo vector binario. Estas secuencias de límite ofrecen una ventaja con respecto a la secuencia de límite convencionalmente usada, especialmente en combinación con la variante de cepa desarmada K599 de *Agrobacterium rhizogenes* (pRi2659Δ).
- 35 d) Finalmente, el procedimiento de la invención es compatible con otros sistemas de transformación de plantas basados en *Agrobacterium*.

Los procedimientos de la invención pueden usarse para transformar prácticamente todo tipo de plantas. Plantas preferidas se han enumerado anteriormente en la sección DEFINICIÓN GENERAL. Se prefieren célula de planta, tejido de planta o planta derivada de una planta seleccionada del grupo de plantas monocotiledóneas, plantas dicotiledóneas y plantas gimnospermas. Más preferentemente, la planta es de un género seleccionado del grupo que consiste en *Medicago*, *Lycopersicon*, *Brassica*, *Cucumis*, *Solanum*, *Juglans*, *Gossypium*, *Malus*, *Vitis*, *Antirrhinum*, *Populus*, *Fragaria*, *Arabidopsis*, *Picea*, *Capsicum*, *Chenopodium*, *Dendranthema*, *Pharbitis*, *Pinus*, *Pisum*, *Oryza*, *Zea*, *Triticum*, *Triticale*, *Secale*, *Lolium*, *Hordeum*, *Glycine*, *Pseudotsuga*, *Kalanchoe*, *Beta*, *Helianthus* y *Nicotiana*.

45 En una realización preferida de la invención, el ADN-T transgénico comprende al menos un casete de expresión para conferir a dicha planta un rasgo agrónomicamente valioso o al menos un gen marcador, que permite la selección y/o identificación de plantas, células vegetales o tejidos transformados. Genes marcadores preferidos se describen en el presente documento más adelante.

1. La cepa K599 de *Agrobacterium* "desarmada" (NCPPB2659)

50 Otra realización de la invención está relacionada con una variante de cepa no patógena de la cepa K599 de *Agrobacterium* (NCPPB 2659) o de un derivado de dicha cepa (denominada en lo sucesivo variante de cepa "desarmada"), en el que dicha variante de cepa es capaz de infectar células vegetales, pero carece de propiedades inductoras del fenotipo de raíces pilosas.

El término "derivado", cuando se refiere a la cepa K599 de *Agrobacterium* (NCPPB2659), pretende significar una bacteria patógena de las plantas transmitida por la tierra, caracterizada por una secuencia intergénica de ARNr 16S-

23S que comprende al menos un motivo de secuencia seleccionado del grupo que consiste en:

- | | |
|----------------------------------|-----------------------------|
| 1. 5'-AATCGTTCGATGCGAATTGTTG-3' | (Motivo M1, SEC ID N°: 5) |
| 2. 5'-GTTTTGTCCTGACGCTGTGCGCA-3' | (Motivo M2, SEC ID N°: 6) |
| 3. 5'-TCTAACGATCGCTGCGCTCCGGA-3' | (Motivo M3, SEC ID N°: 7) |
| 4. 5'-CGCCACGAGGCGCGACGGA-3' | (Motivo M4, SEC ID N°: 8) |
| 5. 5'-TTATGGGCGAATTGATCTGA-3' | (Motivo M5, SEC ID N°: 9) |
| 6. 5'-GTCCTGCTAAGGATTGATGCCT-3' | (Motivo M6, SEC ID N°: 10) |
| 7. 5'-AGACCAGTCCTTGTGAAACC-3' | (Motivo M7, SEC ID N°: 11) |
| 8. 5'-CCTGGGCATTTTTGTTGTTGG-3' | (Motivo M8, SEC ID N°: 12) |
| 9. 5'-AATGGTATGGCTTCGAGGTG-3' | (Motivo M9, SEC ID N°: 13) |
| 10. 5'-CTCAAAGAAGACCGTACCGACA-3' | (Motivo M10, SEC ID N°: 14) |

5 Preferentemente, el derivado de la cepa K599 de *Agrobacterium* (NCPB2659) se caracteriza por una secuencia intergénica de ARNr 16S-23S que comprende al menos dos o tres motivos, preferentemente al menos cuatro o cinco motivos, más preferentemente al menos seis o siete motivos, lo más preferentemente al menos ocho, nueve o diez motivos seleccionados del grupo de motivos descrito por SEC ID N°: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14.

10 Motivos de secuencia característicos adicionales pueden identificarse a partir del alineamiento múltiple de regiones variables de la secuencia intergénica de ARNr 16S-23S conocidas (las más similares a K599 de *Agrobacterium* se comparan en la Fig. 14A-E). Preferentemente, un derivado de K599 de *Agrobacterium* se caracteriza por una secuencia intergénica de ARNr 16S-23S que comprende una secuencia con una identidad de al menos el 90 %, más preferentemente al menos el 95 %, lo más preferentemente al menos el 98 % con la secuencia como se describe por el par de bases SEC ID N°: 20 o el complemento de la misma. Especialmente se prefieren cepas que además se caracterizan por una secuencia de ARNr 16S como se describe por SEC ID N°: 21.

15 La variante de cepa no patógena puede comprender además una o más características seleccionadas del grupo que consiste en la presencia de genes *virA* o *virG* mutantes o quiméricos o la presencia de plásmidos super-virulentos. La variante de cepa no patógena de la cepa K599 de *Agrobacterium* (NCPB2659) puede comprender una variante de plásmido no patógeno del plásmido pRi2659 (como se define más adelante).

20 Otra realización de la invención está relacionada con una variante de cepa no patógena transgénica de la cepa K599 de *Agrobacterium* (NCPB 2659) o de un derivado de dicha cepa, en la que dicha variante de cepa es capaz de infectar células vegetales, pero carece de propiedades inductoras del fenotipo de raíces pilosas y en la que dicha variante de cepa comprende además un ADN-T transgénico. En una realización preferida de la invención, el ADN-T transgénico comprende al menos un casete de expresión para conferir a dicha planta un rasgo agrónomicamente valioso o al menos un gen marcador, que permite la selección y/o identificación de plantas, células vegetales o tejidos transformados. Genes marcadores preferidos se describen en el presente documento más adelante. ADN-T preferidos se describen en el presente documento más adelante.

30 En una realización preferida de la invención, dicha variante de cepa no patógena de la cepa K599 de *Agrobacterium* (NCPB 2659) (o de un derivado de dicha cepa) es capaz de infectar células vegetales, para mediar en la transferencia de ADN-T en células vegetales, y para mediar en la inserción de ADN-T en el genoma de la planta, pero carece de las propiedades inductoras del fenotipo de raíces pilosas. Más preferentemente, esto se logra por la presencia de una variante de plásmido no patógeno del plásmido Ri pRi2659 (el plásmido Ri natural en la cepa K599 de *Agrobacterium*; NCPB 2659) o un derivado del mismo (como se define más adelante). Dicha variante de plásmido no patógeno proporciona preferentemente todas las funciones requeridas para la infección y transformación de la célula de planta, pero carece de secuencias que provocan el fenotipo de raíces pilosas. Variantes de plásmidos no patógenos preferidos del plásmido Ri pRi2659 se describen en el presente documento más adelante.

40 En otra realización preferida de la invención, las cepas de *Agrobacterium* no patógenas de la invención se modifican adicionalmente para aumentar la eficiencia de transformación, tal como por alteración de la expresión del gen *vir* y/o inducción del mismo. Esto puede realizarse, por ejemplo, por la presencia de genes *virA* o *virG* mutantes o quiméricos (por ejemplo, como se describe para *Agrobacterium tumefaciens* en Hansen 1994; Chen y Winans 1991; Scheeren-Groot y col., 1994). Son posibles otras combinaciones con plásmidos super-virulentos (por ejemplo, vectores basados en pTOK246; Ishida 1996) para generar las llamadas cepas super-virulentas. También pueden generarse variantes de cepas super-virulentas empleando vectores derivados de plásmidos de super-virulencia pSB1 (Komari 1996).

2. El plásmido pRi2659 “desarmado”

La secuencia aislada de la versión desarmada del plásmido pRi2659 se proporciona en el presente documento. Esta secuencia y la información de secuencia es útil en su totalidad, pero también en parte. El plásmido está expresando numerosas proteínas (véase la Tabla 4), de las cuales varias son novedosas con respecto a la materia y lo más probable es que participen en el superior rendimiento de transformación del plásmido pRi2659. La secuencia e información de secuencias también permiten diversos usos que incluyen, pero no se limitan a

- a) elevado entendimiento del superior rendimiento del plásmido,
- b) utilización de características aisladas (por ejemplo, proteínas) del plásmido para potenciar el rendimiento de otros procedimientos de transformación de plantas (por ejemplo, basados en transformaciones estándar basadas en *Agrobacterium tumefaciens*), y
- c) cambios dirigidos y optimización de dicho plásmido.

Así, una realización preferida de la invención se refiere a una secuencia de nucleótidos aislada seleccionada del grupo de secuencias descrito por

- a) secuencias que comprenden una secuencia descrita por SEC ID N°: 24, o una secuencia de al menos 100 nucleótidos consecutivos (preferentemente al menos 250 ó 500 nucleótidos consecutivos, más preferentemente al menos 1000 ó 2500 nucleótidos consecutivos, incluso más preferentemente al menos 5000 ó 10000 nucleótidos consecutivos, lo más preferentemente todos los nucleótidos consecutivos) de la secuencia descrita por SEC ID N°: 24, y
- b) secuencias que tienen una identidad de secuencias de al menos el 90 % (preferentemente al menos el 92 % o el 95 %, más preferentemente al menos 97% o el 98 %, lo más preferentemente al menos el 99 %) con una secuencia como se describe por SEC ID N°: 24 o una secuencia de al menos 1000 nucleótidos consecutivos (preferentemente al menos 2000 ó 4000 nucleótidos consecutivos, más preferentemente al menos 5000 ó 10000 nucleótidos consecutivos, incluso más preferentemente al menos 20000 ó 50000 nucleótidos consecutivos, lo más preferentemente todos los nucleótidos consecutivos) de la secuencia descrita por SEC ID N°: 24, y,
- c) secuencias que se hibridan en condiciones equivalentes a la unión o hibridación a 68 °C en una disolución que consiste en 5x SSPE, 1 % de SDS, 5x reactivo de Denhardt y 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado, seguido de lavado en una disolución que comprende 0,1x SSPE y 0,1 % de SDS a 68 °C con una sonda que consiste en al menos 100 nucleótidos consecutivos (preferentemente al menos 250 ó 500 nucleótidos consecutivos, más preferentemente al menos 1000 ó 2500 nucleótidos consecutivos, incluso más preferentemente al menos 5000 ó 10000 nucleótidos consecutivos, lo más preferentemente todos los nucleótidos consecutivos) de una secuencia como se describe por SEC ID N°: 24 o la secuencia complementaria a la misma.

Otra realización de la invención está relacionada con una variante de plásmido (“desarmado”) no patógeno de pRi2659 (el plásmido Ri natural en la cepa K599 de *Agrobacterium*; NCPPB 2659) o un derivado del mismo, proporcionando dicha variante de plásmido las funciones requeridas para la infección y transformación de la célula de planta, pero que carece de secuencias que provocan el fenotipo de raíces pilosas (denominada en lo sucesivo variante de plásmido “desarmado”). Preferentemente, dicha variante de plásmido no patógeno comprende las secuencias requeridas para la infección y transformación de la célula de planta del pRi2659 patógeno nativo o su derivado, pero carece de secuencias del ADN-T que media en el fenotipo de raíces pilosas.

Preferentemente, la variante de plásmido no patógeno de pRi2659 o de su derivado no comprende elementos (tales como, por ejemplo, elementos de ADN-T) que puedan transferirse al genoma de la planta. Esto es especialmente ventajoso cuando se combinan con un ADN-T transgénico que comprende un vector binario. Hay diversos medios para proporcionar una variante de plásmido “desarmado” tal. A modo de ejemplo, esto puede realizarse:

1. Haciendo disfuncionales los límites del ADN-T (por ejemplo, por mutagénesis) o
2. Delecionando el ADN-T entero del plásmido Ri, o
3. Cribando para delección natural o mutante no patógeno, o
4. Mutagénesis de delección (por ejemplo, empleando acetosiringona) induciendo mellas de ADN y escisión del ADN-T, o
5. Mutagénesis de transposones y cribado de mutantes no patógenos o
6. Delección dirigida y específica de genes relevantes usando, por ejemplo, estrategia de sustitución génica. Reemplazando las copias no mutantes de genes entre el LD y el LI con una sustitución delecionada, pueden escindirse exactamente solo los genes que necesitan ser delecionados.

En una realización especialmente preferida de la invención, dicha variante de plásmido no patógeno comprende al menos una secuencia seleccionada del grupo de secuencias descrito por

- a) secuencias que comprenden una secuencia descrita por SEC ID N°: 24, o una secuencia de al menos 100 nucleótidos consecutivos (preferentemente al menos 250 ó 500 nucleótidos consecutivos, más preferentemente al menos 1000 ó 2500 nucleótidos consecutivos, incluso más preferentemente al menos 5000 ó 10000 nucleótidos consecutivos, lo más preferentemente todos los nucleótidos consecutivos) de la secuencia descrita por SEC ID N°: 24, y

5 b) secuencias que tienen una identidad de secuencias de al menos el 90 % (preferentemente al menos el 92 % o el 95 %, más preferentemente al menos 97% o el 98 %, lo más preferentemente al menos el 99 %) con una secuencia como se describe por SEC ID N°: 24 o una secuencia de al menos 1000 nucleótidos consecutivos (preferentemente al menos 2000 ó 4000 nucleótidos consecutivos, más preferentemente al menos 5000 ó 10000 nucleótidos consecutivos, incluso más preferentemente al menos 20000 ó 50000 nucleótidos consecutivos, lo más preferentemente todos los nucleótidos consecutivos) de la secuencia descrita por SEC ID N°: 24, y,

10 c) secuencias que se hibridan en condiciones equivalentes a la unión o hibridación a 68 °C en una disolución que consiste en 5x SSPE, 1 % de SDS, 5x reactivo de Denhardt y 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado, seguido de lavado en una disolución que comprende 0,1x SSPE y 0,1 % de SDS a 68 °C con una sonda que consiste en al menos 100 nucleótidos consecutivos (preferentemente al menos 250 ó 500 nucleótidos consecutivos, más preferentemente al menos 1000 ó 2500 nucleótidos consecutivos, incluso más preferentemente al menos 5000 ó 10000 nucleótidos consecutivos, lo más preferentemente todos los nucleótidos consecutivos) de una secuencia como se describe por SEC ID N°: 24 o la secuencia complementaria a la misma.

15 Más preferentemente, dicha variante de plásmido no patógeno se describe por una secuencia de nucleótidos que describe el plásmido pRi2659 desarmado o un derivado anterior (como se ha definido anteriormente). Incluso más preferentemente o alternativamente, el derivado está codificando una proteína virD2 que tiene una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos el 85 % (preferentemente al menos el 90 % o el 92 %, más preferentemente al menos el 95 % o el 98 %, lo más preferentemente al menos el 99 %) con la secuencia descrita por SEC ID N° 112.

20 Se espera que dicha proteína virD2 sea un factor clave para el rendimiento potenciado en la transformación del plásmido pRi2659 desarmado. Así, otra realización de la invención se refiere a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

25 a) la secuencia como se describe por SEC ID N°: 112 o secuencias de al menos 200 aminoácidos consecutivos (preferentemente al menos 300 aminoácidos consecutivos, más preferentemente al menos 400 aminoácidos consecutivos, preferentemente todos los aminoácidos consecutivos) de la misma,

b) secuencias que tienen una identidad de secuencias de al menos el 85 % (preferentemente al menos el 90 % o el 92 %, más preferentemente al menos el 95 % o el 98 %, lo más preferentemente al menos el 99 %) con las secuencias descritas por SEC ID N°: 112.

30 Sin embargo, también se considera que las otras proteínas codificadas por el plásmido pRi2659 desarmado son útiles para la optimización de procesos de transformación, así otra realización de la invención se refiere a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

35 a) la secuencia como se describe por cualquiera de SEC ID N°: 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 126, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 136, 137, 139, 140, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 154, 155, 156, 158, 159, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186 ó 187 o secuencias de al menos 200 aminoácidos consecutivos (preferentemente al menos 300 aminoácidos consecutivos, más preferentemente al menos 400 aminoácidos consecutivos, preferentemente todos los aminoácidos consecutivos) de la misma,

40 b) secuencias que tienen una identidad de secuencias de al menos el 85 % (preferentemente al menos el 90 % o el 92 %, más preferentemente al menos el 95 % o el 98 %, lo más preferentemente al menos el 99 %) con una secuencia descrita por cualquiera de SEC ID N°: 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 126, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 136, 137, 139, 140, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 154, 155, 156, 158, 159, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186 ó 187.

50 Todavía otra realización de la invención se refiere a secuencias de ácidos nucleicos aisladas que codifican dichos polipéptidos. Estas secuencias pueden ser las secuencias naturales aisladas (como están comprendidas en el plásmido pRi2659) u otras secuencias derivadas basándose en la degeneración del código genético.

55 Lo más preferentemente, estas secuencias derivadas de la proteína virD2 proporcionada en el presente documento comprenden al menos un residuo de aminoácido único de la proteína virD2 como se especifica en la Fig. 16 (por los asteriscos (*)).

Preferentemente, la variante de plásmido no patógeno se obtiene delecionando el ADN-T entero que incluye los límites del plásmido nativo. Más preferentemente, para la variante de plásmido no patógeno de la invención, el ADN-T delecionado se corresponde con la secuencia descrita por la secuencia de aproximadamente la base 538 a

aproximadamente la base 15.519 de SEC ID N°: 4 o de aproximadamente la base 3644 a aproximadamente la base 18577 de SEC ID N°: 26.

Preferentemente, el ADN-T entero se deleciona del plásmido Ri (más preferentemente que incluye el límite derecho e izquierdo entero). Se prefiere la delección del ADN-T entero que incluye el LD y el LI enteros del plásmido Ri (por ejemplo, pRi2659), ya que en los casos anteriores de plásmidos Ti desarmados en los que una porción de cualquier límite se dejó interaccionar sobre el plásmido Ti hubo la posibilidad de integración de ADN más allá de este límite y a partir del plásmido binario. El procedimiento empleado en la realización preferida de la presente invención elimina la posibilidad de integración de ADN externo. Por consiguiente, una realización preferida de la invención se refiere a una variante de plásmido no patógeno de pRi2659 o un derivado de la misma, en el que dicha variante de plásmido comprende las secuencias requeridas para la infección y transformación de la célula de planta del pRi2659 patógeno nativo o su derivado, pero carece del ADN-T, preferentemente la región descrita por la secuencia de aproximadamente la base 538 a aproximadamente la base 15.519 de la secuencia caracterizada por el n° de acceso de GenBank AJ271050 (SEC ID N°: 4) o de aproximadamente la base 3644 a aproximadamente la base 18577 de la secuencia caracterizada por SEC ID N°: 26. Esta secuencia se corresponde con el ADN-T del plásmido Ri pRi2659 patógeno original como se proporciona en la cepa K599 de *Agrobacterium* patógena (NCPBB 2659). Más preferentemente, dicha variante de plásmido no patógeno es una secuencia que se hibrida bajo condiciones de alta rigurosidad (por ejemplo, equivalentes a la unión o hibridación a 68 °C en una disolución que consiste en 5x SSPE, 1 % de SDS, 5x reactivo de Denhardt y 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado, seguido de lavado en una disolución que comprende 0,1x SSPE y 0,1 % de SDS a 68 °C) con el plásmido Ri pRi2659 patógeno (nativo) original como se proporciona en la cepa K599 de *Agrobacterium* patógena (NCPBB 2659), pero que no se hibrida bajo dichas condiciones de alta rigurosidad con la secuencia de aproximadamente la base 538 a aproximadamente la base 15.519 de la secuencia caracterizada por el n° de acceso de GenBank AJ271050 (SEC ID N°: 4) o de aproximadamente la base 3644 a aproximadamente la base 18577 de la secuencia caracterizada por SEC ID N°: 26.

Más preferentemente, el derivado de pRi2659 es un plásmido capaz de mediar en la transferencia de ADN-T de una bacteria transmitida por la tierra en una célula de planta caracterizado adicionalmente por

- a) tener una identidad de secuencias de al menos el 90 % (preferentemente al menos el 91 % o el 92 %, más preferentemente al menos el 95 % o el 98 %, lo más preferentemente al menos el 99 %) con el ADN que codifica el plásmido pRi2659 nativo (como está comprendido en la cepa K599 de *Agrobacterium* (NCPBB2659) o
- b) hibridarse bajo condiciones de alta rigurosidad (por ejemplo, equivalentes a la unión o hibridación a 68 °C en una disolución que consiste en 5x SSPE, 1 % de SDS, 5x reactivo de Denhardt y 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado, seguido de lavado en una disolución que comprende 0,1x SSPE y 0,1 % de SDS a 68 °C) con el plásmido pRi2659 nativo (como se describe por SEC ID N°: 111).

En una realización preferida, la variante de plásmido no patógeno de la invención se hibrida bajo condiciones de alta rigurosidad con el plásmido Ri pRi2659 patógeno nativo entero de la cepa K599 de *Agrobacterium* patógena (NCPBB 2659), pero no se hibrida bajo condiciones de alta rigurosidad con la secuencia de aproximadamente la base 538 a aproximadamente la base 15.519 de la secuencia caracterizada por SEC ID N°: 4 o de aproximadamente la base 3644 a aproximadamente la base 18577 de la secuencia caracterizada por SEC ID N°: 26.

El término “derivado”, cuando se refiere a pRi2659, pretende significar un plásmido capaz de mediar en la transferencia de ADN-T de una bacteria transmitida por la tierra en una célula de planta caracterizado adicionalmente por

- a) tener una identidad de secuencias de al menos el 90 %, más preferentemente al menos el 95 %, lo más preferentemente al menos el 98 %, con el ADN que codifica el plásmido pRi2659 nativo (como está comprendido en la cepa K599 de *Agrobacterium* (NCPBB2659) o
- b) hibridarse bajo condiciones de alta rigurosidad (como se ha definido anteriormente) con el plásmido pRi2659 nativo.

Más preferentemente, tal derivado de pRi2659 en su forma patógena natural está mediando en el fenotipo de tipo cucumopina de la síntesis de opinas.

3. El ADN-T transgénico

Preferentemente, el ADN-T en dicha variante de cepa no patógena transgénica de la cepa K599 de *Agrobacterium* (NCPBB 2659) o su derivado está comprendido en un plásmido de vector binario separado del plásmido proporcionar las características requeridas para la infección de la planta (tal como un plásmido Ti o Ri que carece de sus propiedades neoplásticas o inductoras de raíces pilosas). Así, otra realización de la invención se refiere a un ADN-T transgénico flanqueado por al menos un límite de ADN-T del plásmido pRi2659 de *Agrobacterium rhizogenes*, no comprendiendo dicho ADN-T transgénico secuencias que provoquen un fenotipo de raíces pilosas.

Preferentemente, el ADN-T está flanqueado por al menos la secuencia de límite derecho (más preferentemente por la secuencia de límite derecho e izquierdo). Se prefieren límites Ti y/o Ri. El límite de ADN-T son repeticiones de aproximadamente 25 pb, bien definidas como se describe en la materia (Zupan 2000). Por la acción combinada de los llamados genes *vir* (parte de los plásmidos Ti o Ri originales), los límites median en la transferencia de ADN-T.

En una realización preferida, dicho ADN-T transgénico comprende al menos un casete de expresión para conferir a dicha planta un rasgo agrónomicamente valioso. En otra realización preferida, dicho ADN-T comprende además al menos un gen marcador, que permite la selección y/o identificación de plantas, células vegetales o tejidos transformados.

5 Se ha demostrado que los límites de ADN-T del plásmido pRi2659 son especialmente eficaces en la transferencia de ADN-T y así en generar plantas transgénicas (especialmente plantas de soja transgénicas). Así, preferentemente, el ADN-T comprende los límites de ADN-T del plásmido pRi2659 (por ejemplo, incorporados en un vector binario). El límite derecho tiene 16 repeticiones de una secuencia de 8 pb que es funcionalmente equivalente a una multiplicación (Hansen 1992). Estas secuencias de límite ofrecen una ventaja con respecto a la secuencia de límite convencionalmente usada. Especialmente se prefiere una combinación de la variante de cepa desarmada o derivado de la cepa K599 de *Agrobacterium* (BCPPB2659) con un ADN-T transgénico que comprende los límites de un plásmido Ri, más preferentemente el plásmido pRi2659, combinación que contribuye a una alta eficiencia de transformación, por ejemplo, para soja. Especialmente se prefieren las secuencias de límite derecho que comprenden una secuencia descrita por SEC ID N°: 18 que representa la base 538 a 561 de SEC ID N°: 4 (región de ADN-T de pRi2659):

5'-tggcaggata tattgtgtg taaa-3' (SEC ID N°: 18)

Especialmente se prefieren las secuencias de límite derecho que comprenden una secuencia descrita por SEC ID N°: 19 que representa la base 15.496 a 15.519 de SEC ID N°: 4 (región de ADN-T de pRi2659):

5'-tgacaggata tatcccctg tcta-3' (SEC ID N°: 19)

20 Así, otra realización de la invención se refiere a un vector plasmídico que comprende un ADN-T transgénico flanqueado por al menos un límite de ADN-T del plásmido pRi2659 de *Agrobacterium rhizogenes*. Preferentemente, estos límites se describen por SEC ID N°: 18 ó 19. Más preferentemente, el plásmido comprende el límite derecho que comprende una secuencia como se describe por SEC ID N°: 19. Lo más preferentemente, el plásmido comprende ambas secuencias de límite, que comprenden una secuencia como se describe por SEC ID N°: 18 y 19, respectivamente. Preferentemente, dicho plásmido no comprende secuencias que provoquen un fenotipo de raíces pilosas, más preferentemente dicho plásmido no comprende secuencias codificantes de proteínas de ADN-T internas, lo más preferentemente dicho plásmido no comprende secuencias de ADN-T sustancialmente internas. El término "interno" en este contexto significa el ADN flanqueado por (pero que excluye los límites del ADN-T). Los límites del ADN-T se entienden como las secuencias que comprenden al menos las secuencias como se describen por SEC ID N°: 18 y 19, respectivamente. El término "sustancialmente" pretende significar que pueden incluirse algunas secuencias internas que no están ligadas a un fenotipo patógeno, preferentemente estas secuencias no tienen más de 200 pares de bases, preferentemente no más de 100 pares de bases, lo más preferentemente no más de 50 pares de bases, y son preferentemente directamente consecutivas a las secuencias de límite.

35 El ADN-T que va a incorporarse en el genoma de la planta por medio de la variante de cepa no patógena puede proporcionarse en diversas formas. El ADN-T puede proporcionarse como una construcción de ADN, preferentemente integrada en plásmidos específicos, tanto en un vector lanzadera, o intermedio, como en un vector binario. Puede producirse suministro, por ejemplo (pero no se limita a) por los siguientes medios:

a) El ADN-T puede incorporarse en el ADN cromosómico de la variante de cepa no patógena.

40 b) El ADN-T puede incorporarse en el ADN de plásmido Ri desarmado comprendido en la variante de cepa no patógena.

c) El ADN-T puede estar comprendido en la variante de cepa no patógena en forma de plásmido separado del plásmido Ri desarmado.

Preferentemente, el ADN-T en dicha variante de cepa no patógena está comprendido en un plásmido de vector binario separado del plásmido Ri desarmado.

45 En otra realización preferida, dicho ADN-T comprende además al menos un gen marcador, que permite la selección y/o identificación de plantas, células vegetales o tejidos transformados.

Otras realizaciones de la invención se refieren a células u organismos no humanos que comprenden una secuencia de nucleótidos, una variante de plásmido no patógeno o un ADN-T transgénico de la invención. Preferentemente, dichas células u organismos no humanos están seleccionados del grupo que consiste en bacterias, levaduras, plantas, mamíferos e insectos. En una realización preferida, dicha célula u organismo es una bacteria transmitida por la tierra del género *Rhizobiaceae*. En otra realización preferida, dicha célula u organismo es célula de planta u organismo de planta, más preferentemente seleccionada del grupo de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas. Las más preferidas son plantas seleccionadas del grupo que consiste en soja, grano (maíz), trigo, semilla de colza (canola), tagetes, patata, arroz, cebada y tomate.

55 Otra realización de la presente invención se refiere a un vector transgénico que comprende un ADN-T transgénico de la invención. Preferentemente, el ADN-T se proporciona en forma de un vector binario. En los llamados "sistemas de vector binario", el ADN-T está físicamente separado de los otros elementos funcionales del plásmido Ri (por

ejemplo, los genes *vir*), incorporándose en un vector lanzadera, que permitió manipulación más fácil (para la descripción de sistemas binarios basados en plásmidos Ti véanse los documentos EP-A 120 516; US 4.940.838). Estos vectores binarios comprenden (además del ADN-T desarmado con sus secuencias de límite), secuencias procariontas para la replicación tanto en *Agrobacterium* como *E. coli*. En el presente caso, la cepa de *Agrobacterium rhizogenes* desarmada empleada para la transformación comprende, además de su plásmido Ri desarmado, una de las células de *Agrobacterium* transformadas (generalmente fuera del ADN-T), un marcador para la selección de células vegetales transformadas y la secuencia de ácidos nucleicos de interés que va a transferirse (las posteriormente dos generalmente comprendidas dentro del ADN-T). El plásmido binario puede transferirse a la cepa de *Agrobacterium rhizogenes* desarmada, por ejemplo, por electroporación u otros procedimientos de transformación (Mozo 1991). Los vectores binarios son capaces de replicación tanto en *E. coli* como en *Agrobacterium*. Pueden transformarse directamente en *Agrobacterium* (por ejemplo, como se describe en Holsters 1978). *Agrobacterium*, que actúa de organismo huésped en este caso, debe ya contener un plásmido con la región *vir*. La última se requiere para transferir el ADN-T a la célula de planta. Un *Agrobacterium* así transformado puede usarse para transformar células vegetales. Un marcador de selección que permite la selección de *Agrobacterium* transformadas es, por ejemplo, el gen *nptI* o *nptII* que confiere resistencia contra kanamicina, o el gen *aadA* que confiere resistencia contra estreptomicina, espectinomycin. Diversos marcadores (genes marcadores de selección e indicadores) son adecuados para la identificación y/o selección de células vegetales, tejidos o plantas transformadas (véase más adelante para detalles). Se conocen en la técnica descripciones de sistemas de vector de *Agrobacterium* y procedimientos para la transformación mediada por *Agrobacterium* (Miki 1993; Gruber 1993; Moloney 1989). Se conocen diversos vectores binarios, algunos de los cuales están comercialmente disponibles tales como, por ejemplo, pBIN19 (Clontech Laboratories, Inc. EE.UU.). Todos los vectores adecuados para la transformación basados en *Agrobacterium tumefaciens* pueden también emplearse para el procedimiento de la invención. Vectores binarios comunes se basan en plásmidos de "amplia variedad de huéspedes" como pRK252 (Bevan 1984) o pTJS75 (Watson 1985) derivados del plásmido RK2 tipo P. La mayoría de estos vectores se derivan de pBIN19 (Bevan 1984). Se conocen diversos vectores binarios, algunos de los cuales están comercialmente disponibles tales como, por ejemplo, pBI101.2 o pBIN19 (Clontech Laboratories, Inc. EE.UU.). Se mejoraron vectores adicionales con respecto al tamaño y manipulación (por ejemplo, pPZP; Hajdukiewicz 1994). Sistemas de vector mejorados se describen también en el documento WO 02/00900. Un vector binario o cualquier otro vector puede modificarse por técnicas de recombinación de ADN comunes, multiplicarse en *E. coli* e introducirse en *Agrobacterium* por, por ejemplo, electroporación u otras técnicas de transformación (Mozo 1991).

Así, otra realización de la invención se refirió a una célula u organismo no humano que comprende una variante de plásmido no patógeno de la invención (como se ha especificado anteriormente) o un ADN-T transgénico o vector que comprende dicho ADN-T de la invención. Preferentemente, dicha célula u organismo no humano está seleccionado del grupo que consiste en bacterias, levaduras, plantas, mamíferos e insectos. Más preferentemente, dicha célula u organismo no humano es una bacteria transmitida por la tierra del género *Rhizobiaceae*. Especialmente se prefieren bacterias transmitidas por la tierra tales como *Sinorhizobium meliloti*, *Sinorhizobium medicae*, *Sinorhizobium fredii*, *Rhizobium sp. NGR234*, *Rhizobium sp. BR816*, *Rhizobium sp. N33*, *Rhizobium sp. GRH2*, *Sinorhizobium saheli*, *Sinorhizobium teranga*, *Rhizobium leguminosarum biovar trifolii*, *Rhizobium leguminosarum biovar viciae*, *Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli*, *Rhizobium tropici*, *Rhizobium etli*, *Rhizobium galegae*, *Rhizobium gallicum*, *Rhizobium giardinii*, *Rhizobium hainanense*, *Rhizobium mongolense*, *Rhizobium lupini*, *Mesorhizobium loti*, *Mesorhizobium huakuii*, *Mesorhizobium ciceri*, *Mesorhizobium mediterraneum*, *Mesorhizobium tianshanense*, *Bradyrhizobium elkanni*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium liaoningense*, *Azorhizobium caulinodans*, *Allobacterium undicola*, *Phyllobacterium myrsinacearum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium radiobacter*, *Agrobacterium rhizogenes*, *Agrobacterium vitis* y *Agrobacterium rubi*.

En una realización preferida de la invención, el ADN-T que va a integrarse en el genoma de la planta por medio de la cepa de *Agrobacterium rhizogenes* desarmada de la invención, que comprende al menos un casete de expresión para conferir a dicha planta un rasgo agronómicamente valioso. En otra realización preferida, dicho ADN-T comprende además al menos un gen marcador, que permite la selección y/o identificación de plantas, células vegetales o tejidos transformados. Así, el ADN-T insertado en el genoma de la planta diana comprende al menos un casete de expresión que puede, por ejemplo, facilitar la expresión del gen marcador de selección, genes de rasgo, ARN antisentido o ARN bicatenario. Preferentemente, dichos casetes de expresión comprenden una secuencia promotora funcional en células vegetales operativamente ligada a una secuencia de ácidos nucleicos que, tras la expresión, confiere un fenotipo ventajoso a la planta así transformada. El experto en la materia conoce numerosas secuencias que pueden utilizarse en este contexto, por ejemplo, para aumentar la calidad del alimento y pienso, para producir productos químicos, productos químicos finos o productos farmacéuticos (por ejemplo, vitaminas, aceites, hidratos de carbono; Dunwell 2000), conferir resistencia a herbicidas, o conferir esterilidad masculina. Además, puede potenciarse el crecimiento, rendimiento y resistencia contra factores de estrés abiótico y biótico (como, por ejemplo, hongos, virus o insectos). Pueden conferirse propiedades ventajosas tanto expresando en exceso proteínas como disminuyendo la expresión de proteínas endógenas, por ejemplo, expresando un ARN antisentido (Sheehy 1988; documento US 4.801.340; Mol 1990) o bicatenario correspondiente (Matzke 2000; Fire 1998; Waterhouse 1998; documentos WO 99/32619; WO 99/53050; WO 00/68374; WO 00/44914; WO 00/44895; WO 00/49035; WO 00/63364).

Para la expresión en plantas se prefieren promotores específicos de planta. El término “promotor específico de planta” se entiende que significa, en principio, cualquier promotor que puede gobernar la expresión de genes, en particular genes extraños, en plantas o partes de plantas, células vegetales, tejidos de plantas o cultivos de plantas. En este contexto, la expresión puede ser, por ejemplo, constitutiva, inducible o dependiente del desarrollo (como se define y especifica anteriormente).

El componente genético y/o el casete de expresión pueden comprender adicionalmente secuencias de control genético, además de un promotor. El término “secuencias de control genético” debe entenderse en el sentido más amplio y se refiere a todas aquellas secuencias que afectan la preparación o función de la construcción de ADN para la invención o un casete de expresión comprendido en ella. Por ejemplo, las secuencias de control genético modifican la transcripción y traducción en organismos procariotas o eucariotas. Preferentemente, los casetes de expresión según la invención engloban un promotor funcional en plantas en la dirección 5' de la secuencia de ácidos nucleicos en cuestión que va a expresarse recombinantemente, y en la dirección 3' una secuencia terminadora como secuencia de control genético adicional y, si es apropiado, elementos reguladores habituales adicionales, en cada caso asociados operativamente a la secuencia de ácidos nucleicos que va a expresarse recombinantemente.

Las secuencias de control genético se describen, por ejemplo, en “Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)” o “Gruber y Crosby, en: Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, CRC Press, Boca Raton, Florida, eds.: Glick y Thompson, Capítulo 7, 89-108” y las referencias citadas en su interior.

Ejemplos de tales secuencias de control son secuencias a las que se unen inductores o represores y así regulan la expresión del ácido nucleico. Las secuencias de control también engloban además la región sin traducir de 5', intrones o la región 3' no codificante de genes, tales como, por ejemplo, el intrón de actina-1, o los intrones de Adh1-S 1, 2 y 6 (referencia general: The Maize Handbook, Capítulo 116, Freeling y Walbot, Eds., Springer, New York (1994)). Se ha demostrado que pueden desempeñar una función significativa en la regulación de la expresión génica. Así, se ha demostrado que las secuencias sin traducir de 5' pueden potenciar la expresión transitoria de genes heterólogos. Ejemplos de potenciadores de la traducción que pueden mencionarse son la secuencia conductora de 5' del virus del mosaico del tabaco (Gallie 1987) y similares. Además, pueden promover la especificidad por tejido (Rouster 1998). Además, pueden promover la especificidad por tejido (Rouster 1998). En cambio, la región sin traducir de 5' del gen opaque-2 suprime la expresión. La delección de la región en cuestión conduce a una elevada actividad génica (Lohmer 1993). Las secuencias de control genético también pueden englobar secuencias de unión al ribosoma para iniciar la traducción. Esto se refiere en particular cuando la secuencia de ácidos nucleicos que va a expresarse no proporcione secuencias adecuadas o cuando no sean compatibles con el sistema de expresión.

El casete de expresión puede comprender ventajosamente una o más secuencias potenciadoras, asociadas operativamente a un promotor, que hacen posible una elevada expresión recombinante de la secuencia de ácidos nucleicos. También pueden insertarse secuencias ventajosas adicionales, tales como elementos reguladores o terminadores adicionales, en el extremo 3' de las secuencias de ácidos nucleicos que van a expresarse recombinantemente. Señales de poliadenilación que son adecuadas como secuencias de control son señales de poliadenilación de planta, preferentemente aquellas que se corresponden esencialmente con señales de poliadenilación de ADN-T de *Agrobacterium tumefaciens*, en particular el terminador de octopina sintasa (OCS) y el terminador de nopalina sintasa (NOS).

Una o más copias de las secuencias de ácidos nucleicos que van a expresarse recombinantemente pueden estar presentes en la construcción de gen. Se entiende además que las secuencias de control genético significan secuencias que codifican proteínas de fusión que consisten en una secuencia de péptidos señal.

Las secuencias de control deben entenderse además como aquellas que permiten la eliminación de las secuencias insertadas del genoma. Procedimientos basados en el sistema cre/lox (Sauer B 1998; Odell 1990; Dale 1991), FLP/FRT (Lysnik 1993) o Ac/Ds (Wader 1987; documento US 5.225.341; Baker 1987; Lawson 1994) permiten una eliminación, específica de tejido y/o inducible si es apropiada, de una secuencia de ADN específica del genoma del organismo huésped. Secuencias de control pueden significar en este contexto las secuencias flanqueantes específicas (por ejemplo, secuencias lox), que después permiten la eliminación (por ejemplo, por medio de cre recombinasa).

El componente genético y/o casete de expresión de la invención puede comprender adicionalmente elementos funcionales. El término elemento funcional debe entenderse en sentido amplio y se refiere a todos aquellos elementos que tienen un efecto sobre la generación, amplificación o función del componente genético, casetes de expresión u organismos recombinantes según la invención. Los elementos funcionales pueden incluir, por ejemplo, (pero no deben limitarse a):

1. Genes marcadores de selección

Los genes marcadores de selección son útiles para seleccionar y separar satisfactoriamente células transformadas o recombinadas homólogas. Preferentemente, dentro del procedimiento de la invención, un marcador puede

emplearse para la selección en un huésped procariota, mientras que otro marcador puede emplearse para la selección en un huésped eucariota, particularmente el huésped de especies de plantas. Los marcadores pueden ser protección contra un biocida, tal como antibióticos, toxinas, metales pesados o similares, o pueden funcionar por complementación, confiriendo prototrofia a un huésped auxotrófico. Genes marcadores de selección preferidos para plantas pueden incluir, pero no se limitan a, los siguientes:

1.1 Marcadores de selección negativa

Los marcadores de selección negativa confieren una resistencia a un compuesto biocida tal como un inhibidor metabólico (por ejemplo, 2-desoxiglucosa-6-fosfato, documento WO 98/45456), antibióticos (por ejemplo, kanamicina, G 418, bleomicina o higromicina) o herbicidas (por ejemplo, fosfotricina o glifosato). Marcadores de selección negativa especialmente preferidos son aquellos que confieren resistencia a herbicidas. Ejemplos que pueden mencionarse son:

- Fosfotricina acetiltransferasas (PAT; también llamada resistencia a bialofos; bar; De Block 1987; documentos EP 0 333 033; US 4.975.374)
- Gen 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS; documento US 5.633.435) o glifosato oxidoreductasa (documento US 5.463.175) que confiere resistencia a glifosato (N-fosfonometilglicina) (Shah 1986)
- Enzimas degradadoras de glifosato (glifosato oxidoreductasa; gox),
- Deshalogenasas inactivantes de dalapon (deh)
- Acetolactato sintasas inactivantes de sulfonilurea e imidazolinona (por ejemplo, variantes de ALS mutadas con, por ejemplo, la mutación S4 y/o Hra)
- Nitrilasas degradantes de bromoxinilo (bxn)
- Genes de resistencia a kanamicina o G418 (NPTII; NPTI) que codifican, por ejemplo, neomicina fosfotransferasas (Fraley 1983), que expresan una enzima que confiere resistencia al antibiótico kanamicina y los antibióticos relacionados neomicina, paromomicina, gentamicina y G418,
- 2-Desoxiglucosa-6-fosfato fosfatasa (producto génico DOGR1; documentos WO 98/45456; EP 0 807 836) que confiere resistencia contra 2-desoxiglucosa (Randez-Gil 1995)
- Higromicina fosfotransferasa (HPT), que media en la resistencia a higromicina (Vanden Elzen 1985)
- Dihidrofolato reductasa (Eichholtz 1987)

Genes marcadores de selección negativa adicionales de origen bacteriano que confieren resistencia a antibióticos incluyen el gen *aadA*, que confiere resistencia al antibiótico espectinomina, gentamicina acetil transferasa, estreptomina fosfotransferasa (SPT), aminoglucósido-3-adenil transferasa y el determinante de resistencia a bleomicina (Hayford 1988; Jones 1987; Svab 1990; Hille 1986).

Se prefieren especialmente marcadores de selección negativa que confieren resistencia contra los efectos tóxicos impuestos por D-aminoácidos como, por ejemplo, D-alanina y D-serina (documento WO 03/060133). Especialmente preferido como marcador de selección negativa en este contexto son el gen *daol* (EC: 1.4.3.3; n° de acceso de GenBank: U60066) de la levadura *Rhodotorula gracilis* (*Rhodospiridium toruloides*) y el gen *dsdA* de *E. coli* (D-serina deshidratasa (D-serina desaminasa) [EC: 4.3.1.18; n° de acceso de GenBank: J01603).

1.2) Marcador de selección positiva

Los marcadores de selección positiva están confiriendo una ventaja de crecimiento a una planta transformada en comparación con una no transformada. Genes como isopenteniltransferasa de *Agrobacterium tumefaciens* (cepa: PO22; n° de acceso de Genbank: AB025109) pueden facilitar, como enzima clave de la biosíntesis de citoquinina, la regeneración de plantas transformadas (por ejemplo, por selección sobre medio libre de citoquinina). Se describen procedimientos de selección correspondientes (Ebinuma 2000a,b). Marcadores de selección positiva adicionales, que confieren una ventaja de crecimiento a una planta transformada en comparación con una no transformada, se describen, por ejemplo, en el documento EPA 0 601 092. Los marcadores de selección de estimulación del crecimiento pueden incluir (pero no deben limitarse a) β -glucuronidasa (en combinación con, por ejemplo, citoquinina glucurónido), manosa-6-fosfato isomerasa (en combinación con manosa), UDP-galactosa-4-epimerasa (en combinación con, por ejemplo, galactosa), en la que la manosa-6-fosfato isomerasa en combinación con manosa es especialmente preferida.

1.2) Marcador de contra-selección

Los marcadores de contra-selección son especialmente adecuados para seleccionar organismos con secuencias delecionadas definidas que comprenden dicho marcador (Koprek 1999). Ejemplos de marcador de selección negativa comprenden timidina cinasas (TK), citosina desaminasas (Gleave 1999; Perera 1993; Stougaard 1993), proteínas citocromo P450 (Koprek 1999), haloalcano deshalogenasas (Naested 1999), productos génicos *iaaH* (Sundaresan 1995), citosina desaminasa *codA* (Schlaman & Hooykaas 1997) o productos génicos *tms2* (Fedoroff & Smith 1993).

2) Genes indicadores

Los genes indicadores codifican fácilmente proteínas cuantificables y, mediante su color o actividad enzimática, hacen posible una evaluación de la eficacia de transformación, el sitio de expresión o el tiempo de expresión. Muy especialmente preferidos en este contexto son los genes que codifican proteínas indicadoras (Schenborn 1999) tales como la proteína verde fluorescente (GFP) (Sheen 1995; Haseloff 1997; Reichel 1996; Tian 1997; documento WO 97/41228; Chui 1996; Leffel 1997), cloranfenicol transferasa, una luciferasa (Ow 1986; Millar 1992), el gen *aeuorina* (Prasher 1985), β -galactosidasa, gen de locus R (que codifica una proteína que regula la producción de pigmentos de antocianina (coloración roja) en tejido de planta y así hace posible el análisis directo de una actividad de promotor sin la adición de sustancias auxiliares adicionales o sustratos cromogénicos (Dellaporta 1988; Ludwig 1990), siendo la β -glucuronidasa (GUS) muy especialmente preferida (Jefferson 1987a,b). La expresión de β -glucuronidasa (GUS) se detecta por un color azul tras la incubación del tejido con ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónico, la expresión de luciferasa bacteriana (LUX) se detecta por emisión de luz; la expresión de luciferasa de luciérnaga (LUC) se detecta por emisión de luz después de la incubación con luciferina; y la expresión de galactosidasa se detecta por un color azul brillante después de que el tejido se tiñera con 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido. También pueden usarse genes indicadores como marcadores puntuables como alternativas a marcadores de resistencia a antibióticos. Tales marcadores se usan para detectar la presencia o para medir el nivel de expresión del gen transferido. El uso de marcadores puntuables en plantas para identificar o marcar células genéticamente modificadas funciona bien solo cuando la eficiencia de modificación de la célula es alta.

3) Orígenes de replicación, que garantizan la amplificación de los casetes de expresión o vectores según la invención en, por ejemplo, *E. coli*. Ejemplos que pueden mencionarse son ORI (origen de replicación de ADN), pBR322 ori o P15A ori (Maniatis 1989). Ejemplos adicionales de sistemas de replicación funcional en *E. coli* son ColE1, pSC101, pACYC184 o similares. Además de o en lugar del sistema de replicación en *E. coli*, puede emplearse un sistema de replicación de amplia variedad de huéspedes, tal como los sistemas de replicación de los plásmidos de incompatibilidad P-1; por ejemplo, pRK290. Estos plásmidos son particularmente eficaces con plásmidos Ti armados y desarmados para la transferencia de ADN-T al huésped de planta.

4) Elementos que son necesarios para la transformación mediada por *Agrobacterium*, tales como, por ejemplo, el límite derecho y/u, opcionalmente, el izquierdo del ADN-T o la región *vir*.

5) Sitios de clonación múltiple (MCS) para permitir y facilitar la inserción de una o más secuencias de ácidos nucleicos.

Normalmente, las construcciones que comprenden un ADN-T (o cualquier otra construcción de ADN empleada dentro del alcance de la presente invención) se preparan usando técnicas de expresión transgénica. Las técnicas de expresión recombinante implican la construcción de ácidos nucleicos recombinantes y la expresión de genes en células transfectadas. Se conocen en la técnica técnicas de clonación molecular para lograr estos fines. Una amplia variedad de procedimientos de clonación y amplificación *in vitro* adecuados para la construcción de ácidos nucleicos recombinantes son muy conocidos para los expertos. Ejemplos de estas técnicas e instrucciones suficientes para dirigir a los expertos a través de muchos ejercicios de clonación se encuentran en Berger y Kimmel (1987), Maniatis 1989, Silhavy 1984, Ausubel 1998). Preferentemente, la construcción de ADN según la invención se genera uniendo los constituyentes esenciales anteriormente mencionados de la construcción de ADN juntos en la secuencia anteriormente mencionada usando las técnicas de recombinación y clonación con las que está familiarizado el experto.

La construcción de construcciones de polinucleótidos generalmente requiere el uso de vectores capaces de replicarse en bacterias. Están comercialmente disponibles una plétora de kits para la purificación de plásmidos de bacterias. Para su uso apropiado, seguir las instrucciones del fabricante (véase, por ejemplo, EasyPrep™, FlexiPrep™, ambos de Pharmacia Biotech; Strataclean™, de Stratagene; y, QIAexpress™ Expression System, Qiagen). Los plásmidos aislados y purificados pueden entonces manipularse adicionalmente para producir otros plásmidos, usarse para transfectar células o incorporarse en *Agrobacterium tumefaciens* para infectar y transformar plantas. Si *Agrobacterium* es el medio de transformación, se construyen vectores lanzadera.

4. El procedimiento de transformación

Los procedimientos de la invención son útiles para obtener plantas transgénicas, o células, partes, tejidos, material recolectado derivado de las mismas.

Por consiguiente, otra materia de la invención se refiere a plantas transgénicas o células vegetales que comprenden en su genoma, preferentemente en su ADN cromosómico nuclear, la construcción de ADN según la invención (por ejemplo, el ADN-T que comprende los límites del plásmido Ri pRi2659), y a células, cultivos celulares, tejidos, partes o material de propagación tal como, por ejemplo, en el caso de organismos de planta, hojas, raíces, semillas, fruto, polen y similares, derivados de tales plantas. Otro aspecto importante de la invención incluye la progenie de las plantas transgénicas preparadas por los procedimientos desvelados, además de las células derivadas de tal progenie, y las semillas obtenidas de tal progenie.

Pueden excluirse variedades de plantas, particularmente variedades de plantas registrables según los Derechos de las Obtenciones Vegetales. Se observa que una planta no necesita considerarse una "variedad de planta"

- 5 simplemente debido a que contiene establemente dentro de su genoma un transgén, introducido en una célula de la planta o un ancestro de la misma. Además de una planta, la presente invención proporciona cualquier clon de una planta tal, semilla, progenie autofecundada o híbrida y descendientes, y cualquier parte o propágula de cualquiera de éstos, tales como esquejes y semilla, que puede usarse en la reproducción o propagación, sexual o asexual.
- 10 También está englobado por la invención una planta que es una descendencia sexualmente o asexualmente propagada, clon o descendiente de una planta tal, o cualquier parte o propágula de dicha planta, descendencia, clon o descendiente. También pueden usarse plantas genéticamente modificadas según la invención que pueden ser consumidas por los seres humanos o animales como alimentos o pienso, por ejemplo, directamente o tras el procesamiento conocido en la técnica.
- 15 El procedimiento de la invención puede emplearse prácticamente en todas las variedades de plantas, que incluyen variedades de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas (como se define y se especifica anteriormente). Sorprendentemente, la cepa de *Agrobacterium rhizogenes* desarmada de la invención produjo alta eficiencia de transformación para plantas monocotiledóneas como, por ejemplo, maíz (*Zea mays*). Hay diversos procedimientos para la transformación de plantas monocotiledóneas. El bombardeo con partículas está frecuentemente favorecido, debido a su eficiencia y no limitación de la variedad de huéspedes (Christou 1995; Jahne 1995). Sin embargo, la estructura irregular y el número de eventos de transformación (por ejemplo, múltiples copias o fragmentadas) requiere cribado y análisis detallado de un alto número de los transgénicos resultantes (Hadi 1996; Trick 1997). Por otra parte, el establecimiento de un sistema para la transformación de plantas monocotiledóneas mediado por *Agrobacterium* se ha considerado difícil, ya que la infección de plantas monocotiledóneas por *Agrobacterium* es un evento muy raro y solo podría lograrse eficiencia razonable usando cepas 'super-virulentas' de *A. tumefaciens* y/o acetosiringona, un compuesto fenólico que induce la expresión de genes *vir* sobre el plásmido Ti (Belarmino 2000; Eady 2000; Hiei 1994; Smith y Hood 1995; Wilmink 1992). Sin embargo, no hay informes antes de la presente invención de la transformación de monocotiledóneas mediada por una cepa de *A. rhizogenes* desarmada.
- 20 También pueden emplearse numerosos explantes, tejidos de plantas o cultivo de células de planta como material diana para el proceso de co-cultivo. Un experto reconocerá que después de que se ha incorporado establemente la construcción de ADN en plantas transgénicas y confirmado que es operable, puede introducirse en otras plantas por cruce sexual. Puede usarse cualquiera de las varias técnicas de cultivo estándar, dependiendo de las especies que vayan a cruzarse.
- 25 Para transferir el ADN a la célula de planta, explantes de planta se co-cultivan con *Agrobacterium rhizogenes* desarmado de la invención que comprende el ADN-T transgénico. A partir del material de planta infectado (por ejemplo, secciones de hoja, raíz o tallo, pero también protoplastos o suspensiones de células vegetales), pueden regenerarse plantas intactas usando un medio adecuado que puede contener, por ejemplo, antibióticos o biocidas para seleccionar células transformadas. Las plantas obtenidas pueden entonces cribarse en presencia del ADN introducido, en este caso la construcción de ADN según la invención. Tan pronto como el ADN se ha integrado en el genoma del huésped, el genotipo en cuestión es, generalmente, estable y la inserción en cuestión también se encuentra en las generaciones posteriores. Preferentemente, la planta establemente transformada se selecciona utilizando un marcador de selección comprendido en el ADN-T transgénico. Las plantas obtenidas pueden cultivarse e hibridarse del modo habitual. Deben cultivarse dos o más generaciones con el fin de garantizar que la integración genómica sea estable y hereditaria.
- 30 Son adecuados diversos tejidos como material de partida (explante) para el proceso de transformación mediado por *Agrobacterium* que incluye, pero no se limitan a, callo (documentos US 5.591.616; EP-A1 604 662), embriones inmaduros (documento EP-A1 672 752), polen (documento US 54.929.300), brote apical (documento US 5.164.310) o transformación *in planta* (documento US 5.994.624). El procedimiento y material descrito en el presente documento puede combinarse con prácticamente todos los procedimientos de transformación mediados por *Agrobacterium* conocidos en la técnica. Combinaciones preferidas incluyen, pero no se limitan a, los siguientes materiales de partida y procedimientos:
- 40
- 45

Variedad	Material / citación
Plantas monocotiledóneas:	Embriones inmaduros (documento EP-A1 672 752) Callo (documento EP-A1 604 662) Callo embriogénico (documento US 6.074.877) Inflorescencia (documento US 6.037.522) Flor (<i>in planta</i>) (documento WO 01/12828)
Banana	Documentos US 5.792.935; EP-A1 731 632; US 6.133.035
Cebada	Documento WO 99/04618

(continuación)

Variedad	Material / citación
Maíz	Documentos US 5.177.010; US 5.987.840
Piña	Documentos US 5.952.543; WO 01/33943
Arroz	Documentos EP-A1 897 013; US 6.215.051; WO 01/12828
Trigo	Documentos AU-B 738 153; EP-A1 856 060
Judías	Documentos US 5.169.770; EP-A1 397 687
Brassica	Documentos US 5.188.958; EP-A1 270 615; EP-A1 1.009.845
Cacao	Documento US 6.150.587
Cítrico	Documento US 6.103.955
Café	Documento AU 729 635
Algodón	Documentos US 5.004.863; EP-A1 270 355; US 5.846.797; EP-A1 1.183.377; EP-A1 1.050.334; EP-A1 1.197.579; EP-A1 1.159.436 Transformación en polen (documento US 5.929.300) Transformación <i>in planta</i> (documento US 5.994.624)
Guisante	Documento US 5.286.635
Pimiento	Documento US 5.262.316
Álamo	Documento US 4.795.855
Soja	Nudo cotiledonar de plantas de semillero de soja germinadas Brote apical (documento US 5.164.310) Tejido meristemático axilar de nudo de hoja primario, o superior, de aproximadamente 7 días de plantas de semillero de soja germinadas Cultivos de callo organogénico Ejes de embrión deshidratados Documentos US 5.376.543; EP-A1 397 687; US 5.416.011; US 5.968.830; US 5.563.055; US 5.959.179; EP-A1 652 965; EP-A1 1.141.346
Remolacha azucarera	Documentos EP-A1 517 833; WO 01/42480
Tomate	Documento US 5.565.347

- La eficiencia de la transformación con *Agrobacterium* puede potenciarse por numerosos otros procedimientos conocidos en la técnica como, por ejemplo, formación de incisiones, infiltración a vacío (documento WO 00/58484), choque térmico y/o centrifugación, adición de nitrato de plata, sonicación, etc. En una realización preferida de la invención, se hacen incisiones en el material de explante antes de la inoculación (co-cultivo) con *Agrobacterium*. Pueden usarse muchos procedimientos de formación de incisiones, que incluyen, por ejemplo, corte, erosión, perforación, pinchado, penetración con partículas finas o fluidos presurizados, formación de incisiones con plasma, aplicación de presión hiperbárica, o sonicación. La formación de incisiones puede realizarse usando objetos tales como, pero no se limitan a, bisturís, tijeras, agujas, objetos abrasivos, aerógrafos, partículas, pistolas eléctricas de genes u ondas de sonido. Otra alternativa es la infiltración a vacío (documentos EP-A1 1.141.356; EP-A1 1.171.618). Otros procedimientos para aumentar la eficiencia de transformación de *Agrobacterium* pueden conocerse en la técnica pueden combinarse, que incluyen, pero no se limitan a, sonicación (documento EP-A1 904.362) o reducción de peso del tejido diana (documento EP-A1 1.137.790).
- Las bacterias *Agrobacteria rhizogenes* desarmadas de la invención se cultivan y se usan de un modo como se conoce en la técnica. El vector que comprende la cepa de *Agrobacterium* puede, por ejemplo, cultivarse durante 3

días en medio YEB (véase el Ejemplo 2.6) complementado con el antibiótico apropiado (por ejemplo, 50 mg/l de espectinomicina). Las bacterias se recogen con un bucle del medio sólido y se resuspenden. En una realización preferida de la invención, los cultivos de *Agrobacterium* se inician usando alícuotas congeladas a -80 °C. Para el tratamiento con *Agrobacterium* de pecíolos aislados, las bacterias se resuspenden en el medio usado para el cultivo de pecíolos.

La concentración de *Agrobacterium* usada para la infección y co-cultivo puede necesitar ser variada. Así, puede usarse un intervalo de concentraciones de *Agrobacterium* de 10^5 a 10^{10} ufc/ml y un intervalo de periodos de co-cultivo de algunas horas a 7 días. El co-cultivo de *Agrobacterium* con los pecíolos aislados se lleva a cabo en general durante 1 a 5, preferentemente 2 a 4 días.

A continuación, los explantes se inoculan con el cultivo de *Agrobacterium* durante algunos minutos a algunas horas, normalmente aproximadamente 10 minutos a 3 horas, preferentemente aproximadamente 0,5 horas a 1 hora. Se drena el medio en exceso y se permite que *Agrobacterium* se co-cultive con el tejido diana durante varios días, normalmente tres días en la oscuridad. Durante esta etapa, *Agrobacterium* transfiere a la construcción de gen extraño a algunas células en el tejido diana. Normalmente no está presente agente de selección durante esta etapa.

Es posible, aunque no necesario, emplear uno o más compuestos fenólicos en el medio antes o durante el co-cultivo de *Agrobacterium*. "Compuestos fenólicos de planta" o "fenólicos de planta" adecuados dentro del alcance de la invención son aquellas moléculas fenólicas sustituidas aisladas que pueden inducir una respuesta quimiotáctica positiva, particularmente aquellas que pueden inducir el aumento de la expresión del gen *vir* en un plásmido Ri que contiene *Agrobacterium* sp. Se prefiere acetosiringona. Además, se espera que ciertos compuestos, tales como osmoprotectores (por ejemplo, L-prolina preferentemente a una concentración de aproximadamente 700 mg/l o betaína), fitohormonas (entre otras, NAA), opinas o azúcares, actúen sinérgicamente cuando se añadan en combinación con compuestos fenólicos de planta. El compuesto fenólico de planta, particularmente acetosiringona, puede añadirse al medio antes de poner en contacto los pecíolos aislados con *Agrobacterium* (durante, por ejemplo, varias horas a un día). Posibles concentraciones de compuestos fenólicos de planta en el medio oscilan de aproximadamente 25 μ M a 700 μ M. Sin embargo, para los procedimientos de la invención, preferentemente no se emplea acetosiringona. Condiciones de inducción particularmente adecuadas para *Agrobacterium tumefaciens* se han descrito por Vernade y col. (1988).

La suplementación del medio de co-cultivo con antioxidantes (por ejemplo, ditioneitol) o compuestos de tior (por ejemplo, L-cisteína, Olhoff 2001) que puede disminuir la necrosis de tejido debido a las respuesta de defensa de las plantas (como oxidación fenólica) puede mejorar adicionalmente la eficiencia de la transformación mediada por *Agrobacterium*.

Después del co-cultivo pueden incluirse etapas para eliminar, suprimir el crecimiento o destruir *Agrobacterium rhizogenes*. Esta etapa pueden incluir una o más etapas de lavado. El medio empleado después de la etapa de co-cultivo contiene preferentemente un bactericida (antibiótico). Esta etapa pretende terminar o al menos retardar el crecimiento de las células no transformadas y destruir las células de *Agrobacterium* restantes. Antibióticos preferidos que van a emplearse son, por ejemplo, carbenicilina (500 mg/l) o Timentin™ (GlaxoSmithKline; una mezcla de ticarcilina disódica y clavulanato potásico; 0,8 g de Timentin™ contiene 50 mg de ácido clavulánico con 750 mg de ticarcilina. Químicamente, la ticarcilina disódica es la sal de sodio del ácido N-(2-carboxi-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]hept-6-il)-3-tiofenomalonámico. Químicamente, el clavulanato potásico es (Z)-(2R,5R)-3-(2-hidroxiethyliden)-7-oxo-4-oxa-1-azabicyclo[3.2.0]heptano-2-carboxilato de potasio).

Después de la etapa de co-cultivo, los explantes co-cultivados se incuban preferentemente sobre un medio de regeneración que comprende al menos un factor de crecimiento de planta. Los medios empleados pueden contener adicionalmente al menos un compuesto, que en combinación con el gen marcador de selección, permite la identificación y/o puede aplicarse a la selección de células vegetales (por ejemplo, un agente selectivo). Sin embargo, se prefiere que los explantes se incuben durante un cierto tiempo, preferentemente 5 a 14 días, después de la etapa de co-cultivo en medio que carece de un compuesto de selección. El establecimiento de un nivel de resistencia fidedigno contra dicho compuesto de selección necesita algún tiempo para prevenir el daño accidental por el compuesto de selección incluso a las células transformadas y tejido.

Las células transformadas, es decir, aquellas que comprenden el ADN integrado en el ADN de la célula huésped, pueden seleccionarse de células no transformadas preferentemente usando el procedimiento de selección de la invención. Tan pronto como se ha generado una célula de planta transformada, puede obtenerse una planta intacta usando procedimientos conocidos para el experto. Por ejemplo, se usan cultivos de callo como material de partida. La formación de brote y raíz puede inducirse en esto como biomasa de células todavía sin diferenciar en el modo conocido. Los brotes obtenidos pueden plantarse y cultivarse.

Las técnicas mediadas por *Agrobacterium* normalmente pueden producir la administración de genes a un número limitado de células en el tejido elegido como diana. Por tanto, en una realización preferida de la invención, se aplica un agente selectivo después de la transformación para destruir todas las células en los tejidos elegidos como diana que no se transforman o para identificar células transformadas mediante una ventaja selectiva. La duración del cultivo depende, en parte, de la toxicidad del agente de selección para células no transformadas. El gen marcador

de selección y el compuesto de selección correspondiente usado para dicha selección o cribado puede ser cualquiera de una variedad de compuestos de selección bien conocidos, tales como antibióticos, herbicidas o D-aminoácidos (véase más adelante para detalles). La duración de esta etapa de cultivo es variable (dependiendo del compuesto de selección y su concentración, el gen marcador de selección), extendiéndose de un día a 120 días. La inserción de un gen marcador de selección y/o cribable está comprendida dentro del alcance del procedimiento de la invención. Esto puede ser ventajoso, por ejemplo, para el uso posterior como rasgo resistente a herbicidas.

Por ejemplo, con el gen de resistencia a kanamicina (neomicina fosfotransferasa, *NPTII*) como marcador selectivo, la kanamicina puede incluirse en el medio a una concentración de aproximadamente 3 a 200 mg/l. Concentraciones típicas para la selección son 5 a 50 mg/l. El tejido se cultiva en este medio durante un periodo de 1 a 3 semanas, preferentemente aproximadamente 7 días, hasta que se han desarrollado los brotes.

Por ejemplo, con el gen de resistencia a fosfotricina (bar) como marcador selectivo, la fosfotricina puede incluirse en el medio a una concentración de aproximadamente 3 a 200 mg/l. Concentraciones típicas para la selección son 5 a 50 mg/l. El tejido se cultiva en este medio durante un periodo de 1 a 3 semanas, preferentemente aproximadamente 7 días, hasta que se han desarrollado los brotes.

Por ejemplo, con el gen *dao1* como marcador selectivo, puede incluirse en el medio D-serina o D-alanina a una concentración de aproximadamente 3 a 100 mg/l. Concentraciones típicas para la selección son 20 a 40 mg/l. El tejido se cultiva en este medio durante un periodo de 1 a 3 semanas, preferentemente aproximadamente 7 días, hasta que se han desarrollado los brotes.

Las células vegetales transformadas, derivadas por cualquiera de las técnicas de transformación anteriores, pueden cultivarse para regenerar una planta completa que posee el genotipo transformado y así el fenotipo deseado. Tales técnicas de regeneración se basan en la manipulación de ciertas fitohormonas en un medio de crecimiento de cultivo de tejido, basándose normalmente en un marcador de biocida y/o herbicida que se ha introducido junto con las secuencias de nucleótidos deseadas. Se describe la regeneración de plantas de protoplastos cultivados (Evans 1983; Binding, 1985). La regeneración también puede obtenerse de callo de planta, explantes, embriones somáticos (Dandekar 1989; McGranahan 1990), órganos o partes de los mismos. Se describen tales técnicas de regeneración (generalmente en Klee 1987). Se describen otras técnicas de regeneración disponibles (Vasil 1984; Weissbach 1989).

Los medios que se emplean durante el procedimiento de la invención para la regeneración y/o selección pueden estar opcionalmente adicionalmente complementados con uno o más reguladores del crecimiento de plantas como, por ejemplo, compuestos de citoquinina (por ejemplo, 6-bencilaminopurina) y/o compuestos de auxina (por ejemplo, 2,4-D). El término "regulador del crecimiento de plantas" (PGR), como se usa en el presente documento, significa compuestos que se producen naturalmente o sintéticos (no que se producen naturalmente) que pueden regular el crecimiento y desarrollo de plantas. Los PGR pueden actuar individualmente o conjuntamente con otro o con otros compuestos (por ejemplo, azúcares, aminoácidos). El término "auxina" o "compuestos de auxina" comprende compuestos que estimulan el alargamiento y división celular, diferenciación de tejido vascular, desarrollo de frutos, formación de raíces adventicias, producción de etileno y, a altas concentraciones, inducen la dediferenciación (formación de callo). La auxina que se produce naturalmente más común es el ácido indolacético (IAA), que es transportado polarmente en raíces y tallos. Se usan ampliamente auxinas sintéticas en el agricultura moderna. Los compuestos de auxina comprenden ácido indol-3-butírico (IBA), ácido naftilacético (NAA) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Los compuestos que inducen la formación de brotes incluyen, pero no se limitan a, IAA, NAA, IBA, citoquininas, auxinas, quinetinas, glifosato y tiadiazorun.

El término "citoquinina" o "compuesto de citoquinina" comprende compuestos que estimulan la división celular, expansión de cotiledones y crecimiento de yemas laterales. Retrasan la senescencia de hojas desprendidas y, en combinación con auxinas (por ejemplo, IAA), pueden influir en la formación de raíces y brotes. Los compuestos de citoquinina comprenden, por ejemplo, 6-isopenteniladenina (IPA) y 6-benciladenina/6-bencilaminopurina (BAP).

Los descendientes pueden generarse por propagación sexual o no sexual. La propagación no sexual puede realizarse por introducción de embriogénesis somática por técnicas muy conocidas en la técnica. Preferentemente, se generan descendientes por propagación / fertilización sexual. La fertilización puede realizarse tanto por autofecundación (auto-polinización) como cruce con otras plantas transgénicas o no transgénicas. La planta transgénica de la invención puede funcionar en el presente documento tanto de planta materna como paterna. Los descendientes pueden comprender una o más copias del gen de rasgo agrónomicamente valioso. Preferentemente, se aíslan descendientes que solo comprenden una copia de dicho gen de rasgo.

Todas las composiciones y procedimientos desvelados y reivindicados en el presente documento pueden prepararse y ejecutarse sin excesiva experimentación en vista de la presente divulgación. Aunque las composiciones y procedimientos de la presente invención se han descrito en términos de realizaciones preferidas, será evidente para aquellos expertos en la materia que pueden aplicarse variaciones a la composición, procedimientos y en las etapas o en la secuencia de etapas del procedimiento descrito en el presente documento sin apartarse del concepto, espíritu y alcance de la invención. Más específicamente, será evidente que ciertos agentes que están tanto químicamente como fisiológicamente relacionados pueden estar sustituidos con los agentes descritos en el presente documento, mientras que se lograrían los mismos resultados o similares. Todos aquellos sustitutos similares y

5 modificaciones evidentes para aquellos expertos en la materia se consideran que están dentro del espíritu, alcance y concepto de la invención como se define por las reivindicaciones adjuntas. Todas las publicaciones y solicitudes de patente mencionadas en esta memoria descriptiva son indicativas del nivel de experiencia de aquellos expertos en la materia a la que se refiere la presente invención. Todas las publicaciones y solicitudes de patente se incorporan en el presente documento por referencia al mismo grado que si cada publicación o solicitud de patente individual se indicara específicamente e individualmente que se incorpora por referencia. Ahora se ilustrarán ciertos aspectos y realizaciones de la invención a modo de ejemplo y con referencia a la figura descrita más adelante.

Secuencias

1. SEC ID Nº: 1: Secuencia de ácidos nucleicos que codifica la secuencia del flanco derecho de pRI2659
2. SEC ID Nº: 2: Secuencia de ácidos nucleicos que codifica la secuencia del flanco izquierdo de pRI2659
3. SEC ID Nº: 3: Secuencia de ácidos nucleicos del vector de clonación pRL278 (nº de acceso de GenBank: L05083)
4. SEC ID Nº: 4: Secuencia de ácidos nucleicos que codifica la región de ADN-T de pRI2659 (nº de acceso de GenBank AJ271050).
5. SEC ID Nº: 5: Motivo de la secuencia intergénica de ARNr 16S-23S de la cepa K599 de *Agrobacterium*
M1: 5'-AATCGTTCGATGCGAATTGTTG-3'
6. SEC ID Nº: 6: Motivo de la secuencia intergénica de ARNr 16S-23S de la cepa K599 de *Agrobacterium*
M2: 5'-GTTTTGTCCTGACGCTGTCGCGA-3'
7. SEC ID Nº: 7: Motivo de la secuencia intergénica de ARNr 16S-23S de la cepa K599 de *Agrobacterium*
M3: 5'-TCTAACGATCGCTGCGCTCCGGA-3'
8. SEC ID Nº: 8: Motivo de la secuencia intergénica de ARNr 16S-23S de la cepa K599 de *Agrobacterium*
M4: 5'-CGCCACGAGGCGCGACGGA-3'
9. SEC ID Nº: 9: Motivo de la secuencia intergénica de ARNr 16S-23S de la cepa K599 de *Agrobacterium*
M5: 5'-TTATGGGCGAATTGATCTGA-3'
10. SEC ID Nº: 10: Motivo de la secuencia intergénica de ARNr 16S-23S de la cepa K599 de *Agrobacterium*
M6: 5'-GTCCTGCTAAGGATTGATGCCT-3'
11. SEC ID Nº: 11: Motivo de la secuencia intergénica de ARNr 16S-23S de la cepa K599 de *Agrobacterium*
M7: 5'-AGACCAGTCCCTTGTGAAACC-3'
12. SEC ID Nº: 12: Motivo de la secuencia intergénica de ARNr 16S-23S de la cepa K599 de *Agrobacterium*
M8: 5'-CCTGGGCATTTTTGTTGTTGG-3'
13. SEC ID Nº: 13: Motivo de la secuencia intergénica de ARNr 16S-23S de la cepa K599 de *Agrobacterium*
M9: 5'-AATGGTATGGCTTCGAGGTG-3'
14. SEC ID Nº: 14: Motivo de la secuencia intergénica de ARNr 16S-23S de la cepa K599 de *Agrobacterium*
M10: 5'-CTCAAAGAAGACCGTACCGACA-3'
15. SEC ID Nº: 15: Vector binario pBPSEW008
[p-NOS::c-bar:a-NOS p-PcUBI::c-gusINT::t-NOS]
16. SEC ID Nº: 16: Vector binario pBPSMM192b
[p-AtAhas::c-csr1-2::t-AtAHAS t-NOS::c-gusINT::p-SUPER]
17. SEC ID Nº: 17: JT-Vector binario pBPSMM232
[p-ZmUbi1::c-ZmAHASL/Xi12::t-ZmAHAS t-NOS::c-gusINT::p-ZmUbi1]
pBPSMM232 es un vector que como tal no es replicable en *Agrobacterium*, sino solo en *E. coli*. La transformación en *Agrobacterium* que comprende el plásmido super-binario pSB1 produce un plásmido quimérico (pSB1/pBPSMM232) por fusión mediada por selección entre pBPSMM232 y pSB1; Komari 1996)
18. SEC ID Nº: 18: Secuencia del límite izquierdo de pRI2659
5-TGGCAGGATA TATTGTGGTG TAAA-3'
19. SEC ID Nº: 19: Secuencia del límite derecho de pRI2659
5-TGACAGGATA TATCCCCTTG TCTA-3'
20. SEC ID Nº: 20: Secuencia intergénica de ARNr 16S-23S de la cepa K599 de *Agrobacterium*
21. SEC ID Nº: 21: ADN genómico que codifica ARNr 16S de la cepa K599 de *Agrobacterium*
22. SEC ID Nº: 22: Vector de delección pBPSSH009
23. SEC ID Nº: 23: Vector de delección pRL278 LF/RF (también llamado pBPSSH009b)
24. SEC ID Nº: 24: Secuencia de ácidos nucleicos que codifica pRI2659Δ (que no comprende el marcador de selección de tetraciclina (tet))
25. SEC ID Nº: 25: Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf1, similar a integrasa/recombinasa similar a mlI6374, [Mesorhizobium loti MAFF303099]
26. SEC ID Nº: 26: Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf13, débilmente similar a ri-orf22 en pRI1724, similar a la proteína hipotética Bcep02000337 [Burkholderia fungorum LB400]
27. SEC ID Nº: 27: Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf14, probable gen transportador de cucumbopina, similar a riorf37 en pRI1724, un probable transportador de mikimopina
28. SEC ID Nº: 28: Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf16, similar a SMA2205 Sinorhizobium meliloti 1021 (cepa: 1021), un sistema de transporte de espermidina/putrescina tipo ABC COG1176 [E], componente I de permeasa

(continuación)

29. SEC ID Nº: 29 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf19, similar a hutI, imidazolona-5-propionato hidrolasa [*Agrobacterium tumefaciens* str. C58], menos similar a riorf39 en pRi1724, ruta de KEGG: metabolismo de histidina 00340.
30. SEC ID Nº: 30 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf20, similar a riorf41 en pRi1724, una proteína hipotética
31. SEC ID Nº: 31 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf21, similar a riorf42 en pRi1724, un homólogo del gen hutU, una urocanasa, número EC 4.2.1.49
32. SEC ID Nº: 32 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf22, similar a la proteína de función desconocida DUF886 [*Mesorhizobium* sp. BNC1] y menos similar a riorf43 en pRi1724, similar a gen desconocido próximo al gen hutR en *Pseudomonas putida*
33. SEC ID Nº: 33 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf23, similar al extremo C similar a la familia transposasa de IS30
34. SEC ID Nº: 34 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf32, similar a riorf60 en pRi1724, similar al gen gatA-1 [glutamil-ARNt amidotransferasa, subunidad A (gatA-1) *Sulfolobus solfataricus* P2]
35. SEC ID Nº: 35 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf34, similar a riorf62 en pRi1724, gen transportador ABC hipotético similar al gen agaB, ácido agropínico permeasa, pfam00528: BPD_transp_1; componente de la membrana interna del sistema de transporte dependiente de la unión a proteína
36. SEC ID Nº: 36 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf35, similar a riorf63 en pRi1724, gen transportador ABC hipotético similar al gen dppC, pfam00528: BPD_transp_1; componente de la membrana interna del sistema de transporte dependiente de la unión a proteína
37. SEC ID Nº: 37 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf36, similar a riorf64 en pRi1724, gen transportador ABC hipotético similar al gen moaD, ácido manopínico permeasa, COG1123: componentes de ATPasa de diversos sistemas de transporte tipo ABC.
38. SEC ID Nº: 38 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf37, similar a riorf66 en pRi1724, similar al gen amaB, N-carbamoil-beta-alanina amidohidrolasa
39. SEC ID Nº: 39 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf39, similar a riorf68 en pRi1724, débilmente similar al gen pck, pfam01633: Colina_cinasa; Colina/etanolamina cinasa
40. SEC ID Nº: 40 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf40, similar a riorf69 en pRi1724, similar a MLCB1779.29 (probable gen monofosfatasa) en *Mycobacterium leprae*, cd01641: IMPasa_Bacteriana_similar_1; familia predominantemente bacteriana de fosfatasa dependientes de Mg⁺⁺, relacionadas con inositol monofosfatasa
41. SEC ID Nº: 41 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf41, similar a riorf71 en pRi1724, gen quimiorreceptor hipotético similar al gen orf2 en pTi 15955
42. SEC ID Nº: 42 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf44, similar a riorf74, similar al gen teuB (proteína de unión al azúcar periplásmica), COG1879: RbsB; sistema de transporte de azúcar tipo ABC, componente periplásmico [transporte y metabolismo de hidratos de carbono].
43. SEC ID Nº: 43 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf45, similar a riorf75 en pRi1724, similar al gen teuA (transportador ABC de azúcar de unión a ATP), gen transportador ABC hipotético, COG1129: MglA; sistema de transporte de azúcar tipo ABC, componente de ATPasa [transporte y metabolismo de hidratos de carbono].
44. SEC ID Nº: 44 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf46, similar a riorf76 en pRi1724, similar al gen teuC1 (transportador ABC de azúcar-permeasa), un gen transportador ABC hipotético, pfam02653: BPD_transp_2; sistema de transporte de aminoácidos de cadena ramificada / componente de permeasa.
45. SEC ID Nº: 45 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf47, similar a riorf77 en pRi1724, similar al gen teuC2 (transportador ABC de azúcar-permeasa), un gen transportador ABC hipotético, pfam02653: BPD_transp_2; sistema de transporte de aminoácidos de cadena ramificada / componente de permeasa.
46. SEC ID Nº: 46 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf48, similar a riorf78 en pRi1724, COG2755 [E] lisofosfolipasa L1 y esterases relacionadas.
47. SEC ID Nº: 47 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf50, similar a riorf80 de pRi1724, un homólogo del gen glpD, glicerol-3-fosfato deshidrogenasa [*Agrobacterium tumefaciens* str. C58]
48. SEC ID Nº: 48 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf51, similar a riorf81 en pRi1724, un homólogo del gen acs (acetil-CoA sintetasa), EC 6.2.1.1.
49. SEC ID Nº: 49 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf52, similar a riorf82 de pRi1724, un homólogo del gen adk, pfam00406: ADK; adenilato cinasa, EC 2.7.4.3.
50. SEC ID Nº: 50 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf53, similar a riorf83 en pRi1724, un gen quimiorreceptor hipotético similar al gen orf2 en pTi 15955
51. SEC ID Nº: 51 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf54, similar a riorf84, un homólogo del gen cbbF, cd00354: FBPasa; fructosa-1,6-bisfosfatasa, una enzima que cataliza la hidrólisis de fructosa-1,6-bisfosfato en fructosa-6-fosfato y es crítica en la ruta de gluconeogénesis.

(continuación)

52. SEC ID N°: 52 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf55, homólogo del gen cbba, un cd00947: TBP_aldolasa_IIB; tagatosa-1,6-bisfosfato (TBP) aldolasa y aldolasas de clase II tipo B relacionadas
53. SEC ID N°: 53 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf56, similar a la cadena A de pdb, trisafosfato isomerasa de levadura (tri1)
54. SEC ID N°: 54 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf57, similar a riorf88 en pRi1724 y al gen phrR, proteína de unión a ADN, familia XRE de hélice-giro-hélice.
55. SEC ID N°: 55 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf58, similar a riorf89 en pRi1724 y al gen thcR, dominio conservado, HTH_ARAC; hélice_giro_hélice, proteína de control del operón de arabinosa
56. SEC ID N°: 56 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf59, similar a riorf90 en pRi1724 y Atu6096 en pTiC58, conservada en especies de Mesorhizobium y Agrobacterium.
57. SEC ID N°: 57 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf60, similar a riorf91 en pRi1724, también similar a varias proteínas hipotéticas en especies de Agrobacterium, Mesorhizobium y Nitrobacter.
58. SEC ID N°: 58 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf61, similar a riorf92 en pRi1724, proteína hipotética conservada en varias cepas de Agrobacterium y Mesorhizobium.
59. SEC ID N°: 59 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf62, similar a riorf93, similar al gen jhp0928 en Helicobacter pylori, COG0827; ADN metilasa específica de adenina [replicación, recombinación y reparación de ADN].
60. SEC ID N°: 60 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf63, similar a la proteína de reparto de AGR_pTi_191 Agrobacterium tumefaciens str. C58, proteína de reparto, COG1475 [K] Reguladores transcripcionales predichos.
61. SEC ID N°: 61 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf64, similar a la proteína hipotética MesoDRAFT_1041 [Mesorhizobium sp. BNC1], conservada en especies de Agrobacterium, Mesorhizobium y Nitrobacter.
62. SEC ID N°: 62 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf66, similar a la proteína hipotética MesoDRAFT_1043 [Mesorhizobium sp. BNC1], conservada en especies de Agrobacterium, Mesorhizobium y Nitrobacter.
63. SEC ID N°: 63 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf67, similar a riorf96 en pRi1724, una proteína hipotética débilmente similar a la región en la dirección 3' del gen hydL en Thiocapsa roseopersicina.
64. SEC ID N°: 64 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf68, similar a AGR_pTi_204 [Agrobacterium tumefaciens str. C58] y argG, argininosuccinato sintasa, de Streptomyces clavuligerus.
65. SEC ID N°: 65 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf69, similar a riorf100 en pRi1724, similar al gen ardC en pSa (plásmido IncW) COG4227, probable proteína conjugal de transferencia (proteína anti-restricción).
66. SEC ID N°: 66 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf70, similar a riorf101 en pRi1724, similar a mlI9093 aspartato 1-descarboxilasa [Mesorhizobium loti MAFF303099] y gen pgi en Xanthomonas citri, COG0853 [H] Aspartato 1-descarboxilasa.
67. SEC ID N°: 67 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf71, similar a riorf106 en pRi1724, similar a un gen teuB en pRtrCFN299a, COG1879: RbsB; sistema de transporte de azúcar tipo ABC, componente periplásmico [transporte y metabolismo de hidratos de carbono].
68. SEC ID N°: 68 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf72, similar a riorf107 en pRi1724, similar al gen mcpC (gen mcpC en Rhizobium) en Rhizobium leguminosarum, smart00283: MA; Dominios similares a la quimiotaxis aceptora de metilo (transductor sensorial de la quimiotaxis).
69. SEC ID N°: 69 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf77, probable gen traA, similar a riorf112 en pRi1724, COG0507: RecD; exoDNasa dependiente de ATP (exonucleasa V), subunidad alfa - miembro I de la superfamilia helicasa [replicación, recombinación y reparación de ADN].
70. SEC ID N°: 70 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf79, probable gen traB, similar a riorf114 en pRi1724.
71. SEC ID N°: 71 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf80, similar a riorf115 en pRi1724, una proteína hipotética de Agrobacterium rhizogenes (cepa: MAFF03-01724)
72. SEC ID N°: 72 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf82, probable gen traM similar a riorf118 en pRi1724, antagonista de TraR.
73. SEC ID N°: 73 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf96, probable gen repA similar a riorf132 Agrobacterium rhizogenes (cepa: MAFF03-01724), cd00550: ArsA_ATPasa; ATPasa de translocación de oxianión (ArsA) y cd00592: HTH_MERR; regulador de la transcripción hélice-giro-hélice MERR, dominio del extremo N.
74. SEC ID N°: 74 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf97, probable gen repB similar a riorf133 en pRi1724, smart00470: ParB; proteína de dominio de nucleasa similar a ParB.
75. SEC ID N°: 75 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf98, probable gen repC similar a riorf134 en pRi1724, esencial para la replicación vegetativa

(continuación)

76. SEC ID N°: 76 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf99, similar a riorf135 en pRi1724, débilmente similar al gen y4aO en pNGR234a.
77. SEC ID N°: 77 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf103, similar al gen riorf137 en pRi1724 y el gen orf4 en pTiA6NC.
78. SEC ID N°: 78 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf105, similar a riorf139 en pRi1724, similar a la región sin caracterizar entre los genes y4jF y y4jG en pNGR234a.
79. SEC ID N°: 79 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf106, similar a riorf140 en pRi1724 y al gen orf300 en *Escherichia coli*, pfam00004: AAA; familia de ATPasa asociada a diversas actividades celulares (AAA).
80. SEC ID N°: 80 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf107, similar al extremo N de riorf141 en pRi1724, una proteína hipotética.
81. SEC ID N°: 81 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf109, débilmente similar a SERP1653 *Staphylococcus epidermidis* RP62A (cepa: RP62A), una proteína hipotética.
82. SEC ID N°: 82 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf110, similar a riorf142 en pRi1724, similar al gen para el exón 6 de la proteína de unión luminal en *Arabidopsis thaliana*.
83. SEC ID N°: 83 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf111, similar a riorf143 en pRi1724 y al gen spdB3 en pSG5.
84. SEC ID N°: 84 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf112, similar a riorf144 en pRi1724.
85. SEC ID N°: 85 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf114, gen virF putativo, similar a riorf146 en pRi1724 y tiorf133 en pTiSAKURA.
86. SEC ID N°: 86 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf117, similar a riorf149 en pRi1724, similar al extremo N. aatA (atu2196) aspartato aminotransferasa A [*Agrobacterium tumefaciens* str. C58].
87. SEC ID N°: 87 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf119, probable virH, similar a riorf151 en pRi1724, citocromo P450-tipo oxidasa, probablemente proteína tipo IV secretada mediante virB/D4.
88. SEC ID N°: 88 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf120, probable virA, similar a riorf152 en pRi1724, receptor en el sistema regulador virA/G de dos componentes.
89. SEC ID N°: 89 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf121, probable virB1, similar a riorf153 en pRi1724, sistema de secreción tipo IV requerido para la transferencia del complejo T.
90. SEC ID N°: 90 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf123, probable virB3, similar a riorf155 en pRi1724, sistema de secreción tipo IV requerido para la transferencia del complejo T.
91. SEC ID N°: 91 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf125, probable virB5, similar a riorf157 en pRi1724, sistema de secreción tipo IV requerido para la transferencia del complejo T.
92. SEC ID N°: 92 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf126, probable virB6, similar a riorf158 en pRi1724, sistema de secreción tipo IV requerido para la transferencia del complejo T.
93. SEC ID N°: 93 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf127, probable virB7, similar a riorf159 en pRi1724, sistema de secreción tipo IV requerido para la transferencia del complejo T.
94. SEC ID N°: 94 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf129, probable virB9, similar a riorf161 en pRi1724, sistema de secreción tipo IV requerido para la transferencia del complejo T.
95. SEC ID N°: 95 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf1131, probable virB11, similar a riorf163 en pRi1724, sistema de secreción tipo IV requerido para la transferencia del complejo T.
96. SEC ID N°: 96 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf132, probable virG, similar a riorf164 en pRi1724, activador en el sistema regulador virA/G de dos componentes.
97. SEC ID N°: 97 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf133, proteína hipotética, similar a aa1-103 pf ISBm1 transposasa orfB [*Brucella suis* 1330] (NP 697552).
98. SEC ID N°: 98 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf137, probable virD1, similar a riorf167 en pRi1724, una proteína accesoria de endonucleasa del límite de ADN-T regulada por virA/G.
99. SEC ID N°: 99 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf138, probable virD2, similar a riorf168 en pRi1724, la endonucleasa del límite de ADN-T regulada por virA/G.
100. SEC ID N°: 100 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf140, probable virD4, similar a riorf170 en pRi1724, componente regulado por virA/G del sistema de secreción tipo IV de virB/D4.
101. SEC ID N°: 101 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf142, probable virF, similar a riorf172 en pRi1724, y menos similar a tiorf133 en pTiSAKURA, una proteína de secreción tipo IV mediante el complejo de virB/D4.
102. SEC ID N°: 102 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf143, probable virE3, similar a riorf173 en pRi1724 y virE3 en pRiA6NC, interacciona con virE2 y IMPA1 (*AtKAP-alfa*) en *A. tumefaciens*, proteína secretada de tipo IV de virB/D4.
103. SEC ID N°: 103 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf144, similar a *Mesorhizobium loti* MAFF303099 mlr1626, manosa-6-fosfato isomerasa predicha.
104. SEC ID N°: 104 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf145, similar a integrasa de fago
105. SEC ID N°: 105 Secuencia de ácidos nucleicos que codifica la región RF::tet::LF de pRi2659Δtet (que comprende marcador de selección de tetraciclina (tet))
106. SEC ID N°: 106 Secuencia de ácidos nucleicos que codifica pRi2659
107. SEC ID N°: 107 Cebador de PCR dentro de CDS de virG 5'-TACTTCCTCC TCACGCACTC-3'

(continuación)

108. SEC ID N°: 108 Cebador de PCR dentro del operón de virB 5'-GCCAGCAATG ATCAAGAATT TGTTT-3'
109. SEC ID N°: 109 Cebador directo PCR G109 5'-TTGGTGCAC AACTCCTCGG CG-3'
110. SEC ID N°: 110 Cebador inverso PCR G112 5'-GGTGAGCTCG ATCAGCTTCG GC-3'
111. SEC ID N°: 111 Secuencia de ácidos nucleicos que codifica virD2 de pRi2659
112. SEC ID N°: 112 Secuencia de aminoácidos para la proteína virD2 de pRi2659, también conocida como rcorf138
113. SEC ID N°: 113 Secuencia de ácidos nucleicos complementaria de pRi2659 que contiene rcorf2 a rcorf 12
114. SEC ID N°: 114 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf12, débilmente similar a riorf20 en pRi1724, similar a la proteína hipotética Bcep02000338 [Burkholderia fungorum LB400].
115. SEC ID N°: 115 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf11, similar a riorf40 en pRi1724, un homólogo del gen hutH, cd01441: HAL; histidina amoniaco-liasa (HAL) cataliza la primera etapa en la degradación de histidina a glutamato
116. SEC ID N°: 116 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf10, similar a la proteína reguladora transcripcional [Bradyrhizobium japonicum USDA 110], represor transcripcional del operón de gluconato hélice_giro_hélice
117. SEC ID N°: 117 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf9, similar a la proteína de utilización de hidantoína de C58 de A. tumefaciens hyuA
118. SEC ID N°: 118 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf8, similar a la proteína de utilización de hidantoína de C58 de A. tumefaciens hyuB
119. SEC ID N°: 119 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf7, similar a COG0834 Burkholderia fungorum LB400 COG0834, similar a STH1060, sustrato transportador ABC de glutamina-proteína de unión [Symbiobacterium thermophilum IAM 14863]
120. SEC ID N°: 120 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf6, similar a COG0765 [Burkholderia fungorum LB400], similar a PSPTO5181, transportador ABC de cistina, proteína permeasa, putativa [Pseudomonas syringae pv. tomato str. DC3000]
121. SEC ID N°: 121 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf5, similar a Bcep02000339 [Burkholderia fungorum LB400], similar a blr3310, COG0765: proteína permeasa transportadora ABC [Bradyrhizobium japonicum USDA 110]
122. SEC ID N°: 122 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf4, extremo N similar a STH1062, similar a la proteína de unión a ATP del transportador ABC de glutamina [Symbiobacterium thermophilum IAM 14863]; extremo C similar a bli6362, proteína hipotética en Bradyrhizobium japonicum USDA 110, COG2079 [R] Proteína sin caracterizar que participa en el catabolismo de propionato
123. SEC ID N°: 123 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf3, débilmente similar a mlr6097, proteína de control de la asimilación de nitrógeno [Mesorhizobium loti MAFF303099], COG0583 [K] Regulador transcripcional
124. SEC ID N°: 124 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf2, similar a riorf1 en pRi1724, homólogo del gen orf3 en IS66
125. SEC ID N°: 125 Secuencia de ácidos nucleicos complementaria de pRi2659 que contiene rcorf18
126. SEC ID N°: 126 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf18, similar a la proteína hipotética AGR_L_1821 [Agrobacterium tumefaciens str. C58], un homólogo del gen sdeB, cd01298: ATZ_TRZ_similar; la familia TRZ/ATZ contiene enzimas de la ruta de degradación de atrazina e hidrolasas relacionadas
127. SEC ID N°: 127 Secuencia de ácidos nucleicos complementaria de pRi2659 que contiene rcorf24 a rcorf31
128. SEC ID N°: 128 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf31, similar riorf59 en pRi1724, similar al gen orf3 en Methylobacterium extorquens, COG3931 [E] N-formilglutamato predicha
129. SEC ID N°: 129 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf30, similar a riorf58 en pRi1724, un homólogo de eutB, cadena pesada de etanolamina amoniaco-liasa
130. SEC ID N°: 130 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf28, probable gen GALLS, similar a riorf55 en pRi1724, complementos virE2, mecanismo desconocido, requerida para la transformación de plantas estable eficaz.
131. SEC ID N°: 131 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf27, probable trans-zeatina sintasa, similar a riorf54 en pRi1724, EC 2.5.1.-.
132. SEC ID N°: 132 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf26, probable gen idi, similar a riorf53 en pRi1724, similar a idi, isopentenildifosfato delta-isomerasa [Mycobacterium tuberculosis CDC1551] EC 5.3.3.2.
133. SEC ID N°: 133 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf25, similar a riorf52 en pRi1724, similar a la proteína de la familia MCA2182 descarboxilasa [Methylococcus capsulatus str. Bath]
134. SEC ID N°: 134 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf24, similar a riorf51 en pRi1724, débilmente similar al gen mtrR de la familia reguladora bacteriana de tetR.
135. SEC ID N°: 135 Secuencia de ácidos nucleicos complementaria de pRi2659 que contiene rcorf42 a rcorf43
136. SEC ID N°: 136 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf43, similar a riorf73 en pRi1724, similar a Sma2002 [Sinorhizobium meliloti 1021], COG2755 [E] Lisofosfolipasa L1 y esterasas relacionadas.

(continuación)

137. SEC ID N°: 137 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf242, similar a riorf73 en pRi1724, gen represor hipotético, similar a SMA2004 [*Sinorhizobium meliloti* 1021], regulador transcripcional de la familia ROK putativa.
138. SEC ID N°: 138 Secuencia de ácidos nucleicos complementaria de pRi2659 que contiene rcorf74 a rcorf76
139. SEC ID N°: 139 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf76, probable gen traC, procesamiento de ADN conjugal del plásmido Ti, similar a riorf111 en pRi1724.
140. SEC ID N°: 140 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf274, probable gen traG, similar a riorf109 en pRi1724, cd01126: TraG_VirD4; la familia TraG/TraD/VirD4 son proteínas de conjugación bacterianas.
141. SEC ID N°: 141 Secuencia de ácidos nucleicos complementaria de pRi2659 que contiene rcorf83 a rcorf95
142. SEC ID N°: 142 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf95, probable gen tral similar a riorf131 en pRi1724, reguladores de detección de cuórum tipo LuxI, sintetiza 3-oxooctanoilhomoserina lactona, pfam00765: Autoind_synth; Autoinductor sintetasa.
143. SEC ID N°: 143 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf294, probable gen trbB similar a riorf130 en pRi1724, sistema de transferencia tipo IV requerido para la conjugación de plásmido Ri/Ti.
144. SEC ID N°: 144 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf293, probable gen trbC similar a riorf129 en pRi1724, sistema de transferencia tipo IV requerido para la conjugación de plásmido Ri/Ti.
145. SEC ID N°: 145 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf91, probable gen trbE similar a riorf127 en pRi1724, sistema de transferencia tipo IV requerido para la conjugación de plásmido Ri/Ti.
146. SEC ID N°: 146 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf89, homólogo del gen trbK similar a riot125 en pRi1724, sistema de transferencia tipo IV requerido para la conjugación de plásmido Ri/Ti.
147. SEC ID N°: 147 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf88, probable gen trbF similar a riorf123 en pRi1724, sistema de transferencia tipo IV requerido para la conjugación de plásmido Ri/Ti.
148. SEC ID N°: 148 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf287, probable gen trbF similar a riorf123 en pRi1724, sistema de transferencia tipo IV requerido para la conjugación de plásmido Ri/Ti.
149. SEC ID N°: 149 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf86, probable gen trbG similar a riorf122 en pRi1724, sistema de transferencia tipo IV requerido para la conjugación de plásmido Ri/Ti.
150. SEC ID N°: 150 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf85, probable gen trbH similar a riorf121 en pRi1724, sistema de transferencia tipo IV requerido para la conjugación de plásmido Ri/Ti.
151. SEC ID N°: 151 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf84, probable gen trbI similar a riorf120 en pRi1724, pfam03743: TrbI; proteína similar a TrbI de conjugación bacteriana.
152. SEC ID N°: 152 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf83, probable gen traR similar a riorf119 en pRi1724 y traR/AGR pTi 249 en pTiC58.
153. SEC ID N°: 153 Secuencia de ácidos nucleicos complementaria de pRi2659 que contiene rcorf100 a rcorf102
154. SEC ID N°: 154 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf102, similar al gen integrasa hipotético orf2 (similar al gen similar a integrasa de *Pseudomonas*) en pTIA6NC.
155. SEC ID N°: 155 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf101, similar al fragmento del extremo N de pA 22 *Agrobacterium tumefaciens* str. C58 (cepa: C58, cepa aislada: Cereon), una proteína integrasa COG0582 [L].
156. SEC ID N°: 156 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf100, similar al extremo C de pA 22 *Agrobacterium tumefaciens* str. C58 (cepa: C58, cepa aislada: Cereon), COG0582 [L] Proteína integrasa.
157. SEC ID N°: 157 Secuencia de ácidos nucleicos complementaria de pRi2659 que contiene rcorf115 a rcorf116
158. SEC ID N°: 158 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf116, probable proteína de captación de potasio, similar a Atu0711 i *Agrobacterium tumefaciens* str. C58 y riorf148 en pRi1724 y al gen kup, pfam02705: K_trans; proteína transportadora de potasio K+.
159. SEC ID N°: 159 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf115, similar a riorf147 en pRi1724 y el gen y4mC en homólogo de pNGR234a, un gen inducido por vir.
160. SEC ID N°: 160 Secuencia de ácidos nucleicos complementaria de pRi2659 que contiene rcorf134 a rcorf136
161. SEC ID N°: 161 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf136, probable virC1, similar a riorf166 en pRi1724, proteína regulada por virulencia virA/G, AGR_pTi_18p; VirC1; se une a secuencia multiplicadora adyacente al límite derecho de ADN-T; aumenta el nivel de procesamiento de ADN-T.
162. SEC ID N°: 162 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf135, probable virC2, similar a riorf165 en pRi1724, proteína regulada por virulencia virA/G del procesamiento de ADN-T.
163. SEC ID N°: 163 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf134, proteína hipotética, similar a aa4-122/142 de ISBm1 transposasa orfA [*Brucella suis* 1330] (NP 697551).
164. SEC ID N°: 164 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf15, similar a SMA2207, un transportador ABC putativo, proteína de unión a ATP [*Sinorhizobium meliloti* 1021], COG3842: PotA; sistemas de transporte de espermidina/putrescina tipo ABC, componentes de ATPasa [transporte y metabolismo de aminoácidos]

(continuación)

165. SEC ID N°: 165 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf17, probable transportador de cucumbopina, similar a riorf34, una proteína hipotética [Agrobacterium rhizogenes] el probable gen transportador de mikimopina
166. SEC ID N°: 166 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf229, similar a riorf57 en pRi1724, un homólogo de eutC, cadena ligera de etanolamina amoniaco-liasas
167. SEC ID N°: 167 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf33, similar a riorf61 en pRi1724, gen transportador ABC hipotético similar a PH0807, pfam00496: SBP_bac_5; proteínas de unión a soluto extracelulares bacterianas, familia 5
168. SEC ID N°: 168 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf38, similar a riorf67 en pRi1724, débilmente similar al gen pck, smart00587: CHK; ZnF_C4 y dominio HLH que contiene dominio cinasa
169. SEC ID N°: 169 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf49, similar a riorf79 en pRi1724, un homólogo del gen glpK (glicerol cinasa), EC 2.7.1.30.
170. SEC ID N°: 170 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf65, similar a riorf95 en pRi1724, similar a la región en la dirección 3' del gen nylA en pOAD2.
171. SEC ID N°: 171 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf73, similar a AGR_pTi_225 nucleasa [Agrobacterium tumefaciens str. C58], un homólogo de nucleasa (termonucleasa) microcócica COG1525 [L].
172. SEC ID N°: 172 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf75, probable gen traD, proteína conjugal de transferencia similar a riorf110 en pRi1724.
173. SEC ID N°: 173 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf78, probable gen traF, similar a riorf113 en pRi1724, COG4959: TraF; ruta secretora tipo IV, proteasa TraF [modificación postraduccional, renovación de proteínas, chaperonas / tráfico y secreción Intracelular].
174. SEC ID N°: 174 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf81, similar a riorf117 en pRi1724, una proteína hipotética o Agrobacterium rhizogenes (cepa: MAFF03-01724), cd00093: HTH_XRE; proteínas similares a la familia XRE de hélice-giro-hélice.
175. SEC ID N°: 175 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf90, probable gen trbJ similar a riorf126 en pRi1724, sistema de transferencia tipo IV requerido para la conjugación de plásmido Ri/Ti, COG5314; proteína de transferencia conjugal/exclusión de la entrada [tráfico y secreción intracelular].
176. SEC ID N°: 176 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf92, probable gen trbD similar a riorf128 en pRi1724, sistema de transferencia tipo IV requerido para la conjugación de plásmido Ri/Ti.
177. SEC ID N°: 177 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf104, similar a riorf138 en pRi1724 y gen gvp1 en pHH1, pfam04079: DUF387; proteína (similar a Ypuh) de reguladores transcripcionales putativos.
178. SEC ID N°: 178 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf108, similar al extremo C de riorf141 en pRi1724, una proteína hipotética.
179. SEC ID N°: 179 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf113, débil similar durante 79 aa a blr8180 de Bradyrhizobium japonicum USDA 110 (cepa: USDA 110), COG1760 [E] L-serina desaminasa.
180. SEC ID N°: 180 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf118, similar a riorf150 en pRi1724, gen aatA en homólogo de Rhizobium leguminosarum, pseudogén hipotético que se divide por desplazamiento del marco.
181. SEC ID N°: 181 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf122, probable virB2, similar a riorf154 en pRi1724, sistema de secreción tipo IV requerido para la transferencia del complejo T.
182. SEC ID N°: 182 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf124, probable virB4, similar a riorf156 en pRi1724, sistema de secreción tipo IV requerido para la transferencia del complejo T.
183. SEC ID N°: 183 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf128, probable virB8, similar a riorf160 en pRi1724, sistema de secreción tipo IV requerido para la transferencia del complejo T.
184. SEC ID N°: 184 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf130, probable virB10, similar a riorf162 en pRi1724, sistema de secreción tipo IV requerido para la transferencia del complejo T.
185. SEC ID N°: 185 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf139, probable virD3, similar a riorf169 en pRi1724, regulado por virA/G, no requerida para virulencia, posible factor de variedad de huéspedes.
186. SEC ID N°: 186 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf141, probable virD5, similar a riorf171 en pRi1724, componente regulado por virA/G del sistema de secreción tipo IV de virB/D4.
187. SEC ID N°: 187 Secuencia de aminoácidos codificada por rcorf146, similar a Y4rB Rhizobium sp. NGR234.
188. SEC ID N°: 188 Secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia flanqueante de ADN-T izquierda de la cepa K599 de Agrobacterium.

Ejemplos

5 A menos que se indique lo contrario, los productos químicos y reactivos en los ejemplos se obtienen de Sigma Chemical Company (St. Louis, MO), las endonucleasas de restricción son de New England Biolabs (Beverly, MA) o Roche (Indianápolis, IN), los oligonucleótidos se sintetizaron por MWG Biotech Inc. (High Point, NC), y otras enzimas

de modificación o kits referentes a productos químicos y ensayos biológicos moleculares son de Clontech (Palo Alto, CA), Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ), Promega Corporation (Madison, WI) o Stratagene (La Jolla, CA). Los materiales para los medios de cultivo celular se obtienen de Gibco/BRL (Gaithersburg, MD) o DIFCO (Detroit, MI). Las etapas de clonación llevadas a cabo para los fines de la presente invención, tales como, por ejemplo, escisiones con restricción, electroforesis en gel de agarosa, purificación de fragmentos de ADN, transferencia de ácidos nucleicos a membranas de nitrocelulosa y de nailon, enlace de fragmentos de ADN, transformación de células de *E. coli*, crecimiento de bacterias, multiplicación de fagos y análisis de secuencias de ADN recombinante, se llevan a cabo como se describe por Sambrook (1989). La secuenciación de moléculas de ADN recombinantes se lleva a cabo usando un secuenciador de ADN de fluorescencia láser ABI siguiendo el procedimiento de Sanger (Sanger 1977), a menos que se indique de otro modo. Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación.

Ejemplo 1: Desarme de la cepa K599 de *Agrobacterium*

La cepa K599 de *Agrobacterium* es una bacteria de la tierra que produce la enfermedad de las raíces pilosas en muchas plantas dicotiledóneas que incluyen soja. Se ha mostrado que la cepa K599 es altamente infecciosa en raíces de soja. La cepa K599 de *Agrobacterium* (depositada bajo el número de acceso NCPPB2659 en the British NCPPB stock center; www.ncppb.com, Laboratorio de Ciencias Central de la Colección Nacional de Bacterias Patógenas de Plantas, Sand Hutton, York YO41 1 LZ, Inglaterra) se cultivó en cultivo líquido (medio LB) a 28 °C y se realizaron protocolos de extracción de ADN modificados para purificar plásmidos pRi usando el kit Qiagen Large Construct, n° de catálogo 12462, para enriquecer la preparación de ADN en el plásmido pRi2659.

Se hicieron hibridaciones Southern usando sondas de límite derecho (285 pb) o izquierdo (240 pb) para verificar la corrección del mapa de restricción física de la región de ADN-T de pRi2659 (véase Fig. 6). Se determinó que la enzima de restricción *SphI* dio fragmentos aceptables (mayores de 2 kb de franqueamiento) usando regiones homólogas para un vector de delección. Se construyó un banco de clones subgenómicos de fragmentos *SphI* de pRi2659 de K599 en pUC19. El ADN de la cepa K599 de *Agrobacterium* aislada enriquecido en el plásmido pRi2659 se digirió con *SphI* y migró sobre un gel de agarosa al 0,8 %. Las regiones de fragmentos que representan un fragmento de 2905 pb que contiene ADN del flanco derecho y un fragmento de 7.498 pb que contiene ADN del flanco izquierdo se escindieron del gel de agarosa y se purificaron usando un kit de extracción en gel Qiagen QIAquick, n° de catálogo 28706. Estos fragmentos de gel purificados se ligaron en pUC19 para generar un banco de clones sub-genómico.

Se sondaron elevaciones de colonias del banco de clones con tanto fragmentos del límite derecho como del límite izquierdo para identificar clones que contenían ADN flanqueante. Se identificaron dos clones: un fragmento de 2.905 pb que contenía ADN del flanco derecho y un fragmento de 7.498 pb que contenía ADN del flanco izquierdo. Cada uno de estos clones se subclonó adicionalmente y se secuenció usando cebadores directos e inversos estándar (SEC ID N°: 1 y 2, respectivamente).

Se construyó el casete de delección de *Agrobacterium* usando fragmentos de 2,1 kb de cada clon flanqueante. Las regiones homólogas proporcionan espacio suficiente para que tenga lugar la doble recombinación homóloga. Se construyó un casete similar que contenía el gen de resistencia a tetraciclina entre los fragmentos FD y FI (véase la Fig. 12 para el diagrama de flujo). Estas construcciones se verificaron por secuencia. Los casetes de FD/FI y FD/Tet/FI se clonaron en una versión modificada por conector de pRL278 (SEC ID N°: 3; Peter Wolk, Universidad del Estado de Michigan) produciendo el vector plasmídico pRL278FI/FD (SEC ID N°: 23; sin casete Tet) y el vector plasmídico pBPSSH009 (SEC ID N°: 22; con casete Tet), respectivamente. Estos vectores permiten la eficaz selección de recombinantes homólogos dobles por el uso del gen *sacB*. La adición de sacarosa a los medios de crecimiento que contienen recombinantes homólogos individuales produce el compuesto tóxico *levan*. Este compuesto actúa de contra-selección contra cepas que contienen el plásmido, obligando a un cruzamiento doble que resuelve el fenotipo no mutante o la delección deseada. pBPSSH009 y pRL278LF/RF, respectivamente, se introdujeron por electroporación en la cepa K599 y se seleccionaron usando kanamicina 100 µg/ml. Se recuperaron cruzamientos individuales que contienen el plásmido de delección que se ha integrado en el plásmido Ri y se realizó contra-selección sobre sacarosa. Se llevó a cabo selección con sacarosa/*sacB* del siguiente modo: se cultivaron eventos de cruzamiento simple confirmados (por hibridación Southern) que contenían el vector resistente a kanamicina con *sacB* y construcción de delección durante la noche sin selección para permitir que tuviera lugar la recombinación. Se sembró una dilución sucesiva del cultivo sobre medio de contra-selección de agar-LB que contenía 5 % de sacarosa v/v. Después de 2 días, las colonias que aparecieron se cultivaron y se aislaron y usó ADN genómico para confirmar la delección de la región de ADN-T por hibridación Southern. Se aislaron cruzamientos dobles y la confirmación molecular de la delección del ADN-T se confirmó por hibridación Southern (Fig. 6). La sonda usada en la hibridación Southern fue la misma que se usó anteriormente para aislar el fragmento que contiene la región flanqueante derecha de pRi2659. Es un fragmento de 200 pb que contiene la secuencia de límite y flanqueante derecha tanto en la dirección 5' como en la dirección 3' del límite. Para la transferencia Southern, las muestras de ADN genómico se digirieron con *SphI* y migraron sobre gel de agarosa al 0,8 %.

Las cepas obtenidas se nombraron del siguiente modo:

- Cepas K599 de *Agrobacterium* [pRi2659Atet]: SHA001 y SHA016 son cepas K599 de *Agrobacterium* desarmadas que carecen de su región de ADN-T que comprende un casete de expresión de tetraciclina (tet) (obtenidas usando pBPSSH009). Las cepas SHA001 y SHA016 de *Agrobacterium* son ambas cepas funcionalmente equivalentes del tipo resistente a tetraciclina desarmadas, es decir, que comprenden el plásmido pRi2659Atet.
- Cepa K599 de *Agrobacterium* [pRi2659Δ]: SHA017 es una cepa K599 de *Agrobacterium* desarmada que carece de su región de ADN-T (obtenida usando pRL278LF/RF, también conocida como pBPSSH009b).

Pruebas funcionales del síndrome de la raíz pilosa sobre cotiledones de soja (véase más adelante, Ejemplo 2) confirmaron la pérdida del fenotipo de enfermedad. Se realizaron experimentos de transformación de plantas en soja, maíz, tomate y *Arabidopsis* (véase más adelante) y se confirmaron las propiedades infecciosas de plantas en la cepa desarmada. En todas las especies de plantas se detectó expresión transitoria de β-glucuronidasa (GUS). Además, se detectó expresión estable de GUS en diversas especies de plantas que incluyen tejidos de soja, maíz y tomate. También se han recuperado plantas de *Arabidopsis* estables resistentes a Pursuit™ y glufosinato. El plásmido pSB1 super-virulento (Komari 1996) se ha movilizado en la cepa K599 desarmada y se verificó que era eficaz en la transformación de maíz.

Ejemplo 2: Ensayos de raíces pilosas

Se usaron semillas de soja (cultivar Williams 82) para el siguiente ensayo. 1. 6 días antes de la inoculación, se esterilizan semillas de soja. Semillas sin heridas/fisuras sobre la superficie se disponen en un vaso de precipitados estéril. Se usan 30 semillas para cada cepa de *Agrobacterium* que va a evaluarse y se cubren con 95 % de etanol durante un minuto. Se elimina el etanol y las semillas se tratan con 10 % de blanqueante recién preparado con 0,0005 % de TritonX-100 durante 10 min. El blanqueante se cambia cada 3 minutos. Después, el blanqueante se drena y las semillas se lavan 4 veces en agua estéril. Se colocan 10 semillas sobre una placa de agar al 1 %, se sella con Parafilm™ y se pone a 25 °C, 16 h/día de iluminación (70-100 μE/m²s).

Inoculación de *Agrobacterium* para el ensayo de raíces pilosas:

Antes de la inoculación, las sojas germinadas se disponen bajo una campana de flujo laminar. Se saca un cultivo de *Agrobacterium* durante la noche fresco del agitador y se determina la DO₆₅₀. Se dispone una alícuota de 1 ml en un tubo de microcentrifuga estéril y las *Agrobacteria* se precipitan a 12.000 rpm durante 3 minutos. Se retira el sobrenadante y las *Agrobacteria* se resuspenden en medio de infección (1x sales de MS, 3,6 % de glucosa, 6,9 % de sacarosa, 100 mg/l de mio-inositol, 1,5 mg/l de 2,4-D, 1 mg/l de aminoácidos cas, 1 mg/l de HCl de tiamina, 0,5 mg/l de ácido nicotínico, 0,5 mg/l de HCl de piridoxina).

Se ajusta la DO₆₅₀ a 1,0. Las *Agrobacteria* se incuban en medio de infección durante 1 hora antes de la infección para inducir la cascada del gen *vir*. Solo se cortan los cotiledones verdes de las plantas de semillero y el lado adaxial se hierde con un bisturí. Los cotiledones se disponen sobre placas de agar con el lado abaxial hacia arriba. La superficie herida de cada cotiledón se inocula con 17 a 20 μl de *Agrobacteria*. Las placas se tapan con Parafilm y se disponen a condición de 25 °C, 16 h/día de iluminación (70-100 μE/m²s) para el co-cultivo. Tres días después de la inoculación, los cotiledones se transfieren a medio de selección (1x sales de MS, 1x vitaminas B5 de Gamborg, 3 % de sacarosa, 100 mg/l de carbinicilina, pH 6,2 con KOH). Las placas se sellan y se ponen de nuevo en la misma condición de cultivo. Después de dos semanas pueden detectarse y recogerse raíces pilosas que están creciendo en la superficie del medio (para etapas inductoras de raíces pilosas). Se disponen raíces recogidas sobre medio de selección. Después de dos a tres semanas adicionales, las líneas de raíz que están creciendo sobre el medio de selección se subcultivan sobre medio que no comprende agente de selección. Deben subcultivarse cada 4 semanas. Las raíces deben cultivarse en la oscuridad.

Ejemplo 3: Crecimiento y preparación de *Agrobacterium* para la transformación de plantas

Se preparan cultivos de *Agrobacterium* cubriendo como manchas bacterias que llevan el vector binario deseado sobre medio de crecimiento YEP sólido y se incuban a 25 °C hasta que aparecen las colonias (aproximadamente 2 días). Dependiendo de los genes marcadores de selección presentes sobre el plásmido Ri, el vector binario y los cromosomas bacterianos, pueden usarse diferentes agentes de selección para la selección de *A. tumefaciens* y *rhizogenes* en los medios sólidos y líquidos YEP. Después de aproximadamente dos días, se aísla una colonia individual (con un palillo estéril) y se inocula en 50 ml de líquido YEP con antibióticos con agitación (175 rpm, 25 °C) hasta que se alcanza una DO₆₅₀ entre 0,8 y 1,0 (aproximadamente 2 días). Se preparan disoluciones madre de trabajo de glicerol (15 %) para la transformación y se guardan como disoluciones madre de *Agrobacterium* de un ml en tubos Eppendorf de 1,5 ml a -70 °C.

Medio de crecimiento YEP (medio de *Agrobacterium*):

10 g/l de Bacto-peptone, 5 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de NaCl, 12 g/l de agar (Difco), antibióticos apropiados; pH 7,0

El día antes de la inoculación del explante, se inoculan 200 ml de YEP con 5 μl a 3 ml de disolución madre de trabajo de *Agrobacterium* en un matraz Erlenmeyer de 500 ml. Agitar el matraz durante la noche a 25 °C hasta que

la DO₆₅₀ esté entre 0,8 y 1,0. Antes de preparar los explantes de soja, las *Agrobacteria* se sedimentan por centrifugación durante 10 min a 5.500 x g a 20 °C. El sedimento se resuspende en medio CCM líquido a la densidad deseada (DO₆₅₀ 0,5 a 0,8) y se pone a temperatura ambiente al menos 30 minutos antes de uso.

Medio CCM líquido (=medio de co-cultivo):

- 5 1/10 de sales B5, 1/10 de disolución madre de MS hierro, 3 % de sacarosa, MES 20 mM, 1X vitaminas B5, acetosiringona 200 µM, ácido giberélico 0,7 µM, 6-bencil-aminopurina 7,5 µM; pH 5,4.

Ejemplo 4: Transformación de plantas

Ejemplo 4a: Transformación de soja

Preparación de plantas de semillero y *Agrobacterium*

- 10 Se esterilizan semillas de soja de diversos cultivares durante 24 a 48 horas en gas cloro añadiendo 3,5 ml de HCl a 100 ml de blanqueante (5,25 % de hipoclorito de sodio) en un desecador con una tapa de cierre hermético. Después de la esterilización, las semillas se sacan y se siembran aproximadamente 20 semillas sobre medio de germinación [1X sales principales de B5, 1X sales secundarias de B5, 1X MSIII hierro, 2 % de sacarosa, 1X vitaminas B5, BAP 0 a 5 µM, 0,8 % de agar purificado (Sigma); pH 5,8] en recipientes PlantCon. Las plantas de semillero se cultivan a la luz (150 µm²s) hasta que los cotiledones sean verdes, se haya fraccionado la envoltura de la semilla y el epicótilo se haya expandido a aproximadamente 0,5 cm de longitud (aproximadamente 7 días) para explantes de hoja y 1 a 4 cm para explantes de planta de semillero.

- 20 La cepa K599 de *Agrobacterium* (pRi2659Δtet) desarmada o la cepa AGL1 de *A. tumefaciens* que llevan el vector binario pBPSEW008 [p-NOS::c-bar::t-NOS p-PcUBI::c-gusINT::t-NOS] (SEC ID N°: 15) o pBPSMM192b [pAtAhas::c-csr1-2::t-AtAHAS t-NOS::c-gusINT::p-SUPER] (SEC ID N°: 16) se cubren como manchas sobre YEP sólido [10 g/l de Bacto-peptone (Difco; Becton, Dickinson, and Co., Cockeysville, MD, EE.UU.), 5 g/l de extracto de levadura (Difco), 5 g/l de NaCl, 50 mg/l de kanamicina, 1,2 % de agar granulado (Difco) *sólido solo*; pH 7,0] y se incuban a 25 °C durante 2 días. Se recogió una colonia individual con un palillo estéril y se dispuso en 50 ml de YEP líquido con antibióticos y se agitaron (1755 rpm) a 25 °C durante 16 h. Después de alcanzar una DO₆₅₀ 0,8 a 1,0, se prepararon disoluciones madre de trabajo al 15 % de glicerol y se guardaron a menos 80 °C. Un día antes de la inoculación de explantes, se añadieron disoluciones madre de trabajo (depende del crecimiento y concentración de la disolución madre de *Agrobacterium*, cualquiera entre 5 µl y 50 µl) de la cepa de *Agrobacterium* más 50 mg/l de kanamicina a medio líquido YEP en un matraz Erlenmeyer. Los matraces se agitaron durante la noche a 25 °C hasta que la DO₆₅₀ alcanzó 0,8. Antes de preparar los explantes de soja, *Agrobacterium* se sedimentó por centrifugación durante 10 min a 5.500 x g a 20 °C y se resuspendió en medio de co-cultivo líquido [1/10X sales principales B5, 1/10X sales secundarias B5, 1/10X MSIII hierro, 1X vitaminas B5, 3 % de sacarosa, MES 20 mM, acetosiringona 200 µM, GA₃ 0,72 µM, BAP 7,5 µM; pH 5,4] a la densidad deseada (por ejemplo, DO₆₅₀ 0,5) y se incubaron a temperatura ambiente 30 min.

Preparación e inoculación de explantes

- 35 Explante de hojas: Se retiraron el cotiledón y el epicótilo del hipocótilo 2 mm por debajo del nudo cotiledonar. Para exponer el epicótilo y las hojas unifoliadas, los cotiledones se separaron el uno del otro y entonces se sacó el epicótilo por encima del nudo cotiledonar. Las hojas primarias, que consisten en la lámina, el pecíolo y las estípulas, se eliminaron en el nodo primario cortando cuidadosamente en la base de las estípulas de forma que los meristemas axilares se incluyeran en el explante. Se hirió el explante cortando el área entre las estípulas con un bisturí afilado 3 a 5 veces y se eliminaron todos los brotes previamente formados.

- 45 Explante de planta de semillero: Se preparan explantes eliminando la mayoría de las raíces en la unión del hipocótilo/epicótilo o por encima sobre el hipocótilo (si el hipocótilo es muy largo), un cotiledón y cualquier crecimiento de tejido axilar en este nudo, el epicótilo justo por encima del nudo primario que incluye la punta apical, y todas las hojas previamente formadas del nudo primario. Entonces, se daña el nudo primario punzando en la punta del epicótilo donde se encuentra los meristemas axilares usando un bisturí afilado 5 a 10 veces.

- 50 Después de la preparación de explantes, los explantes se sumergieron completamente en la suspensión de *Agrobacteria* durante 30 min. Después de la incubación, los explantes de hojas se transfirieron sobre papel de filtro estéril para eliminar el exceso de cultivo de *Agrobacterium* y se dispusieron con el lado herido en contacto con un papel de filtro de 7 cm redondo que cubre el medio de co-cultivo sólido [1/10X sales principales B5, 1/10X sales secundarias B5, 1/10X MSIII hierro, 1X vitaminas B5, 3 % de sacarosa, MES 20 mM, AS 200 µM, GA₃ 0,72 µM, BAP 7,5 µM, (L-cisteína 0,825 a 8,25 mM, Sigma, ditiotreitól 0 a 1 mM, tiosulfato de sodio 0 a 1 mM), 0,5 % de agar purificado; pH 5,4]. Los explantes de planta de semillero se transfirieron sobre el papel de filtro que recubre el medio de co-cultivo sin transferir. Este papel de filtro previene el crecimiento en exceso de *Agrobacterium* sobre los explantes de soja. Se envolvieron cinco placas con Parafilm "M" (American National Can, Chicago, Illinois, EE.UU.).
- 55 Los explantes de hoja se incubaron durante dos días y los explantes de planta de semillero durante 5 días en la oscuridad a 25 °C.

Selección y regeneración de plantas

Después de la incubación, se eliminó *Agrobacterium* en exceso lavando los explantes en medio de inducción de brotes líquidos [1X sales principales B5, 1X sales secundarias B5, 1X MSIII hierro, 1X vitaminas B5, 3 % de sacarosa, MES 3 mM, BAP 1,0 μ M (explante de planta de semillero) o 2,5 μ M (explante de hoja), kinetina 5 μ M, 250 mg/l de ticarcilina; pH 5,6] y el explante de hojas se secó por transferencia sobre papel de filtro estéril para prevenir el daño por agua, especialmente sobre la lámina. A continuación, aproximadamente 10 explantes de hoja y 5 explantes de planta de semillero se transfirieron sobre medio de inducción de brotes sólido [0,8 % de agar purificado (Sigma)] sin selección con glufosinato durante 7 días. Los explantes de hoja se dispusieron en el medio de forma que la hoja se encontrara perpendicular a la superficie del medio con el pecíolo incorporado en el medio y la lámina fuera del medio y los explantes de planta de semillero con el epicótilo entero en contacto con el medio. Las placas se envolvieron con cinta de ventilación Scotch 394 (3M, St. Paul, Minnesota, EE.UU.) y se dispusieron en una cámara de crecimiento con una temperatura promedio de 25 °C bajo ciclo de 18 h de luz/6 h de oscuridad a 70-100 μ E/m²s.

Después de 7 días, los explantes de hoja se transfirieron a medio de inducción de brotes con 3,0 mg/l de glufosinato y los explantes de planta de semillero a medio de inducción de brotes con 5,0 mg/l de glufosinato. En este momento, hubo un considerable desarrollo de brotes *de novo* en la base del pecíolo sobre explantes de hoja y en la punta del epicótilo en el nudo primario sobre los explantes de planta de semillero. Después de 2 semanas sobre medio de inducción de brotes con selección, los explantes de hoja se transfirieron a medio de alargamiento de brotes [1X sales principales de MS, 1X sales secundarias de MS, 1X MSIII hierro, 1X vitaminas B5, 3 % de sacarosa, MES 3 mM, L-asparagina 0,378 mM, ácido L-pirrolidínico 0,775 mM, IAA 0,057 μ M, GA₃ 1,44 μ M, *trans*-zeatina ribósido 2,85 μ M, 250 mg/l de ticarcilina, 0,8 % de agar purificado (Sigma); pH 5,6] con 3 mg/l de selección con glufosinato para estimular el alargamiento de brotes de los primordios de brotes. Para los explantes de planta de semillero, la almohadilla de brotes se elimina del explante de la punta del epicótilo y se transfiere al mismo medio de alargamiento de brotes. A continuación, los explantes se transfirieron a medio SEM fresco cada 3 semanas hasta que el explante muere o se alargan brotes sanos. Durante la transferencia, se eliminaron los brotes muertos y se cortó la base del explante donde se forma el tejido de callo para ayudar a facilitar la transferencia de nutrientes y agua a los brotes por encima. A continuación, los brotes alargados se transfirieron a medio de enraizamiento ($\frac{1}{2}$ X sales B5, $\frac{1}{2}$ X disolución madre de MS hierro, 2 % de sacarosa, MES 3 mM, ácido indol-butírico 5 μ M, 250 mg/l de Timentin, 0,8 % de agar Noble; pH 5,6) hasta que se formaron raíces. A continuación, el brote enraizado se transfirió a tierra (1:1 (peso/peso) de mezcla de tierra de Carolina:Metro) en una cámara de crecimiento bajo 20 horas de luz hasta que se expandió el tercer trifoliado. A continuación, las plantas se cultivaron a madurez en un invernadero bajo un régimen de 16 horas de luz/8 horas de oscuridad.

Ensayos histoquímicos de GUS

Se evaluaron explantes de hoja para la actividad de GUS colocando en tinción histoquímica de GUS [Na₂HPO₄ 80 mM (pH 8,0), Na₂EDTA 8 mM, 0,8 % (v/v) de Triton-X, 1,6 % (v/v) de sulfóxido de dimetilo, 20 % (v/v) de metanol, K₄Fe(CN)₆ 0,38 mM, sal de X-glucuro CHA 1 mM (Inalco, Milán, Italia)] durante 1 día a 37 °C, después de lo cual el tejido de hoja se lavó en 70 % (v/v) de etanol y se limpió en 95 % de etanol (Jefferson 1987; Kosugi 1990).

Diseño experimental

Para el experimento uno, se prepararon 40 explantes para la inoculación con AGL1 o SHA016 que llevaban el pBPSMM192b binario (SEC ID N°: 16) y se ensayaron para la expresión transitoria de GUS 5 días después del co-cultivo. En un segundo experimento con 3 repeticiones, se probó la regeneración de brotes en un total de 120 explantes inoculados con diferentes concentraciones (DO₆₅₀: 0, 0,125, 0,25, 0,5) de AGL1 o SHA016 de *Agrobacterium*, llevando ambos pBPSEW008 (SEC ID N°: 15). En un tercer experimento, se prepararon 120 explantes para la inoculación con SHA016 o AGL1, llevando ambos pBPSEW008 (SEC ID N°: 15), y se tiñó un subconjunto para la expresión estable de GUS 36 días después del co-cultivo. Se determinaron las frecuencias de transformación putativas en un cuarto experimento ensayando la tinción histológica de GUS sobre brotes de alargamiento de explantes de planta de semillero transformados con tanto la cepa SHA017 (pSB1) de *Agrobacterium* como AGL1, llevando ambas pBPSE008 (SEC ID N°: 15). Este experimento consistió en 5 fechas de inoculación diferentes.

En el primer experimento, tanto AGL1 de *A. tumefaciens* como la cepa K599 de *Agrobacterium* desarmada (SHA016) fueron satisfactorios en transferir el ADN-T en el pecíolo del explante de hoja (Fig. 3). El cuarenta y dos por ciento de los explantes infectados con AGL1 mostraron focos GUS⁺ en las áreas diana, mientras que SHA016 mostró focos GUS⁺ en el 10 % de las áreas diana (Tabla 1). La reducción en la expresión transitoria de GUS sobre aquellos explantes infectados con SHA016 fue principalmente un resultado de la muerte de tejido durante el co-cultivo.

Tabla 1. La capacidad de cepas AGL1 y SHA016 de *Agrobacterium* para infectar explantes de hoja.

Cepa	Explantos totales infectados	Explantos con focos GUS (+) en áreas diana
AGL1	40	17 (42,5 %)
SHA016	40	4 (10 %)

En el segundo experimento, el potencial de regeneración de los explantes inoculados con diferentes concentraciones de K599 desarmado no se diferenciaron significativamente los unos de los otros en este estudio.

Tabla 2. Potencial de regeneración de explantes inoculados con diferentes concentraciones de K599 desarmado

Repetición	DO 650:0	DO 650:0,125	DO 650:0,25	DO 650:0,5
1	8/10	8/10	9/10	3/10
2	10/10	8/10	8/10	6/10
3	3/10	4/10	9/10	9/10

- 5 En el tercer experimento, todos los explantes que se sacrificaron para la tinción histoquímica de GUS después de 35 días después de la inoculación mostraron expresión estable de GUS sobre los explantes de hoja (Fig. 4).

Se prepararon un total de 900 explantes de planta de semillero en el cuarto experimento, de los que 288 se inocularon con AGL1 (pBPSEW008) y 612 se inocularon con SHA017 (pSB1, pBPSEW008) (Tabla 3). En este estudio, se identificó un brote GUS+ (0,35%) de explantes inoculados con AGL y se identificaron 25 brotes GUS+ independientes (4,1%) de explantes inoculados con SHA017. De estos, diez de los brotes del tratamiento de SHA017 se desarrollaron en plantas T₀ maduras. El análisis de Southern de las diez plantas T₀ confirmó que cada planta fue un evento de transformación independiente basándose en los patrones de integración de ADN-T en el genoma de la planta. La herencia del ADN-T en las progenies T₁ de una línea, 21-2, también se confirmó por hibridación Southern del ADN genómico de planta con sondas de los genes gus y bar (Fig. 15).

- 15 Tabla 3. Producción de brotes alargados y plantas gus+ de explantes de plantas de semillero inoculados con tanto la cepa AGL1 como SHA017 de *Agrobacterium*.

Experimento nº	Cepa de <i>Agrobacterium</i>	Número de explantes inoculados	Nº de explantes con brote alargado GUS+	Nº de plantas maduras GUS+
E071304	AGL	35	0	0
E071304	SHA017	174	3	0
E071504	AGL	104	0	0
E071504	SHA017	93	5	3
E071904	AGL	100	1	0
E071904	SHA017	100	9	2
E072204B	AGL	27	0	0
E072204B	SHA017	108	0	0
E072804B	AGL	22	0	0
E072804B	SHA017	137	8	5

Ejemplo 4b: Transformación de *Arabidopsis thaliana*

20 Se cultivaron plantas de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Col-0) en tierra hasta que florecieron. Se quitaron flores primarias para aumentar las flores en flores secundarias. Se transformaron cepas MP90 (GV3101 (pMP90); Koncz y Schell 1986), SHA001 y K599 no mutante de *Agrobacterium* con las construcciones de interés pBPSEW008 (SEC ID N°: 15) y pBPSMM192b (SEC ID N°: 16) y se cultivaron en 250 ml en medio LB líquido (10 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levadura, 10 g/l de NaCl (EM Science)) hasta que el cultivo alcanzó una DO₆₅₀ de 1,2. Las células bacterianas se recogieron por centrifugación (15 minutos, 4.000 x g) y se resuspendieron en disolución de infiltración (5 % de sacarosa, 0,05 % de SILWET L-77 [Lehle Seeds, Cat. n° VIS-02], 0,217 % de sales de MS [Sigma M5524]) a una DO₆₅₀ de 0,8-0,9.

30 A continuación, las plantas de *A. thaliana* en florecimiento se transformaron por el procedimiento de inmersión floral (Clough y Bent 1998) con la cepa de *Agrobacterium* transgénica que lleva el vector descrito anteriormente sumergiendo durante 10-20 segundos en la disolución de *Agrobacterium*. Después, las plantas se mantuvieron en la cámara de crecimiento hasta que las semillas pudieron recogerse. Se seleccionaron semillas transgénicas sembrando semillas esterilizadas en la superficie sobre medio de crecimiento (4,4 g/l de sales de MS [Sigma-

Aldrich], 1 g/l de MES [Duchefa], 20 g/l de sacarosa, 6 g/l de Phytagar complementado con 5 mg/l de glufosinato para plantas que llevan el marcador de resistencia bar, Pursuit 100 nM para plantas que comprenden un casete de expresión para el gen AtAHAS, 50 mg/l de kanamicina para plantas que llevan el marcador de resistencia *nptII*, o D-aminoácidos 0,3 a 30 mM (como se describe más adelante) para plantas que comprenden un casete de expresión para el gen *dao1* de *Rhodotorula gracilis*. Las plantas supervivientes se transfirieron a tierra y se cultivaron en el invernadero. Se tiñó una muestra de plantas supervivientes usando disolución de ensayo de GUS (Jefferson 1987) (NaH_2PO_4 0,4 M- H_2O a pH 7,0, EDTA 0,5 M, 0,01 % de TritonX-100, 250 mg/l de X-glucuronidasa (Fermentas)) durante la noche a 37 °C y se observó para expresión de GUS (Fig. 10).

Las líneas que contenían un único locus de inserción de ADN-T se seleccionan por análisis estadístico de segregación de ADN-T en la población T2 que germinó sobre medio que comprende el agente de selección apropiado. Plantas con un único locus de ADN-T insertado se cultivan y se auto-fertilizan. A continuación, se identifican lotes de semillas T3 homocigóticas analizando la segregación de ADN-T en progenies T3 y se confirmó que estaban expresando el gen introducido por análisis de transferencia Western.

Ejemplo 4c: Transformación mediada por *Agrobacterium* de *Brassica napus*

Se cultiva la cepa K599 de *Agrobacterium* (pRi2659A) desarmada transformada con el plásmido de interés (tal como pBPSMM192b) en 50 ml de medio YEB (véase el Ejemplo 4a) a 28 °C durante la noche. La disolución de *Agrobacterium* se mezcla con medio de co-cultivo líquido (sales de MSB5 concentradas dobles (Duchefa), 30 g/l de sacarosa (Duchefa), 3,75 mg/l de BAP (6-bencilaminopurina, Duchefa), 0,5 g/l de MES (Duchefa), 0,5 mg/l de GA3 (ácido giberélico, Duchefa); pH 5,2) hasta que sea alcanza DO_{650} de 0,5. Se cortan pecíolos de 4 días de edad de plantas de semillero de *Brassica napus* cv. Westar cultivadas sobre medio de crecimiento B (sales de MSB5 (Duchefa), 3 % de sacarosa (Duchefa), 0,8 % de agar Oxoid (Oxoid GmbH); pH 5,8). Los pecíolos se sumergen durante 2-3 segundos en la disolución de *Agrobacterium* y después se ponen en medio sólido para el co-cultivo (medio de co-cultivo complementado con 1,6 % de agar Oxoid). El co-cultivo dura 3 días (a 24 °C y aproximadamente 50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ de intensidad de la luz). Después, los pecíolos se transfieren a medio de co-cultivo complementado con el agente de selección apropiado (18 mg/l de kanamicina (Duchefa) para plantas que comprenden la kanamicina marcadora *nptII* para plantas que llevan el marcador de resistencia *nptII*, o D-aminoácidos 0,3 a 30 mM; como se describe más adelante) para plantas que comprenden un casete de expresión para el gen *dao1* de *Rhodotorula gracilis*) y 300 mg/l de Timentin (Duchefa)

Los pecíolos transformados se incuban sobre el medio de selección durante cuatro semanas a 24 °C. Esta etapa se repite hasta que aparecen brotes. Los brotes se transfieren a medio A6 (sales de MS (Sigma Aldrich), 20 g/l de sacarosa, 100 mg/l de mio-inositol (Duchefa), 40 mg/l de sulfato de adenina (Sigma Aldrich), 500 mg/l de MES, 0,0025 mg/l de BAP (Sigma), 5 g/l de agar Oxoid (Oxoid GmbH), 150 mg/l de Timentin (Duchefa), 0,1 mg/l de IBA (ácido indolbutírico, Duchefa); pH 5,8) complementado con el agente de selección apropiado (18 mg/l de kanamicina (Duchefa) para plantas que comprenden la kanamicina marcadora *nptII* para plantas que llevan el marcador de resistencia *nptII*, o D-aminoácidos 0,3 a 30 mM; como se describe más adelante) hasta que se alargaron. Los brotes alargados se cultivan en medio A7 (medio A6 sin BAP) para el enraizamiento. Las plantas enraizadas se transfieren a tierra y se cultivan en el invernadero.

Ejemplo 4d: Transformación mediada por *Agrobacterium* de tomate

Germinación de semillas *in vitro*

Se esterilizan semillas de tomate en 10 % de Clorox™ (5,25 % de hipoclorito de sodio) que contiene 0,1 % de Tween 20 durante 15 con arremolinamiento. Las semillas esterilizadas se aclaran 4-5 veces con agua destilada estéril. Después de la esterilización, las semillas se transfieren sobre medio de germinación [0,25X MS, 7,5 g/l de sacarosa, 0,7 % de agar purificado (Sigma), pH 5,8] en 25 x placas de Petri de 100 mm. Las placas de Petri que contienen semillas se colocan en la oscuridad durante 2-3 días para conseguir la germinación uniforme y se transfieren a la sala de cultivo con luz en la sala de cultivo (25 °C, fotoperiodo de 16/8 horas, intensidad de la luz de 70 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$). Se usan cotiledones de plantas de semillero de aproximadamente 8 días de edad para la transformación mediada por *Agrobacterium*.

Preparación de *Agrobacterium*

La cepa K599 de *Agrobacterium* (SHA001) desarmada que lleva el vector binario pBPSEW008 [p-NOS::c-bar::t-NOS p-PcUBI::c-gusINT::t-NOS] (SEC ID N°: 15) o pBPSMM192b [p-AtAhas::c-csr1-2::t-AtAHASpA t-NOS::c-gusINT::p-SUPER] (SEC ID N°: 16) se cubrió como manchas sobre YEP sólido [10 g/l de Bacto-peptone (Difco; Becton, Dickinson, and Co., Cockeysville, MD, EE.UU.), 5 g/l de extracto de levadura (Difco), 5 g/l de NaCl, 50 mg/l de kanamicina, 1,2 % de agar granulado (Difco) sólido solo; pH 7,0] y se incubó a 25 °C durante 2 días. Se recogió una colonia individual con un palillo estéril y se dispuso en 50 ml de YEP líquido con antibióticos y se agitó (175 rpm) a 25 °C durante 16 h. Después de alcanzar una DO_{650} de 0,8 a 1,0, se prepararon disoluciones madre de trabajo al 15 % de glicerol y se guardaron a menos 80 °C. Un día antes de la inoculación de explantes, se añadieron disoluciones madre de trabajo (depende del crecimiento y concentración de la disolución madre de *Agrobacterium*, cualquiera entre 5 μl y 50 μl) de la cepa de *Agrobacterium* más 50 mg/l de kanamicina a medio líquido YEP en un matraz

Erlenmeyer. Los matraces se agitaron durante la noche a 25 °C hasta que la DO₆₅₀ alcanzó 0,8. Antes de preparar los explantes de tomate, *Agrobacterium* se sedimentó por centrifugación durante 10 min a 5.500 x g a 20 °C y se resuspendió en medio de co-cultivo líquido [1/10X sales principales de B5, 1/10X sales secundarias de B5, 1/10X MSIII hierro, 1X vitaminas B5, 3 % de sacarosa, MES 20 mM, acetosiringona 200 µM, GA₃ 0,72 µM, BAP 7,5 µM; pH 5,4] a la densidad deseada (por ejemplo, DO₆₅₀ de 0,5) y se incubaron a temperatura ambiente 30 min.

Preparación de explantes

Se retiran cotiledones de plantas de semillero de aproximadamente 8 días de edad y se colocan sobre placa de Petri estéril. Se retiran ambos extremos de los cotiledones y se cortan por la mitad transversalmente, se transfieren sobre papel de filtro estéril con el lado adaxial hacia abajo y se colocan sobre el medio pre-cultivado [sales de MS y vitaminas, 16 g/l de glucosa, 0,1 mg/l de NAA, 1 mg/l de BAP, 0,7 % de agar purificado, pH 5,8] durante dos días en la oscuridad a 22 °C.

Co-cultivo

El papel de filtro con los explantes se coloca sobre el medio de co-cultivo [sales de MS y vitaminas, 16 g/l de glucosa, 0,1 mg/l de NAA, 1 mg/l de BAP, 0,7 % de agar purificado, acetosiringona 150 µM, pH 5,8] y se inocula con suspensión de *Agrobacterium* (0,3-0,5 a DO₆₅₀) durante dos a tres días en la oscuridad a 22 °C.

Selección y regeneración de plantas

Al final del tercer día, los explantes se colocan con el lado abaxial hacia abajo sobre el medio de recuperación (1X sales de MS y vitaminas, 16 g/l de glucosa, 2 mg/l de zeatina, 0,7 % de agar purificado, 200 mg/l de Timentin) durante una semana a 25 °C en la sala de cultivo (70 µE/m²s). Después de la recuperación, los explantes se transfieren sobre el medio de selección/regeneración (1X sales de MS y vitaminas, 30 g/l de sacarosa, 2 mg/l de zeatina, 0,7 % de agar purificado, 200 mg/l de Timentin, Pursuit 50-100 nM, pH 5,8) durante 2,5 semanas. Las yemas de los brotes en los callos se escinden de los cotiledones y se transfieren sobre el medio de alargamiento (1X sales de MS y vitaminas, 20 g/l de sacarosa, 0,5 mg/l de zeatina o 0,25 mg/l de IBA, 0,7 % de agar purificado, 200 mg/l de Timentin y Pursuit 50-100 nM) durante 2-3 semanas. Los brotes que se alargan se escinden de los callos y se colocan sobre el medio de enraizamiento (1X sales de MS y vitaminas, 20 g/l de sacarosa, 0,25 mg/l de IBA, 0,7 % de agar purificado, 100 mg/l de Timentin, Pursuit 50 nM, pH 5,8) durante 2-3 semanas hasta que las plántulas están listas para ser trasplantadas a la tierra.

Ensayos histoquímicos de GUS

Se evaluaron explantes de hoja para la actividad de GUS colocando en tinción histoquímica de GUS [Na₂HPO₄ 80 mM (pH 8,0), Na₂EDTA 8 mM, 0,8 % (v/v) de Triton-X, 1,6 % (v/v) de sulfóxido de dimetilo, 20 % (v/v) de metanol, K₄Fe(CN)₆ 0,38 mM, sal de X-glucuro CHA 1 mM (Inalco, Milán, Italia)] durante 1 día a 37 °C, después de lo cual el tejido de hoja se lavó en 70 % (v/v) de etanol y se limpió en el 95 % de etanol (Jefferson y col. 1987, Kosugi y col. 1990).

Se obtuvieron plántulas de tomate transgénicas usando la cepa K599 de *Agrobacterium* (SHA001) desarmada que contiene pBPSMM192b (SEC ID N°: 16) (véase la Fig. 5).

Ejemplo 4e: Transformación mediada por *Agrobacterium* de *Zea mays*

Semillas de ciertas líneas endogámicas de maíz o líneas híbridas de maíz se germinan, enraizan y adicionalmente se cultivan en invernaderos. Las mazorcas de las plantas de maíz se recogen 8 a 14 (promedio 10) días después de la polinización (DAP) y se aíslan embriones inmaduros de las mismas. El momento preciso de la recogida varía dependiendo de las condiciones de crecimiento y la variedad de maíz. La longitud óptima de los embriones inmaduros para la transformación es aproximadamente 1 a 1,5 mm, que incluye la longitud del escutelo. El embrión debe ser translúcido, no opaco. Los embriones escindidos se recogen en medio líquido basado en MS (que comprende 1,5 mg/l de 2,4-D). Se añade acetosiringona (50 a 100 µM) al medio en tanto al mismo tiempo que la inoculación con *Agrobacterium* como justo antes de la infección con *Agrobacterium*.

Preparación de *Agrobacterium*: Se cultiva la cepa SHA017 (K599 [pRi2659Δ]) de *Agrobacterium* transformada con el plásmido de interés (pSB1/pBPSMM232; este plásmido es un plásmido quimérico resultante de la fusión de pBPSMM232 (SEC ID N°: 17 [p-ZmUbi1::c-ZmAHASL/Xi12::t-ZmAHAS t-NOS::c-gusINT::p-ZmUbi1]) con pSB1 (Komari 1996) sobre medio YEP. La suspensión de *Agrobacterium* se agita con vórtex en el medio anteriormente indicado (que comprende medio de acetosiringona 100 µM durante preferentemente 1-2 horas antes de la infección).

Inoculación / co-cultivo: La suspensión bacteriana se añade al microtubo (placa) que contiene embriones inmaduros previamente empapados y se deja a temperatura ambiente (20-25 °C) durante 5 a 30 minutos. Se elimina la suspensión bacteriana en exceso y los embriones inmaduros y las bacterias en el medio de residuo se transfieren a una placa de Petri. Los embriones inmaduros se colocan sobre el medio de co-cultivo con el lado plano hacia abajo (escutelo hacia arriba). La placa se sella y se incuba en la oscuridad a 22 °C durante 2-3 días (medio de co-cultivo: MS-base, 1,5 mg/l de 2,4-D, AgNO₃ 15 µM, acetosiringona 100 µM). Alternativamente, los embriones inmaduros

escindidos se ponen directamente sobre el medio de co-cultivo con el lado plano hacia abajo (escutelo hacia arriba). Se añade suspensión de células de *Agrobacterium* diluida a cada embrión inmaduro. La placa se sella y se incuba en la oscuridad a 22 °C durante 2-3 días.

5 Recuperación: Después del co-cultivo, los embriones se transfieren a medio de recuperación (MS-base que comprende 1,5 mg/l de 2,4-D, 150 mg/l de Timentin) y se incuban las placas en la oscuridad a 27 °C durante aproximadamente 5 a 7 días con el lado del escutelo hacia arriba.

10 Selección de callos transformados: Los embriones inmaduros se transfieren a medio de selección (medio de recuperación que comprende además el agente selectivo, por ejemplo, D-alanina en concentración de 0,3 a 30 mM) (escutelo hacia arriba) y se incuban en la oscuridad a 27 °C durante 10-14 días (primera selección). Todos los embriones inmaduros que producen callos variables se subcultivan al 2-3° medio de selección. En esta etapa, se elimina cualquier raíz que se haya formado. La incubación se produce durante 2 semanas bajo las mismas condiciones para la primera selección (segunda selección). Los callos regenerables se escinden del escutelo (los callos regenerables son de color blanquecino, compactos, no limosos y pueden tener algunas estructuras similares a embrión) y se transfieren al 2-3° medio de selección fresco. Las placas se envuelven y se incuban en la oscuridad a 15 27 °C durante 2 semanas (la 3ª selección puede no ser necesaria para la mayoría de los genotipos, los callos regenerables pueden transferirse a medio de regeneración).

20 Regeneración de plantas transformadas: Se escinden callos proliferados (blanquecinos que forman estructuras embrionarias) del mismo modo que para la 2ª/3ª selección y se transfieren a medio de regeneración (como medio de selección pero sin 2,4-D). Las placas se envuelven y se ponen a la luz (aprox. 2.000 lux) a 25 ó 27 °C durante 2 semanas, o hasta que sean visibles estructuras similares a brotes. Transferencia a medio de regeneración fresco si fuera necesario. Se transfieren secciones de callos con brotes regenerados o estructuras similares a brotes a una Phytatray que contiene medio de enraizamiento y se incuban durante 2 semanas bajo la misma condición que la etapa anterior, o hasta que se hayan desarrollado plántulas enraizadas. Después de 2 a 4 semanas sobre medio de enraizamiento (medio MS semi-concentrado, sin 2,4-D, sin agente selectivo), los callos que todavía tienen regiones 25 verdes (pero que no han regenerado plantas de semillero) se transfieren a Phytatrays de enraizamiento nuevas. Las plantas de semillero enraizadas se transfieren a tierra Metromix en el invernadero y se cubren cada una con cúpula de plástico durante al menos 1 semana, hasta que se hayan establecido las plantas de semillero. Cuando las plantas alcanzan las etapas de 3-4 hojas, se fertilizan con Osmocote y a continuación se pulverizan con agente selectivo (por ejemplo, D-alanina o D-serina) y se cultivan en el invernadero durante otras dos semanas. Las plantas no 30 transgénicas deben desarrollar síntomas herbicidas o mueren en este momento. Las plantas supervivientes se trasplantan en macetas de 10" con MetroMix y 1 cucharilla de té de Osmocote.

Ejemplo 5: Purificación, secuenciación y anotación del plásmido pRi2569Δ

35 Se cultivó la cepa SHA017 de *Agrobacterium* (K599 de *Agrobacterium* desarmada [pRi2659Δ]) en 5 litros de caldo LB a 28 °C durante la noche. Se extrajo ADN total según un protocolo de lisis alcalina estándar, seguido de extracción con fenol-cloroformo (Sambrook y col. 1989). Se aisló ADN del plásmido pRi2659Δ del ADN total usando electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), con un sistema CHEF-DRIII (Bio-Rad, Cat. n°: 170-3695). El ADN total se cargó en un gel de agarosa certificado de campo pulsado al 1 % (Bio-Rad, Cat. n°: 162-0137) en 0,5x tampón TBE (Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM), seguido de PFGE a 6 V/cm, con tiempo de cambio inicial de 1 40 segundo y tiempo de cambio final de 25 segundos a 14 °C durante 24 h. Después de la electroforesis, las tiras de gel que contenían el carril del marcador molecular y el borde del carril de muestra de ambos lados del gel se escindieron, se tiñeron con bromuro de etidio (Sigma) y se obtuvieron imágenes. Una banda visible resuelta estuvo en las tiras de gel y el resto del ADN quedó en el pocillo. La banda individual se escindió y se recuperó usando electroelución según Fu y Dooner (2000).

45 Se usó ADN recuperado como molde para la amplificación por PCR con cebadores específicos de pRi para confirmar la recuperación de ADN de pRi. Se diseñaron cebadores dentro de las regiones conservadas del gen *vir* de pRi1724 (n° de acceso de GenBank AP002086).

Cebador directo *virG*: 5'-TACTTCCTCC TCACGCACTC-3' (SEC ID N° 27)
Cebador inverso *virB*: 5'-GCCAGCAATG ATCAAGAATT TGTTT-3' (SEC ID N° 28)

50 Podrían generarse fragmentos de pRi mediante procedimientos conocidos para aquellos expertos en la materia, tal como clonación con pistola de genes. La preparación de plásmido Ri podría digerirse individualmente con diversas enzimas de restricción comercialmente disponibles, tales como *Bam*HI, *Sph*I, *Eco*RI, *Hind*III (todas disponibles de New England Biolabs, Beverly, MA) y sub-clonarse en un vector tipo pUC similarmente digerido, tal como pBlueScript (Stratagene, La Jolla, CA). Entonces, podrían secuenciarse clones individuales, y ensamblarse secuencias individuales en contigios para generar el mapa de secuencia completo como se describe más adelante.

55 Se secuenció pRi2659Δ purificado según Margulies y col. (2005) y Sanger (1977). Se enmascaró la secuencia del vector usando *cross_match* (Green © 1994-1999) y los datos en bruto de la secuencia limpios se ensamblaron según Margulies y col. (2005) y CAP3 (Huang y Madan 1999). El hueco restante de la secuencia se llenó por amplificación por PCR y secuenciación posterior usando los siguientes cebadores:

Cebador directo de PCR G109: 5'-TTGGTGCGAC AACTCCTCGG CG-3' (SEC ID N° 29)
 Cebador directo de PCR G112: 5'-GGTGAGCTCG ATCAGCTTCG GC-3' (SEC ID N° 30)

5 Se realizaron reacciones de secuenciación en productos de PCR según Sanger (1977). Para el pulido final, la secuencia de borrador se dividió en 100 fragmentos teniendo cada fragmento un solapamiento de 50 bases extendidas a su fragmento de conjunción; las lecturas de la secuencia en bruto altamente idénticas a cada fragmento se reunieron y se reensamblaron con CAP3 a una alta rigurosidad. Estas secuencias consenso ensambladas a partir de cada fragmento se ensamblaron con CAP3 de nuevo para generar los mapas de secuencia de pRi2659Δ (SEC ID N°: 24), pRi2659Δtet (SEC ID N°: 25) y pRi2659 (SEC ID N°: 26) en Vector NTI (Invitrogen, Carlsbad CA). La nueva secuencia de pRi2659 se anotó usando BLASTx a e-10 (Altschul y col. 1997) y la versión 148 de edición de datos de proteínas de GenBank Genpept.

Ejemplo 6: Proteínas codificadas por pRi2659Δ

10 La siguiente tabla (Tabla 4) enumera las proteínas probablemente codificadas por marcos de lectura abiertos en el plásmido pRi2659Δ (SEC ID N°: 24). Se enumeran las SEC ID N° de proteína (SINo) y una descripción detallada del aminoácido codificado.

Tabla 4: Marcos de lectura abiertos de pRi2659Δ y sus SEC ID N° de proteína (SINo)

Característica	SINo	Detalles
<i>rcorf1</i>	25	similar a la integrasa/recombinasa similar a mll6374, [Mesorhizobium loti MAFF303099]
<i>rcorf2</i>	124	similar a riorf1 en pRi1724, homólogo del gen orf3 en IS66
<i>rcorf3</i>	123	débilmente similar a mlr6097, proteína de control de la asimilación de nitrógeno [Mesorhizobium loti MAFF303099], COG0583 [K] Regulador de la transcripción
<i>rcorf4</i>	122	Extremo N similar a STH1062, similar a la proteína de unión a ATP del transportador ABC de glutamina [Symbiobacterium thermophilum IAM 14863]; extremo C similar a bl6362, proteína hipotética en Bradyrhizobium japonicum USDA 110, COG2079 [R] Proteína sin caracterizar que participa en el catabolismo del propionato
<i>rcorf5</i>	121	similar a Bcep02000339 [Burkholderia fungorum LB400], similar a blr3310, COG0765: proteína permeasa de transportador ABC [Bradyrhizobium japonicum USDA 110]
<i>rcorf6</i>	120	similar a COG0765 [Burkholderia fungorum LB400], similar a PSPT05181, transportador ABC de cistina, proteína permeasa, putativa [Pseudomonas syringae pv. tomato str. DC3000]
<i>rcorf7</i>	119	similar a COG0834 Burkholderia fungorum LB400 COG0834, similar a STH1060, proteína de unión al sustrato transportador ABC de glutamina [Symbiobacterium thermophilum IAM 14863]
<i>rcorf8</i>	118	similar a la proteína de utilización de hidantoína de C58 de A. tumefaciens hyuB
<i>rcorf9</i>	117	similar a la proteína de utilización de hidantoína de C58 de A. tumefaciens hyuA
<i>rcorf10</i>	116	similar a la proteína reguladora transcripcional [Bradyrhizobium japonicum USDA 110], represor transcripcional del operón de gluconato de hélice_giro_hélice
<i>rcorf11</i>	115	similar a riorf40 en pRi1724, un homólogo del gen hutH, cd01441: HAL; la histidina amoniaco-liasa (HAL) cataliza la primera etapa en la degradación de histidina a glutamato
<i>rcorf12</i>	114	débilmente similar a riorf20 en pRi1724, similar a la proteína hipotética Bcep02000338 [Burkholderia fungorum LB400].
<i>rcorf13</i>	26	débilmente similar a riorf22 en pRi1724, similar a la proteína hipotética Bcep02000337 [Burkholderia fungorum LB400]
<i>rcorf14</i>	27	probable gen transportador de cucumbopina, similar a riorf37 en pRi1724, un probable transportador de mikimopina

ES 2 543 086 T3

(continuación)

Característica	SINo	Detalles
<i>rcorf15</i>	164	similar a SMA2207, una proteína de unión a ATP del transportador ABC putativo [Sinorhizobium meliloti 1021], COG3842: PotA; sistemas de transporte de espermidina/putrescina tipo ABC, componente de ATPasas [transporte y metabolismo de aminoácidos]
<i>rcorf16</i>	28	similar a SMA2205 Sinorhizobium meliloti 1021 (cepa: 1021), un sistema de transporte de espermidina/putrescina tipo ABC COG1176 [E], componente de permeasa I
<i>rcorf17</i>	165	probable transportador de cucumbopina, similar a riorf34, una proteína hipotética [Agrobacterium rhizogenes] el probable gen transportador de mikimopina
<i>rcorf18</i>	126	similar a la proteína hipotética AGR_L_1821 [Agrobacterium tumefaciens str. C58], un homólogo del gen sdeB, cd01298: ATZ_TRZ similar; la familia TRZ/ATZ contiene enzimas de la ruta de degradación de atrazina e hidrolasas relacionadas
<i>rcorf19</i>	29	similar a hutI, imidazolona-5-propionato hidrolasa [Agrobacterium tumefaciens str. C58], menos similar a riorf39 en pRi1724, ruta de KEGG: metabolismo de histidina 00340.
<i>rcorf20</i>	30	similar a riorf41 en pRi1724, una proteína hipotética
<i>rcorf21</i>	31	similar a riorf42 en pRi1724, un homólogo del gen hutU, una urocanasa, número EC 4.2.1.49
<i>rcorf22</i>	32	similar a proteína de función desconocida DUF886 [Mesorhizobium sp. BNC1] y menos similar a riorf43 en pRi1724, similar a gen desconocido próximo al gen hutR en Pseudomonas putida
<i>rcorf23</i>	33	similar al extremo C similar a la familia transposasa de IS30
<i>rcorf24</i>	134	similar a riorf51 en pRi1724, débilmente similar al gen mtrR de la familia reguladora bacteriana de tetR.
<i>rcorf25</i>	133	similar a riorf52 en pRi1724, similar la proteína de la familia de descarboxilasa MCA2182 [Methylococcus capsulatus str. Bath]
<i>rcorf26</i>	132	probable gen idi, similar a riorf53 en pRi1724, similar a idi, isopentenil-difosfato delta-isomerasa [Mycobacterium tuberculosis CDC1551] EC 5.3.3.2.
<i>rcorf27</i>	131	probable trans-zeatina sintasa, similar a riorf54 en pRi1724, EC 2.5.1.-.
<i>rcorf28</i>	130	probable gen GALLS, similar a riorf55 en pRi1724, complementa virE2, mecanismo desconocido, requerido para la transformación de plantas estable eficaz.
<i>rcorf29</i>	166	similar a riorf57 en pRi1724, un homólogo de eutC, cadena ligera de la etanolamina amoniaco-liasa
<i>rcorf30</i>	129	similar a riorf58 en pRi1724, un homólogo de eutB, cadena pesada de la etanolamina amoniaco-liasa
<i>rcorf31</i>	128	similar riorf59 en pRi1724, similar al gen orf3 en Methylobacterium extorquens, COG3931 [E] N-Formilglutamato predicho
<i>rcorf32</i>	34	similar a riorf60 en pRi1724, similar al gen gatA-1 [glutamil-ARNt amidotransferasa, subunidad A (gatA-1) Sulfolobus solfataricus P2]
<i>rcorf33</i>	167	similar a riorf61 en pRi1724, gen transportador ABC hipotético similar a PH0807, pfam00496: SBP_bac_5; proteínas de unión al soluto extracelulares bacterianas, familia 5
<i>rcorf34</i>	35	similar a riorf62 en pRi1724, gen transportador ABC hipotético similar al gen agaB, ácido agropínico permeasa, pfam00528: BPD_transp_1; Componente de la membrana interna del sistema de transporte dependiente de la unión a proteína

ES 2 543 086 T3

(continuación)

Característica	SINo	Detalles
<i>rcorf35</i>	36	similar a riorf63 en pRi1724, gen transportador ABC hipotético similar al gen dppC, pfam00528: BPD_transp_1; Componente de la membrana interna del sistema de transporte dependiente de la unión a proteína
<i>rcorf36</i>	37	similar a riorf64 en pRi1724, gen transportador ABC hipotético similar al gen moaD, ácido manopínico permeasa, COG1123: componente de ATPasas de diversos sistemas de transporte tipo ABC.
<i>rcorf37</i>	38	similar a riorf66 en pRi1724, similar al gen amaB, N-carbamoil-beta-alanina amidohidrolasa
<i>rcorf38</i>	168	similar a riorf67 en pRi1724, débilmente similar al gen pck, smart00587: CHK; ZnF_C4 y dominio HLH que contiene dominio de cinasas
<i>rcorf39</i>	39	similar a riorf68 en pRi1724, débilmente similar al gen pck, pfam01633: Colina_cinasa; colina/etanolamina cinasa
<i>rcorf40</i>	40	similar a riorf69 en pRi1724, similar a MLCB1779.29 (probable gen monofosfatasa) en <i>Mycobacterium leprae</i> , cd01641: IMPasa_Bacteriana_similar_1; familia predominantemente bacteriana de fosfatasa dependientes de Mg ⁺⁺ , relacionadas con inositol monofosfatasa
<i>rcorf41</i>	41	similar a riorf71 en pRi1724, gen quimiorreceptor hipotético similar al gen orf2 en pTi15955
<i>rcorf42</i>	137	similar a riorf73 en pRi1724, gen represor hipotético, similar a Sma2004 [<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021], regulador transcripcional de la familia ROK putativa.
<i>rcorf43</i>	136	similar a riorf73 en pRi1724, similar a Sma2002 [<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021], COG2755 [E] Lisofosfolipasa L1 y esterasas relacionadas.
<i>rcorf44</i>	42	similar a riorf74, similar al gen teuB (proteína de unión al azúcar periplásmica), COG1879: RbsB; sistema de transporte de azúcar tipo ABC, componente periplásmico [transporte y metabolismo de hidratos de carbono].
<i>rcorf45</i>	43	similar a riorf75 en pRi1724, similar al gen teuA (transportador ABC de azúcar de unión a ATP), gen transportador ABC hipotético, COG1129: MglA; sistema de transporte de azúcar tipo ABC, componente de ATPasa [transporte y metabolismo de hidratos de carbono].
<i>rcorf46</i>	44	similar a riorf76 en pRi1724, similar al gen teuC1 (transportador ABC de azúcar-permeasa), un gen transportador ABC hipotético, pfam02653: BPD_transp_2; sistema de transporte de aminoácidos de cadena ramificada / componente de permeasa.
<i>rcorf47</i>	45	similar a riorf77 en pRi1724, similar al gen teuC2 (transportador ABC de azúcar-permeasa), un gen transportador ABC hipotético, pfam02653: BPD_transp_2; sistema de transporte de aminoácidos de cadena ramificada / componente de permeasa.
<i>rcorf48</i>	46	similar a riorf78 en pRi1724, COG2755 [E] Lisofosfolipasa L1 y esterasas relacionadas.
<i>rcorf49</i>	169	similar a riorf79 en pRi1724, un homólogo del gen glpK (glicerol cinasa), EC 2.7.1.30.
<i>rcorf50</i>	47	similar a riorf80 de pRi1724, un homólogo del gen glpD, glicerol-3-fosfato deshidrogenasa [<i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58]
<i>rcorf51</i>	48	similar a riorf81 en pRi1724, un homólogo del gen acs (acetil-CoA sintetasa), EC 6.2.1.1.
<i>rcorf52</i>	49	similar a riorf82 de pRi1724, un homólogo del gen adk, pfam00406: ADK; adenilato cinasa, EC 2.7.4.3.
<i>rcorf53</i>	50	similar a riorf83 en pRi1724, un gen quimiorreceptor hipotético similar al gen orf2 en pTi15955

ES 2 543 086 T3

(continuación)

Característica	SINo	Detalles
<i>rcorf54</i>	51	similar a riorf84, un homólogo del gen <i>cbbF</i> , cd00354: FBPasa; fructosa-1,6-bisfosfatasa, una enzima que cataliza la hidrólisis de fructosa-1,6-bisfosfato en fructosa-6-fosfato y es crítica en la ruta de la gluconeogénesis.
<i>rcorf55</i>	52	homólogo del gen <i>cbbA</i> , a cd00947: TBP_aldolasa_IIB; tagatosa-1,6-bisfosfato (TBP) aldolasa y aldolasas de clase II tipo B relacionadas
<i>rcorf56</i>	53	similar a la cadena A de <i>pdb</i> , triosafofosato isomerasa de levadura (<i>tri1</i>)
<i>rcorf57</i>	54	similar a riorf88 en pRi1724 y al gen <i>phrR</i> , proteína de unión a ADN, familia XRE de hélice-giro-hélice.
<i>rcorf58</i>	55	similar a riorf89 en pRi1724 y al gen <i>thcR</i> , dominio conservado, HTH_ARAC; hélice_giro_hélice, proteína de control del operón de arabinosa
<i>rcorf59</i>	56	similar a riorf90 en pRi1724 y <i>Atu6096</i> en pTiC58, conservada en especies de <i>Mesorhizobium</i> y <i>Agrobacterium</i> .
<i>rcorf60</i>	57	similar a riorf91 en pR11724, también similar a varias proteínas hipotéticas en especies de <i>Agrobacterium</i> , <i>Mesorhizobium</i> y <i>Nitrobacter</i> .
<i>rcorf61</i>	58	similar a riorf92 en pRi1724, proteína hipotética conservada en varias cepas de <i>Agrobacterium</i> y <i>Mesorhizobium</i> .
<i>rcorf62</i>	59	similar a riorf93, similar al gen <i>jhp0928</i> en <i>Helicobacter pylori</i> , COG0827; una ADN metilasa específica de adenina [replicación, recombinación y reparación de ADN].
<i>rcorf63</i>	60	similar a la proteína de reparto de <i>AGR_pTi_191 Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58, proteína de reparto, COG1475 [K] Reguladores transcripcionales predichos.
<i>rcorf64</i>	61	similar a la proteína hipotética <i>MesoDRAFT_1041</i> [<i>Mesorhizobium</i> sp. BNC1], conservada en especies de <i>Agrobacterium</i> , <i>Mesorhizobium</i> y <i>Nitrobacter</i> .
<i>rcorf65</i>	170	similar riorf95 en pRi1724, similar a la región en la dirección 3' del gen <i>nylA</i> en pOAD2.
<i>rcorf66</i>	62	similar a la proteína hipotética <i>MesoDRAFT_1043</i> [<i>Mesorhizobium</i> sp. BNC1], conservada en especies de <i>Agrobacterium</i> , <i>Mesorhizobium</i> y <i>Nitrobacter</i> .
<i>rcorf67</i>	63	similar a riorf96 en pRi1724, una proteína hipotética débilmente similar a la región en la dirección 3' del gen <i>hydL</i> en <i>Tiocapsa roseopersicina</i> .
<i>rcorf68</i>	64	similar a <i>AGR_pTi_204</i> [<i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58] y <i>argG</i> , argininosuccinato sintasa, de <i>Streptomyces clavuligerus</i> .
<i>rcorf69</i>	65	similar a riorf100 en pRi1724, similar al gen <i>ardC</i> en pSa (plásmido IncW) COG4227, probable proteína conjugal de transferencia (proteína anti-restricción).
<i>rcorf70</i>	66	similar a riorf101 en pRi1724, similar a <i>mII9093</i> aspartato 1-descarboxilasa [<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099] y el gen <i>pgi</i> en <i>Xanthomonas citri</i> , COG0853 [H] Aspartato 1-descarboxilasa.
<i>rcorf71</i>	67	similar a similar a riorf106 en pRi1724, similar al gen <i>teuB</i> en pRtrCFN299a, COG1879: RbsB; sistema de transporte de azúcar tipo ABC, componente periplásmico [transporte y metabolismo de hidratos de carbono].
<i>rcorf72</i>	68	similar a riorf107 en pRi1724, similar al gen <i>mcpC</i> (gen <i>mcpC</i> en <i>Rhizobium</i>) en <i>Rhizobium leguminosarum</i> , smart00283: MA; dominios similares a la quimiotaxis aceptora de metilo (transductor sensorial de la quimiotaxis).
<i>rcorf73</i>	171	similar a <i>AGR_pTi_225</i> nucleasa [<i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58], COG1525 [L] Homólogos de nucleasa microcócica (termonucleasa).
<i>rcorf74</i>	140	probable gen <i>traG</i> , similar a riorf109 en pRi1724, cd01126: <i>TraG_VirD4</i> ; la familia <i>TraG/TraD/VirD4</i> son proteínas de conjugación bacteriana.

ES 2 543 086 T3

(continuación)

Característica	SINo	Detalles
<i>rcorf75</i>	172	probable gen traD, proteína conjugal de transferencia similar a riorf110 en pRi1724.
<i>rcorf76</i>	139	probable gen traC, procesamiento de ADN conjugal del plásmido Ti, similar a riorf111 en pRi1724.
<i>rcorf77</i>	69	probable gen traA, similar a riorf112 en pRi1724, COG0507: RecD; exoDNasa dependiente de ATP (exonucleasa V), subunidad alfa - miembro I de la superfamilia helicasa [replicación, recombinación y reparación de ADN].
<i>rcorf78</i>	173	Probable gen traF, similar a riorf113 en Ri1724, COG4959: TraF; ruta secretora tipo IV, proteasa TraF [modificación postraduccional, renovación de proteínas, chaperonas / tráfico y secreción Intracelular].
<i>rcorf79</i>	70	probable gen traB, similar a riorf114 en pRi1724.
<i>rcorf80</i>	71	similar a riorf115 en pRi1724, una proteína hipotética de Agrobacterium rhizogenes (cepa: MAFF03-01724)
<i>rcorf81</i>	174	similar a riorf117 en pRi1724, una proteína hipotética de Agrobacterium rhizogenes (cepa: MAFF03-01724), cd00093: HTH_XRE; proteínas similares a la familia XRE de hélice-giro-hélice.
<i>rcorf82</i>	72	Probable gen traM similar a riorf118 en pRi1724, antagonista de TraR.
<i>rcorf83</i>	152	probable gen traR similar a riorf119 en pRi1724 y traR/AGR pTi 249 en pTiC58.
<i>rcorf84</i>	151	Probable gen trbI similar a riorf120 en pRi1724, pfam03743: TrbI; proteína similar a TrbI de conjugación bacteriana.
<i>rcorf85</i>	150	probable gen trbH similar a riorf121 en pRi1724, sistema de transferencia tipo IV requerido para la conjugación de plásmido Ri/Ti.
<i>rcorf86</i>	149	probable gen trbG similar a riorf122 en pRi1724, sistema de transferencia tipo IV requerido para la conjugación de plásmido Ri/Ti.
<i>rcorf87</i>	148	probable gen trbF similar a riorf123 en pRi1724, sistema de transferencia tipo IV requerido para la conjugación de plásmido Ri/Ti.
<i>rcorf88</i>	147	probable gen trbF similar a riorf123 en pRi1724, sistema de transferencia tipo IV requerido para la conjugación de plásmido Ri/Ti.
<i>rcorf89</i>	146	homólogo del gen trbK similar a riorf125 en pRi1724, sistema de transferencia tipo IV requerido para la conjugación de plásmido Ri/Ti.
<i>rcorf90</i>	175	probable gen trbJ similar a riorf126 en pRi1724, sistema de transferencia tipo IV requerido para la conjugación de plásmido Ri/Ti, COG5314; proteína de transferencia conjugal/exclusión de la entrada [tráfico y secreción intracelular].
<i>rcorf91</i>	145	probable gen trbE similar a riorf127 en pRi1724, sistema de transferencia tipo IV requerido para la conjugación de plásmido Ri/Ti.
<i>rcorf92</i>	176	probable gen trbD similar a riorf128 en pRi1724, sistema de transferencia tipo IV requerido para la conjugación de plásmido Ri/Ti.
<i>rcorf93</i>	144	probable gen trbC similar a riorf129 en pRi1724, sistema de transferencia tipo IV requerido para la conjugación de plásmido Ri/Ti.
<i>rcorf94</i>	143	probable gen trbB similar a riorf130 en pRi1724, sistema de transferencia tipo IV requerido para la conjugación de plásmido Ri/Ti.
<i>rcorf95</i>	142	probable gen tral similar a riorf131 en pRi1724, reguladores de detección de cuórum tipo LuxI, sintetiza 3-oxooctanoilhomoserina lactona, pfam00765: Autoind_synth; Autoinductor sintetasa.

(continuación)

Característica	SINo	Detalles
<i>rcorf96</i>	73	probable gen repA similar a riorf132 <i>Agrobacterium rhizogenes</i> (cepa: MAFF03-01724), cd00550: ArsA_ATPasa; ATPasa de translocalización de oxianiones (ArsA) y cd00592: HTH_MERR; MERR regulador de la transcripción de hélice-giro-hélice, dominio del extremo N.
<i>rcorf97</i>	74	probable gen repB similar a riorf133 en pRi1724, smart00470: ParB; proteína de dominio de nucleasa similar a ParB.
<i>rcorf98</i>	75	probable gen repC similar a riorf134 en pRi1724, esencial para la replicación vegetativa.
<i>rcorf99</i>	76	similar a riorf135 en pRi1724, débilmente similar al gen y4aO en pNGR234a.
<i>rcorf100</i>	156	similar al extremo C de pA 22 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58 (cepa: C58, cepa aislada: Cereon), COG0582 [L] Proteína integrasa.
<i>rcorf101</i>	155	similar al fragmento del extremo N de pA 22 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58 (cepa: C58, cepa aislada: Cereon), COG0582 [L] Proteína integrasa.
<i>rcorf102</i>	154	similar al gen de integrasa hipotética orf2 (similar al gen similar a integrasa de <i>Pseudomonas</i>) en pTiA6NC.
<i>rcorf103</i>	77	similar al gen riorf137 en pRi1724 y el gen orf4 en pTiA6NC.
<i>rcorf104</i>	177	similar a riorf138 en pRi1724 y el gen gvp1 en pHH1, pfam04079: DUF387; proteína de reguladores transcripcionales putativos (similar a Ypuh).
<i>rcorf105</i>	78	similar a riorf139 en pRi1724, similar a la región sin caracterizar entre los genes y4jF y y4jG en pNGR234a.
<i>rcorf106</i>	79	similar riorf140 en pRi1724 y al gen orf300 en <i>Escherichia coli</i> , pfam00004: AAA; familia de ATPasa asociada a diversas actividades celulares (AAA).
<i>rcorf107</i>	80	similar al extremo N de riorf141 en pRi1724, una proteína hipotética.
<i>rcorf108</i>	178	similar al extremo C de riorf141 en pRi1724, una proteína hipotética.
<i>rcorf109</i>	81	débilmente similar a SERP1653 <i>Staphylococcus epidermidis</i> RP62A (cepa: RP62A), una proteína hipotética.
<i>rcorf110</i>	82	similar a riorf142 en pRi1724, similar al gen para el exón 6 de la proteína de unión luminal en <i>Arabidopsis thaliana</i> .
<i>rcorf111</i>	83	similar a riorf143 en pRi1724 y al gen spdB3 en pSG5.
<i>rcorf112</i>	84	similar a riorf144 en pRi1724.
<i>rcorf113</i>	179	débil similar durante 79 aa a blr8180 de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110 (cepa: USDA 110), COG1760 [E] L-serina desaminasa.
<i>rcorf114</i>	85	gen virF putativo, similar a riorf146 en pRi1724 y riorf133 en pTiSAKURA.
<i>rcorf115</i>	159	similar a riorf147 en pRi1724 y el gen y4mC en homólogo de pNGR234a, un gen inducido por vir.
<i>rcorf116</i>	158	probable proteína de captación de potasio, similar a Atu0711 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58 y riorf148 en pRi1724 y al gen kup, pfam02705: K_trans; proteína transportadora de potasio K ⁺ .
<i>rcorf117</i>	86	similar a riorf149 en pRi1724, similar al extremo N. aatA (atu2196) aspartato aminotransferasa A [<i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58].
<i>rcorf118</i>	180	similar a riorf150 en pRi1724, gen aatA en homólogo de <i>Rhizobium leguminosarum</i> , pseudogén hipotético que se divide por desplazamiento del marco.

ES 2 543 086 T3

(continuación)

Característica	SINo	Detalles
<i>rcorf119</i>	87	probable virH, similar a riorf151 en pRi1724, oxidasa tipo citocromo P450, probablemente proteína secretada tipo IV mediante virB/D4.
<i>rcorf120</i>	88	probable virA, similar a riorf152 en pRi1724, receptor en el sistema regulador virA/G de dos componentes.
<i>rcorf121</i>	89	probable virB1, similar a riorf153 en pRi1724, sistema de secreción tipo IV requerido para la transferencia del complejo T.
<i>rcorf122</i>	181	probable virB2, similar a riorf154 en pRi1724, sistema de secreción tipo IV requerido para la transferencia del complejo T.
<i>rcorf123</i>	90	probable virB3, similar a riorf155 en pRi1724, sistema de secreción tipo IV requerido para la transferencia del complejo T.
<i>rcorf124</i>	182	probable virB4, similar a riorf156 en pRi1724, sistema de secreción tipo IV requerido para la transferencia del complejo T.
<i>rcorf125</i>	91	probable virB5, similar a riorf157 en pRi1724, sistema de secreción tipo IV requerido para la transferencia del complejo T.
<i>rcorf126</i>	92	probable virB6, similar a riorf158 en pRi1724, sistema de secreción tipo IV requerido para la transferencia del complejo T.
<i>rcorf127</i>	93	probable virB7, similar a riorf159 en pRi1724, sistema de secreción tipo IV requerido para la transferencia del complejo T.
<i>rcorf128</i>	183	probable virB8, similar a riorf160 en pRi1724, sistema de secreción tipo IV requerido para la transferencia del complejo T.
<i>rcorf129</i>	94	probable virB9, similar a riorf161 en pRi1724, sistema de secreción tipo IV requerido para la transferencia del complejo T.
<i>rcorf130</i>	184	probable virB10, similar a riorf162 en pRi1724, sistema de secreción tipo IV requerido para la transferencia del complejo T.
<i>rcorf131</i>	95	probable virB11, similar a riorf163 en pRi1724, sistema de secreción tipo IV requerido para la transferencia del complejo T.
<i>rcorf132</i>	96	probable virG, similar a riorf164 en pRi1724, activador en el sistema regulador virA/G de dos componentes.
<i>rcorf133</i>	97	proteína hipotética, similar a aa1-103 de ISBm1 transposasa orfB [Brucella suis 1330] (NP 697552).
<i>rcorf134</i>	163	proteína hipotética, similar a aa4-122/142 de ISBm1 transposasa orfA [Brucella suis 1330] (NP 697551).
<i>rcorf135</i>	162	probable virC2, similar a riorf165 en pRi1724, proteína regulada por virulencia virA/G del procesamiento de ADN-T.
<i>rcorf136</i>	161	probable virC1, similar a riorf166 en pRi1724, proteína regulada por virulencia virA/G, AGR_pTi_18p; VirC1; se une a secuencia multiplicadora adyacente a el límite derecho de ADN-T; aumenta el nivel de procesamiento de ADN-T.
<i>rcorf137</i>	98	probable virD1, similar a riorf167 en pRi1724, una proteína accesoria de endonucleasa del límite de ADN-T regulada por virA/G.
<i>rcorf138</i>	99	probable virD2, similar a riorf168 en pRi1724, la endonucleasa del límite de ADN-T regulada por virA/G.
<i>rcorf139</i>	185	probable virD3, similar a riorf169 en pRi1724, regulada por virA/G, no requerida para virulencia, posible factor de variedad de huéspedes.

(continuación)

Característica	SINO	Detalles
<i>rcorf140</i>	100	probable virD4, similar a riorf170 en pRi1724, componente regulado por virA/G del sistema de secreción tipo IV virB/D4.
<i>rcorf141</i>	186	probable virD5, similar a riorf171 en pRi1724, componente regulado por virA/G del sistema de secreción tipo IV virB/D4.
<i>rcorf142</i>	101	probable virF, similar a riorf172 en pRi1724, y menos similar a riorf133 en pTi-SAKURA, una proteína de secreción de tipo IV mediante el complejo de virB/D4.
<i>rcorf143</i>	102	probable virE3, similar a riorf173 en pRi1724 y virE3 en pRiA6NC, interacciona con virE2 y IMPA1 (AtKAP-alfa) en <i>A. tumefaciens</i> , proteína secretada de tipo IV de virB/D4.
<i>rcorf144</i>	103	similar a <i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099 mlr1626, manosa-6-fosfato isomerasa predicha.
<i>rcorf145</i>	104	similar a integrasa de fago
<i>rcorf146</i>	187	similar a Y4rB <i>Rhizobium</i> sp. NGR234.

REFERENCIAS

Las referencias enumeradas a continuación y todas las referencias citadas en el presente documento se incorporan en el presente documento por referencia hasta el punto que complementan, explican, proporcionan un antecedente para o enseñan metodología, técnicas y/o composiciones empleadas en el presente documento.

- 5 1. Abler y col. (1993) *Plant Mol Biol* 22:1031-1038.
2. Atanassova y col. (1992) *Plant J* 2(3): 291-300.
3. Altschul y col. (1997) *Nucl. Acids Res.* 1997 25: 3389-3402.
4. Ausubel y col. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience
- 10 5. Baerson and Lamppa (1993) *Plant Mol Biol* 22(2):255-67
6. Baker y col. (1987) *EMBO J* 6: 1547-1554
7. Baumlein y col. (1992) *Plant J* 2(2):233-239;
8. Baumlein y col. (1991a) *Mol Gen Genet* 225(3):459-467
9. Baumlein y col. (1991 b) *Mol Gen Genet* 225:121-128
- 15 10. Belarmino y col. (2000) *Plant Cell. Rep.* 19:435-442.
11. Benfey y col. (1989) *EMBO J.* 8:2195-2202
12. Berger and Kimmel (1987) *Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology*, Vol.152, Academic Press, hic., San Diego, CA (Berger)
13. Bevan y col. (1984) *Nucl Acid Res* 12,8711-8720
- 20 14. Binding (1985) *Regeneration of Plants, Plant Protoplasts*, pp. 21-73, CRC Press, Boca Raton
15. Bruce y col. (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* 86:9692-9696
16. Bush and Pueppke (1991) *Appl. Environ. Microbiol.* 57(9): 2468-2472
17. Bustos y col. (1989) *Plant Cell* 1(9):839-53
18. Byrne y col. (1987) *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 8: 3-15
- 25 19. Chen and Winans (1991) *J. Bacteriol.* 173: 1139-1144
20. Chilton (1977) *Cell* 11 :263-271
21. Chilton y col. (1982) *Nature* 295: 432-434.
22. Cho y col. (2000) *Planta* 210: 195-204
23. Choi y col. (1995) *Mol Gen Genet* 246:266-268
- 30 24. Christensen y col. (1989) *Plant Mol. Biol.* 12: 619-632
25. Christensen y col. (1992) *Plant Mol Biol* 18:675-689
26. Christou (1995) *Euphytica* 85: 13-27.
27. Chui y col. (1996) *Curr Biol* 6:325-330.
28. Clough and Bent (1998) *Plant J.* 16, 735-743.
- 35 29. Comai y col. (1990) *Plant Mol Biol* 15:373-381
30. Combard et al (1987) *Plasmid* 18, 70-75
31. Conceicao y col. (1994) *Plant* 5:493-505
32. Costantino y col. (1980) *Gene* 11(1-2):79-87.
33. Cushman y col. (2000) *Curr Opin Plant Biol* 3(2):117-24
- 40 34. Dale and Ow (1991) *Proc Nat'l Acad Sci USA* 88:10558-10562
35. Dandekar y col. (1989) *J Tissue Cult Meth* 12:145
36. Dasgupta y col. (1993) *Gene* 133: 301-302

37. de Block y col. (1987) EMBO J 6:2513-2518
38. de Bruijn y col. (1996) Rep-PCR Genomic Fingerprinting of Plant-Associated Bacteria and Computer-Assisted Phylogenetic Analyses In: Biology of Plant-Microbe Interaction; Proceedings of the 8th International Congress of Molecular Plant-Microbe Interactions (G. Stacey, B. Mullin and P. Gresshoff, Eds.) APS Press, 497-502
- 5 39. De Cleene and De Layk (1976) Bot. Rev. 42 (4): 389-466
40. de Framond y col. (1983) Bio/Technol. 1: 262-269
41. Deikman y col. (1988) EMBO J 7:3315-3320
42. Deikman y col. (1992) Plant Physiol 100:2013-2017
43. Dellaporta y col. (1988) In: Chromosome Structure and Function: Impact of New Concepts, 18th Stadler Genetics Symposium, 11:263-282
- 10 44. Dunwell (2000) J Exp Bot 51 Spec No:487-96
45. Eady y col. (2000) Plant Cell. Rep. 19: 376-381.
46. Ebinuma y col. (2000a) Proc Natl Acad Sci USA 94:2117-2121
47. Ebinuma y col. (2000b) Selection of Marker-free transgenic plants using the oncogenes (ipt, rol A, B, C) of Agrobacterium as selectable markers, In Molecular Biology of Woody Plants. Kluwer Academic Publishers
- 15 48. Eichholtz y col. (1987) Somatic Cell and Molecular Genetics 13, 67-76
49. EP-A1 0 120 516
50. EP-A1 0 270 615
- 20 51. EP-A1 0 333 033
52. EP-A1 0 335 528
53. EP-A1 0 375 091
54. EP-A1 0 388 186
55. EP-A1 0 409 625
56. EP-A1 0 807 836
- 25 57. Ermayanti y col. (1994) Phytochemistry 36: 313-317.
58. Evans y col. (1983) Protoplasts Isolation and Culture, Handbook of Plant Cell Culture, pp. 124176, Macmillan Publishing Company, New York
59. Farrand y col. (2003) Int. J. Systematic & Evolutionary Microbiology 53:1681-1687
60. Fedoroff and Smith (1993) Plant J 3:273- 289
- 30 61. Fiedler y col. (1995) Biotechnology (NY) 13(10):1090-1093.
62. Fire y col. (1998) Nature 391:806-811
63. Fraley y col. (1983) Proc Natl Acad Sci USA 80:4803
64. Franck y col. (1980) Cell 21:285-294
65. Fu and Dooner (2000) Genome Research 10:866-873.
- 35 66. Gallie y col. (1987) Nucl Acids Res 15:8693-8711
67. Gardner y col. (1986) Plant Mol Biol 6:221-228
68. Gatz y col. (1991) Mol Gen Genetics 227:229-237
69. Gatz y col. (1994) Mol Gen Genetics 243:32-38
70. Gatz y col. (1997) Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 48:89-108
- 40 71. Gelvin y col. (Eds) (1990) Plant Molecular Biology Manual; Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands
72. Gelvin (2003) Microbiol Mol Biol Rev 67(1): 16-37
73. N° de acceso de GenBank AP002086
74. N° de acceso de GenBank J02798
- 45 75. N° de acceso de GenBank J05212
76. N° de acceso de GenBank L05934
77. N° de acceso de GenBank M63985
78. N° de acceso de GenBank U09118
79. N° de acceso de GenBank U09119
- 50 80. N° de acceso de GenBank U38846, nucleótidos 3862 a 5325 o incluso 5342
81. N° de acceso de GenBank U93215
82. N° de acceso de GenBank X03677
83. N° de acceso de GenBank Z17657
84. Gleave y col. (1999) Plant Mol Biol. 40(2):223-35
- 55 85. Goodner y col. (2001) Science 294:2323-2328.
86. Goodner y col. (1999) J. Bacteriol. 181:5160-5166.
87. Gruber y col. (1993) "Vectors for Plant Transformation" in METHODS IN PLANT MOLECULAR BIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY; pp.89-119.
88. Guerrero y col. (1993) Mol Gen Genet 224:161-168
- 60 89. Hadi y col. (1996) Plant Cell Reports 15:500-505
90. Hajdukiewicz y col. (1994) Plant Mol Biol 25:989-994
91. Hamill y col. (1991) Plant Cell. Rep. 10: 221-224
92. Hansen y col. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:7603-7607
93. Haseloff y col. (1997) Proc Natl Acad Sci USA 94(6):2122-2127
- 65 94. Hayford y col. (1988) Plant Physiol. 86:1216
95. Hernalsteens y col. (1980) Nature 287:654-656

96. Hershey y col. (1991) *Mol Gen Genetics* 227:229-237
 97. Hiei y col. (1994) *Plant J* 6: 271-282
 98. Hildebrand (1934) *J Agric Res* 48: 857-885
 99. Hille y col. (1986) *Plant Mol. Biol.* 7:171 (1986)
 5 100. Hoekema (1985) In: *The Binary Plant Vector System*, Offsetdrukkerij Kanters B.V., Al-blaserdam, Chapter V
 101. Hoekema y col. (1983) *Nature* 303:179-181
 102. Holsters y col. (1978) *Mol Gen Genet* 163:181-187
 103. Holtorf y col. (1995) *Plant Mol Biol* 29:637-649
 10 104. Hood y col. (1986) *J. Bacteriol* 168:1291-1301
 105. Hood y col. (1993) *Transgenic Res.* 2: 208-218,
 106. Hood y col., (1986) *J. Bacteriol.* 168(3): 1283-1290
 107. Hood y col. (1987) *Plant Physiol.* 83: 529-534
 108. Horsch y col. (1985) *Science* 227: 1229-1231
 15 109. Huang and Madan (1999) *Genome Research*, 9: 868-877
 110. Huffman y col. (1984) *J Bacteriol.* 157(1):269-76
 111. Ishida y col. (1996) *Nature Biotech* 745-750
 112. Jahne y col. (1995). *Euphytica* 85: 35-44
 113. Jefferson (1987b) *Plant Mol. Bio. Rep.*, 5:387-405
 20 114. Jefferson y col. (1987) *EMBO J* 6:3901-3907
 115. Jones y col. (1987) *Mol. Gen. Genet.* 210:86
 116. Joos y col. (1983) *Cell* 32: 1057-1067
 117. Joseffson y col. (1987) *J Biol Chem* 262:12196-12201
 118. Jouanin (1984) *Plasmid* 12:91-102
 25 119. Jouanin (1986) *Plasmid* 6:124-1 34
 120. Kado (1991) *Crit Rev Plant Sci* 10:1
 121. Keane y col. (1970) *Aust. J. Biol. Sci.* 23:585-595
 122. Klee y col. (1987) *Ann Rev Plant Physiol* 38:467-486
 123. Komari y col. (1996) *The Plant Journal* 10(1):165-174
 30 124. Koncz and Schell (1986) *Mol Gen Genet* 204:383-396
 125. Koprek y col. (1999) *Plant J* 19(6): 719-726
 126. Kosugi y col. (1990) *Plant Sci* 70:133-140
 127. Kouchi et al (1999) *Plant J* 18(2) 121-129
 128. Lahners (1984) *Plasmid* 11:130-140
 35 129. Lam and Chua (1991) *J Biol Chem* 266(26):17131 -17135
 130. Lam y col. (1984) *Plant Sci. Lett.* 34:345-352
 131. Last y col. (1991) *Theor. Appl. Genet.* 81, 581-588
 132. Lawson y col. (1994) *Mol Gen Genet* 245:608-615
 133. Lee y col. (1994) *Plant Mol Biol* 26:1981-1987
 40 134. Leffel y col. (1997) *Biotechniques.* 23(5):912-8
 135. Lepetit y col. (1992) *Mol. Gen. Genet.* 231: 276-285
 136. Lincoln y col. (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* 84:2793-2797
 137. Ling y col. (1998) *Plant Cell Reports* 17: 843-847
 138. Llob y col. (2003) *Europ J Plant Pathol* 109:381-389
 45 139. Lohmer y col. (1993) *Plant Cell* 5:65-73
 140. Ludwig y col. (1990) *Science* 247:449
 141. Lysnik y col. (1993) *NAR* 21:969-975
 142. Maniatis T, Fritsch EF and Sambrook J (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY)
 50 143. Margulies y col. (2005) *Nature* (advanced online publication) doi: 10.1038/nature03959.
 144. Matzke and Chilton (1981) *J. Mol. Appl. Genet.* 1: 39-49
 145. Matzke y col. (2000) *Plant Mol Biol* 43:401-415
 146. McCormick y col. (1986) *Plant Cell Reports*, 5: 81-84
 147. McElroy y col. (1990) *Plant Cell* 2: 163171
 55 148. McGranahan y col. (1990) *Plant Cell Rep* 8:512
 149. Melchers y col. (2000) *Curr Opin Plant Biol* 3(2):147-52
 150. Mett y col. *PNAS* 90: 4567-4571 (1993)
 151. Miki y col. (1993) "Procedures for Introducing Foreign DNA into Plants" in *METHODS IN PLANT MOLECULAR BIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY*; pp. 67-88
 60 152. Millar y col. (1992) *Plant Mol Biol Rep* 10:324-414
 153. Mol y col. (1990) *FEBS Lett* 268(2):427-430
 154. Moloney y col. (1989) *Plant Cell Reports* 8: 238
 155. Moore y col. (1979) *Plasmid* 2(4):617-26.
 156. Mozo and Hooykaas (1991) *Plant Mol. Biol.* 16:917-918.
 65 157. Murai y col. (1983) *Science* 23: 476-482
 158. Murashige and Skoog (1962) *Physiol. Plant.* 15, 472-497. (472/473)

159. Naested (1999) *Plant J* 18:571-576
 160. Narayanan y col. (1999) *Crop Sci* 39:1680-1686;
 161. Nester (1984) *Ann Rev Plant Physiol* 35:387-413
 162. Nilsson and Olsson (1997) *Phys. Plantarum* 100, 463-473
 5 163. Odell y col. (1985) *Nature* 313:810-812
 164. Odell y col. (1990) *Mol Gen Genet* 223:369-378
 165. Olhoft and Somers (2001) *Plants Cell Reports* 20:706-711
 166. Otten y col. (1984) *Mol. Gen. Genet.* 195:159-163
 167. Ow y col. (1986) *Science* 234:856-859
 10 168. Peralto and Ream (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*
 169. Perera y col. (1993) *Plant Mol. Biol* 23(4): 793-799
 170. Prasher y col. (1985) *Biochem Biophys Res Commun* 126(3):1259-1268
 171. Rande-Gil y col. (1995) *Yeast* 11:1233-1240
 172. Reichel y col. (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* 93(12):5888-5893
 15 173. Rouster y col. (1998) *Plant J* 15:435-440
 174. Saijo y col. (2000) *Plant J* 23(3): 319-327
 175. Saitou y col. (1987) *Mol Biol. Evol* 4: 406-425
 176. Sakamoto y col. (2000) *J Exp Bot* 51(342):81-8
 177. Sambrook y col. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press; ISBN 0-87969-309-6
 20 178. Sanger y col. (1977) *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5463-5467
 179. Sauer (1998) *Methods* 14(4):381-92
 180. Sawada y col. (1993) *International Journal of Systematic Bacteriology* 43(4):694-702.
 181. Scheeren-Groot y col. (1994) *J. Bacteriol* 176: 6418-6426
 182. Schena y col. (1991) *Proc Nat'l Acad Sci USA* 88:10421
 25 183. Schenborn and Groskreutz (1999) *Mol Biotechnol* 13(1):29-44
 184. Schlaman and Hooykaas (1997) *Plant J* 11:1377-1385
 185. Schoffl y col. (1989) *Molecular & General Genetics* 217(2-3):246-53
 186. Sengupta-Gopalan y col. (1985) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82: 3320-3324 (1985)
 187. Shah y col. (1986) *Science* 233: 478
 30 188. Shaw y col. (1984) *Nucleic Acids Res.*, 12: 6031-6041
 189. Sheehy y col. (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 8805-8809
 190. Sheen y col. (1995) *Plant J* 8(5):777-784;
 191. Sheridan y col. (1996) *Genetics* 142:1009-1020
 192. Shewmaker y col. (1985) *Virology* 140:281-288
 35 193. Shirsat y col. (1989) *Mol Gen Genet* 215(2):326-331
 194. Silhavy y col. (1984) *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY)
 195. Simpson y col. (1985) *EMBO J* 4:2723-2729
 196. Simpson y col. (1986) *Plant Molecular Biology* 6:403-415
 40 197. Sjodahl y col. (1995) *Planta* 197:264-271
 198. Slightom (1986) *J Biol Chem* 261 :108-121
 199. Smith and Hood (1995) *Crop Sci.* 35(2): 301-309
 200. Smith and Townsend (1907) *Science* 25:671-673
 201. Stalberg y col. (1996) *Planta* 199:515-519
 45 202. Stockhaus y col. (1989) *EMBO J* 8(9):2445-2451
 203. Stougaard (1993) *Plant J* 3:755-761
 204. Sun and Callis (1997) *Plant J* 11(5): 1017-1027
 205. Sundaresan y col. (1995) *Gene Develop* 9:1797-1810
 206. Suzuki (2001) *Gene. Jan* 24;263(1-2):49-58
 50 207. Svab y col. (1990) *Plant Mol. Biol.* 14:197
 208. Taylor y col. (1985) *Mol Gen Genet* 201:554-557
 209. Tepfer (1984) *Cell* 37:959-967
 210. Tepfer (1953) The biology of generic transformation of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*. In: Puhler (ed) *Molecular Genetics of the Bacteria-Plant Interaction*, pp. 248-258
 55 211. *The Maize Handbook*, Chapter 116, Freeling and Walbot, Eds., Springer, New York (1994)
 212. Tian y col. (1997) *Plant Cell Rep* 16:267-271;
 213. Tighe y col. (2000) *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50:787-801.
 214. Timko y col. (1985) *Nature* 318: 579-582
 215. Trick y col. (1997) *Plant Tiss Cult Biotech* 3:90
 60 216. Twell y col. (1983) *Sex. Plant Reprod.* 6: 217-224
 217. Twell y col. (1989b) *Mol Gen Genet* 217:240-245
 218. Urao y col. (1996) *Plant Mol Biol* 32:571-576
 219. US 4.801.340
 220. US 4.962.028
 65 221. US 4.975.374
 222. US 4.940.838

223. US 5.106.739
 224. US 5.187.267
 225. US 5.225.341
 226. US 5.352.605
 5 227. US 5.416.011
 228. US 5.463.175
 229. US 5.504.200
 230. US 5.565.350
 231. US 5.608.152
 10 232. US 5.633.435
 233. US 5.683.439
 234. Van Laerebeke y col. (1974) Nature 252,169-170
 235. van Wordragen y col. (1992) Plant Mol. Biol. Rep. 10: 12-36
 236. Vanden Elzen y col. (1985) Plant Mol Biol. 5:299
 15 237. Vasil y col. (1984) Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol I, II, and III, Laboratory Procedures and Their Applications, Academic Press
 238. Velten y col. (1984) EMBO J. 3(12): 2723-2730
 239. Vernade y col. (1988) J. Bacteriol. 170: 5822-5829
 240. Vilaine y col. (Mol Gen Genet (1987) 206:17-23)
 20 241. Vinuesa y col. (1998) Appl. Envir. Microbiol. 64:2096-2104
 242. Wader y col. (1987) in TOMATO TECHNOLOGY 189-198 (Alan R. Liss, Inc.)
 243. Wang y col. (1984) Cell 38: 455-462,
 244. Wang y col. (1987) Mol. Gen. Genet. 210: 338-346
 245. Ward y col. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366
 25 246. Waterhouse y col. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95:13959-64
 247. Watson y col. (1985) EMBO J 4(2):277- 284
 248. Weissbach and Weissbach (1989) Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press
 249. White and Nester. (1980) J Bacteriol. 144(2):710-20
 250. White (1982) Proc Natl Acad Sci USA 79:3193-3197
 30 251. White (1983) Nature 301:348-350
 252. White (1985) J Bacteriol 164:33-44
 253. White y col. (1980) J. Bacteriol. 141:1134-1141
 254. Willmitzer (1982) Mol Gen Genet 186:16-22
 255. Wilmink y col. (1992) Plant Cell Rep 11:76-80
 35 256. Wilmink y col. (1992) Plant Cell Rep. 11:76-80
 257. Wirawan IGP and M Kojima (1996) Biosci. Biotechnol. Biochem. 60:50-53
 258. WO 00/15815
 259. WO 00/26388
 40 260. WO 00/44895;
 261. WO 00/44914
 262. WO 00/49035;
 263. WO 00/58484
 264. WO 00/63364
 265. WO 00/68374;
 45 266. WO 02/00900
 267. WO 03/060133
 268. WO 03/08596
 269. WO 84/02913
 270. WO 91/13980
 50 271. WO 91/13991
 272. WO 92/16635
 273. WO 93/01294
 274. WO 93/07278
 275. WO 93/21334
 55 276. WO 93/21334
 277. WO 94/02620
 278. WO 94/21794
 279. WO 95/15389
 280. WO 95/19443
 60 281. WO 95/23230
 282. WO 96/12814
 283. WO 97/41228;
 284. WO 98/18940
 285. WO 98/22593
 65 286. WO 98/45456
 287. WO 98/45461

288. WO 99/16890
289. WO 99/32619
290. WO 99/53050;
5 291. WO 00/26388
292. WO 84/02913
293. WO 92/16635
294. WO 95/15389
295. Yadav y col. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:6322-6326
296. Yeo y col. (2000) Mol Cells 10(3):263-8
10 297. Young y col. (2001) Int. J. Sys. Evol. Microbiol. 51:89-103.
298. Young y col. (2003) Int. J. Systematic & Evolutionary Microbiology 51:89-103.
299. Zambryski (1992) Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol. 43: 465-490,
300. Zambryski y col. (1983) EMBO J. 2(12): 2143-2150,
301. Zupan and Zambryski (1995) Plant Physiol. 107: 1041-1047
15 302. Zupan y col. (2000) Plant J 23(1):11-28

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para producir una célula de planta transgénica que comprende las etapas de:

- 5 a) proporcionar bacterias de una variante de cepa no patógena transgénica de la cepa K599 de *Agrobacterium* (NCPBB 2659) que es una bacteria patógena de las plantas transmitida por la tierra caracterizada por una secuencia intergénica de ARNr 16S-23S que comprende al menos un motivo de secuencia seleccionado del grupo que consiste en los motivos de secuencia descritos por SEC ID N°: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14, en el que dicha variante de cepa es capaz de infectar células vegetales, pero carece de propiedades inductoras del fenotipo de raíces pilosas y en el que dicha variante de cepa comprende además una variante de plásmido no patógeno del plásmido Ri pRi2659 y un ADN-T transgénico, y
- 10 b) co-cultivar una célula de planta con dichas bacterias, y
- c) aislar o seleccionar células vegetales que comprenden establemente integrado en su genoma dicho ADN-T transgénico,

15 en el que dicha variante de cepa no patógena es capaz de infectar células vegetales, para mediar en la transferencia de ADN-T en células vegetales, y para mediar en la inserción de ADN-T en el genoma de la planta, pero carece de propiedades inductoras del fenotipo de raíces pilosas y en el que la variante de plásmido no patógeno comprende al menos una secuencia que tiene una identidad de secuencias de al menos el 90 % con una secuencia como se describe por SEC ID N°: 24.

2. Un procedimiento para producir una planta transgénica que comprende las etapas de:

- 20 a) proporcionar bacterias de una variante de cepa no patógena, transgénica de la cepa K599 de *Agrobacterium* (NCPBB 2659) que es una bacteria patógena de las plantas transmitida por la tierra, caracterizada por una secuencia intergénica de ARNr 16S-23S que comprende al menos un motivo de secuencia seleccionado del grupo que consiste en los motivos de secuencia descritos por SEC ID N°: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14, en el que dicha variante de cepa es capaz de infectar células vegetales, pero carece de propiedades inductoras del fenotipo de raíces pilosas y en el que dicha variante de cepa comprende además una variante de plásmido no patógeno del plásmido Ri pRi2659 y un ADN-T transgénico, y
- 25 b) co-cultivar una planta, célula de planta o tejido de planta con dichas bacterias, y
- c) aislar o seleccionar y, opcionalmente, regenerar plantas que comprenden establemente integrado en su genoma dicho ADN-T transgénico,

30 en el que dicha variante de cepa no patógena es capaz de infectar células vegetales, para mediar en la transferencia de ADN-T en células vegetales, y para mediar en la inserción de ADN-T en el genoma de la planta, pero carece de propiedades inductoras del fenotipo de raíces pilosas y en el que la variante de plásmido no patógeno comprende al menos una secuencia que tiene una identidad de secuencias de al menos el 90 % con una secuencia como se describe por SEC ID N°: 24.

35 3. El procedimiento de cualquiera de la reivindicación 1 o 2, en el que dicha célula de planta, tejido de planta o planta se deriva de una planta seleccionada del grupo de plantas monocotiledóneas, plantas dicotiledóneas y plantas gimnospermas.

40 4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que dicha planta es de un género seleccionado del grupo que consiste en *Medicago*, *Lycopersicon*, *Brassica*, *Cucumis*, *Solanum*, *Juglans*, *Gossypium*, *Malus*, *Vitis*, *Antirrhinum*, *Populus*, *Fragaria*, *Arabidopsis*, *Picea*, *Capsicum*, *Chenopodium*, *Dendranthema*, *Pharbitis*, *Pinus*, *Pisum*, *Oryza*, *Zea*, *Triticum*, *Triticale*, *Secale*, *Lolium*, *Hordeum*, *Glycine*, *Pseudotsuga*, *Kalanchoe*, *Beta*, *Helianthus* y *Nicotiana*.

5. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho ADN-T transgénico comprende al menos un gen marcador de selección expresable en planta.

45 6. Una variante de plásmido no patógeno de pRi2659, proporcionando dicha variante de plásmido las funciones requeridas para la infección y transformación de la célula de planta y que tiene una homología de al menos el 90 % con el ADN que codifica el plásmido pRi2659 nativo (como está comprendido en la cepa K599 de *Agrobacterium* (NCPBB2659)), pero que carece de secuencias que provocan el fenotipo de raíces pilosas, y en la que el ADN-T entero correspondiente a la secuencia descrita por la secuencia de aproximadamente la base 538 a aproximadamente la base 15.519 de SEC ID N°: 4, que incluye los límites, está delecionado y el ADN-T delecionado.

7. Una célula u organismo no humano que comprende una variante de plásmido no patógeno de la reivindicación 6.

50 8. La célula u organismo no humano de la reivindicación 7, en el que dicha célula u organismo está seleccionado del grupo que consiste en bacterias, levaduras, plantas, mamíferos e insectos.

9. La célula u organismo no humano de la reivindicación 7 u 8, en el que dicha célula u organismo es una bacteria transmitida por la tierra del género *Rhizobiaceae*.

- 5 10. Una variante de cepa no patógena de la cepa K599 de *Agrobacterium* (NCPBP 2659), que es una bacteria patógena de las plantas transmitida por la tierra, caracterizada por una secuencia intergénica de ARNr 16S-23S que comprende al menos un motivo de secuencia seleccionado del grupo que consiste en los motivos de secuencia descritos por SEC ID N°: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14, en la que dicha variante de cepa es capaz de infectar células vegetales, pero carece de propiedades inductoras del fenotipo de raíces pilosas, que comprende una variante de plásmido no patógeno del plásmido Ri pRi2659, que comprende al menos una secuencia que tiene una identidad de secuencias de al menos el 90 % con una secuencia como se describe por SEC ID N°: 24.
- 10 11. Una variante de cepa no patógena transgénica de la cepa K599 de *Agrobacterium* (NCPBP 2659), que es una bacteria patógena de las plantas transmitida por la tierra, caracterizada por una secuencia intergénica de ARNr 16S-23S que comprende al menos un motivo de secuencia seleccionado del grupo que consiste en los motivos de secuencia descritos por SEC ID N°: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14, en la que dicha variante de cepa es capaz de infectar células vegetales, pero carece de propiedades inductoras del fenotipo de raíces pilosas, y en la que dicha variante de cepa comprende además una variante de plásmido no patógeno del plásmido Ri pRi2659 que comprende al menos una secuencia que tiene una identidad de secuencias de al menos el 90 % con una secuencia como se describe por SEC ID N°: 24 y que comprende un ADN-T transgénico.
- 15 12. La variante de cepa no patógena de cualquiera de la reivindicación 10 u 11, en la que dicha variante de cepa no patógena es capaz de infectar células vegetales, para mediar en la transferencia de ADN-T en células vegetales, y para mediar en la inserción de ADN-T en el genoma de la planta, pero carece de propiedades inductoras del fenotipo de raíces pilosas.
- 20 13. La variante de cepa no patógena de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en la que la variante de plásmido no patógeno se define como en la reivindicación 6.
14. La variante de cepa no patógena de cualquiera de las reivindicaciones 10 o 13, que comprende además una o más características seleccionadas del grupo que consiste en la presencia de genes *virA* o *virG* mutantes o quiméricos o la presencia de plásmidos super-virulentos.

25

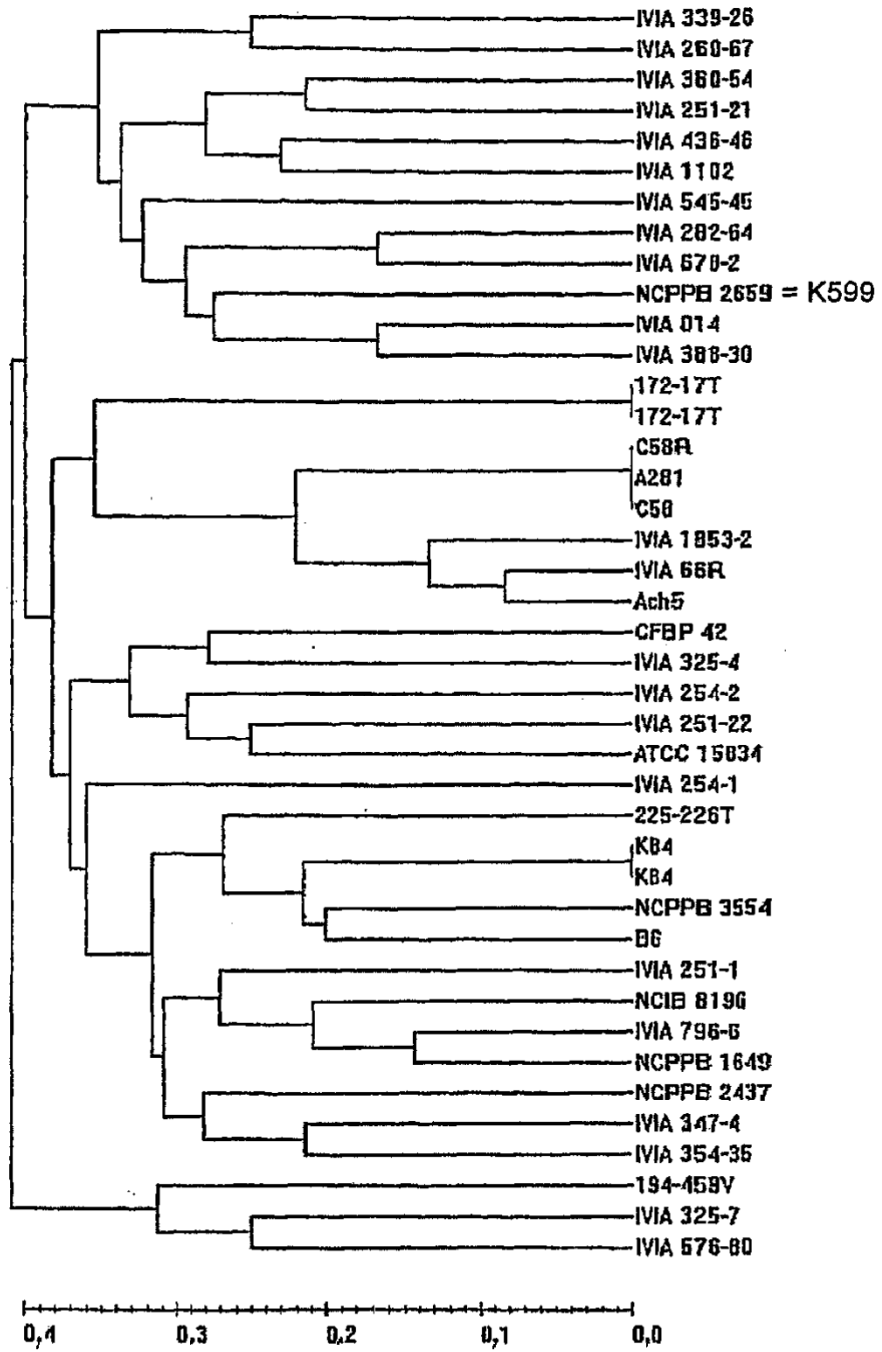


Fig. 1A

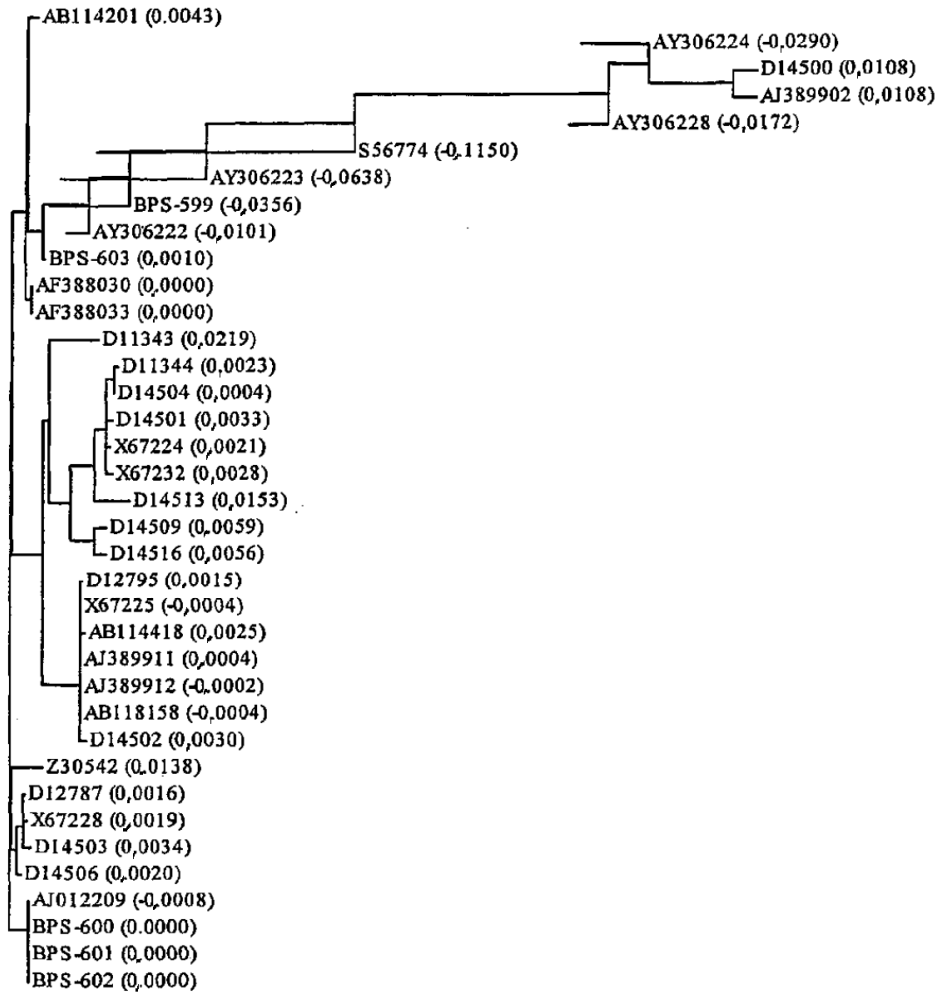
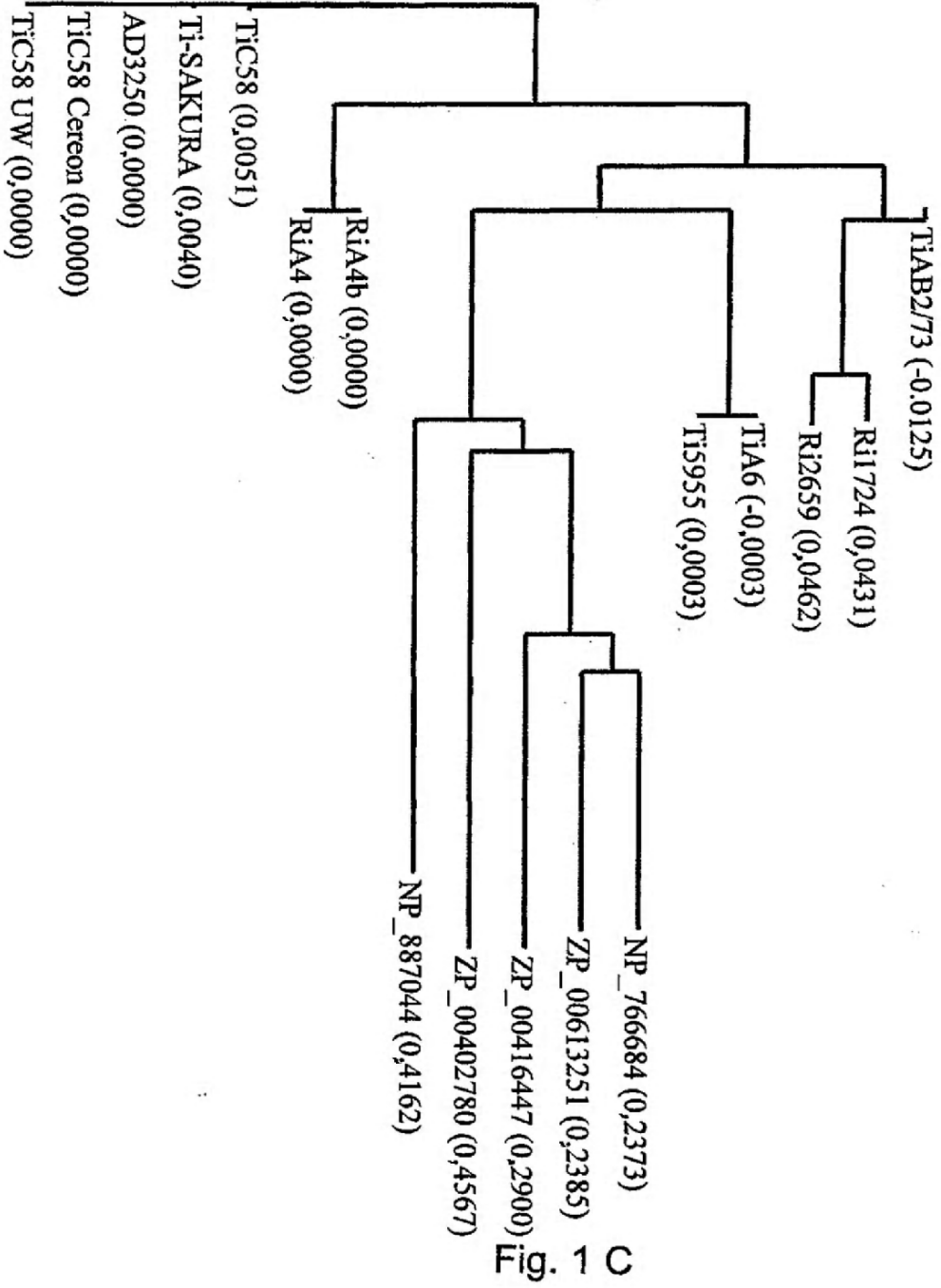


Fig. 1B



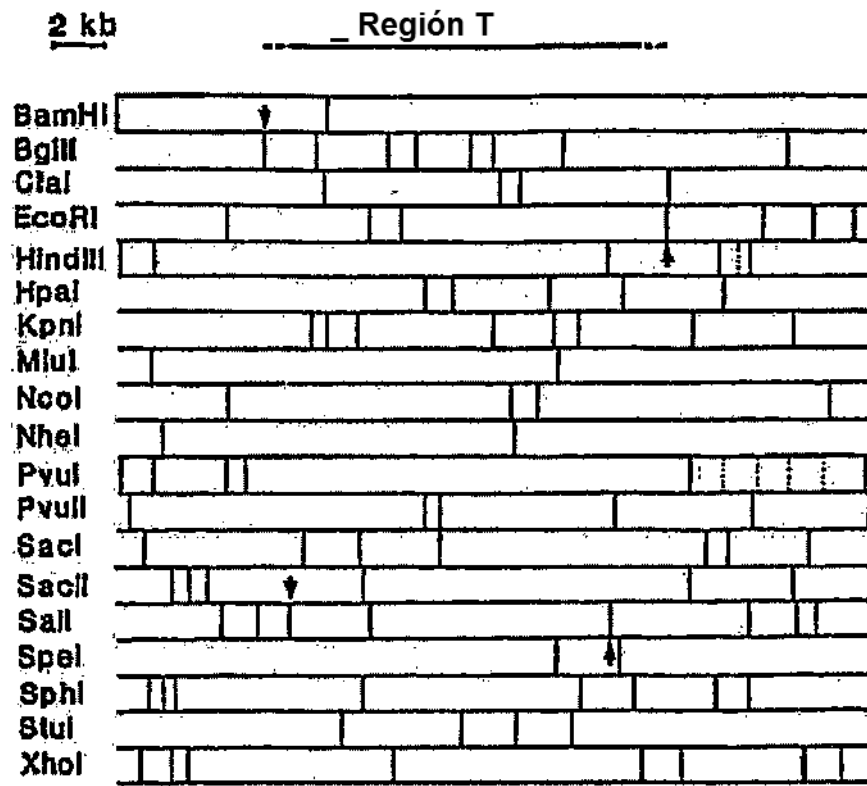


Fig. 2

I



AGL1

II



SHA016

Fig. 3

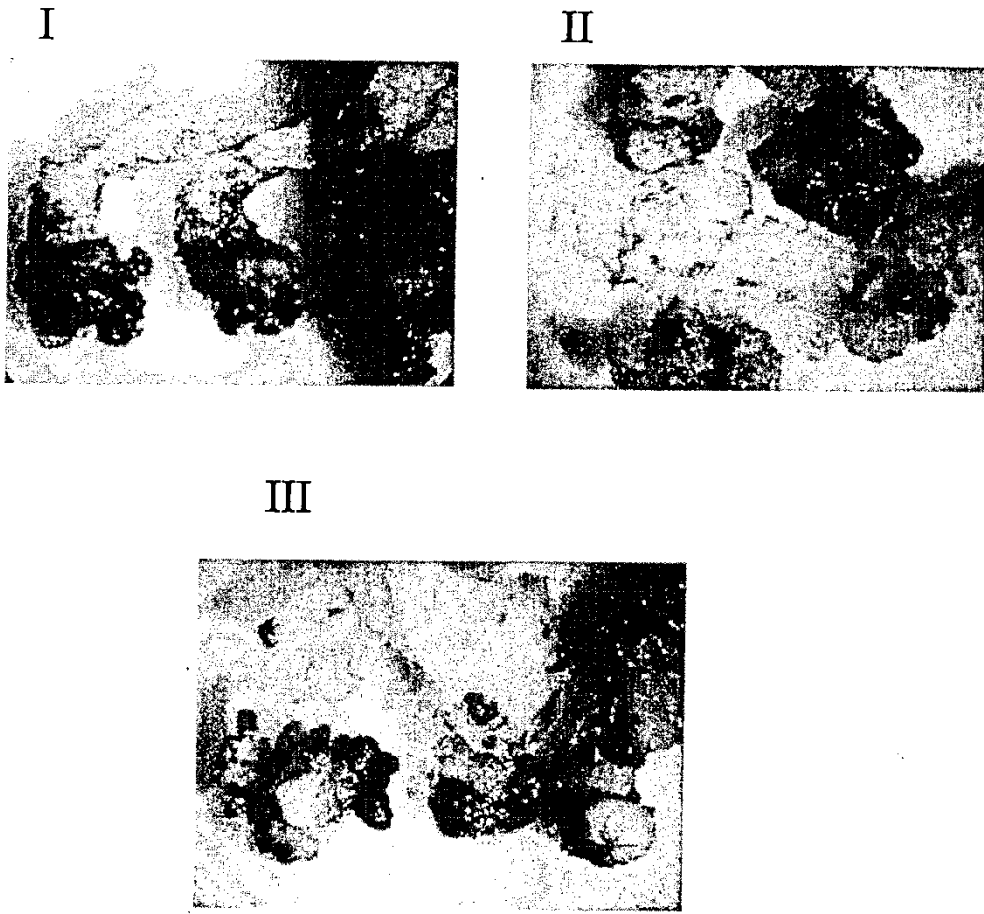


Fig. 4

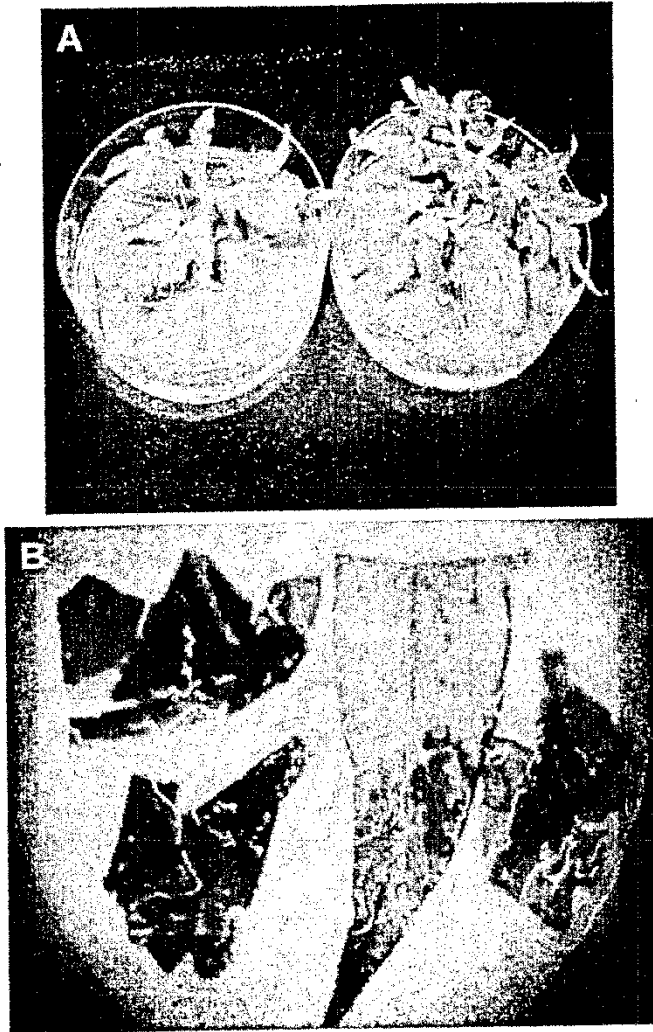


Fig. 5

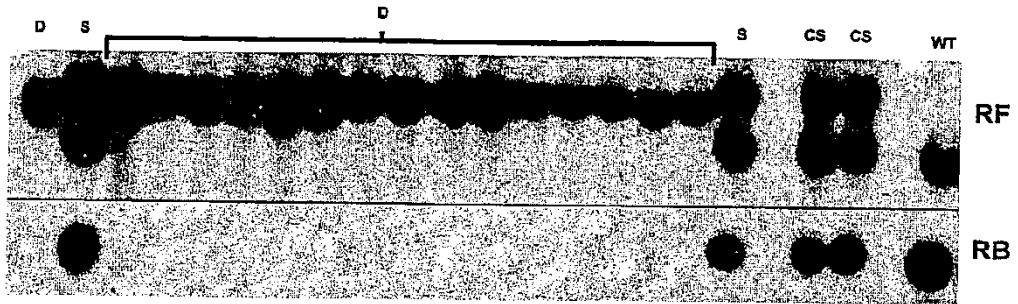


Fig. 6

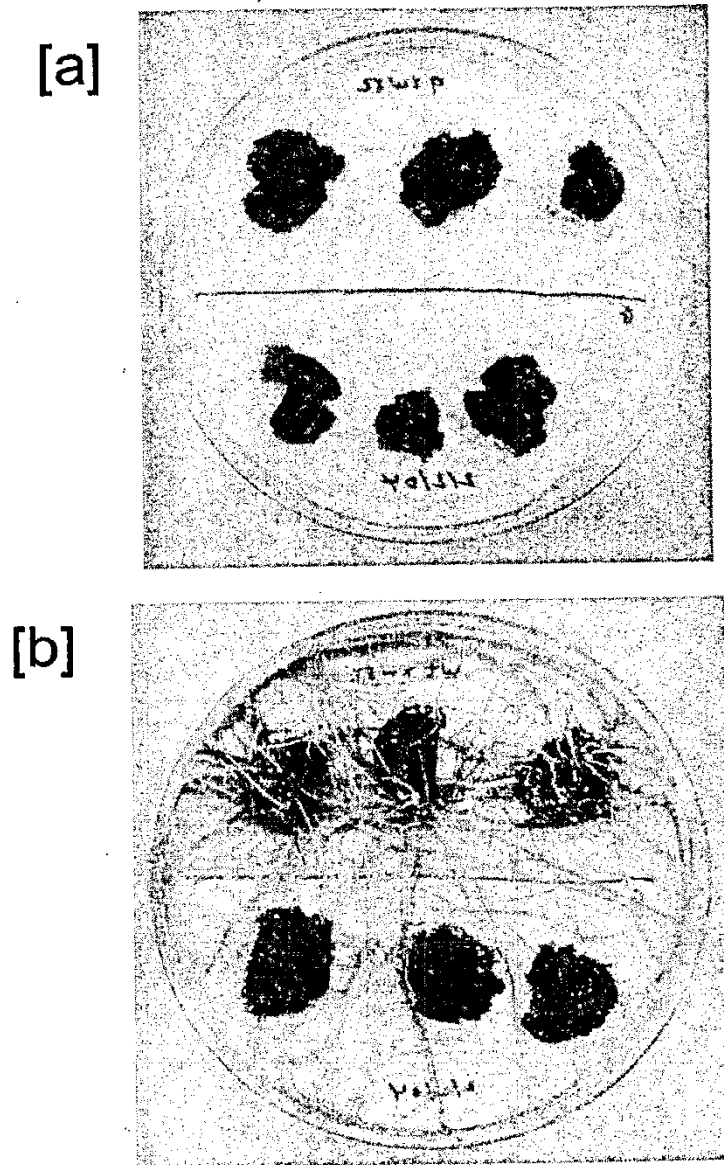


Fig. 7

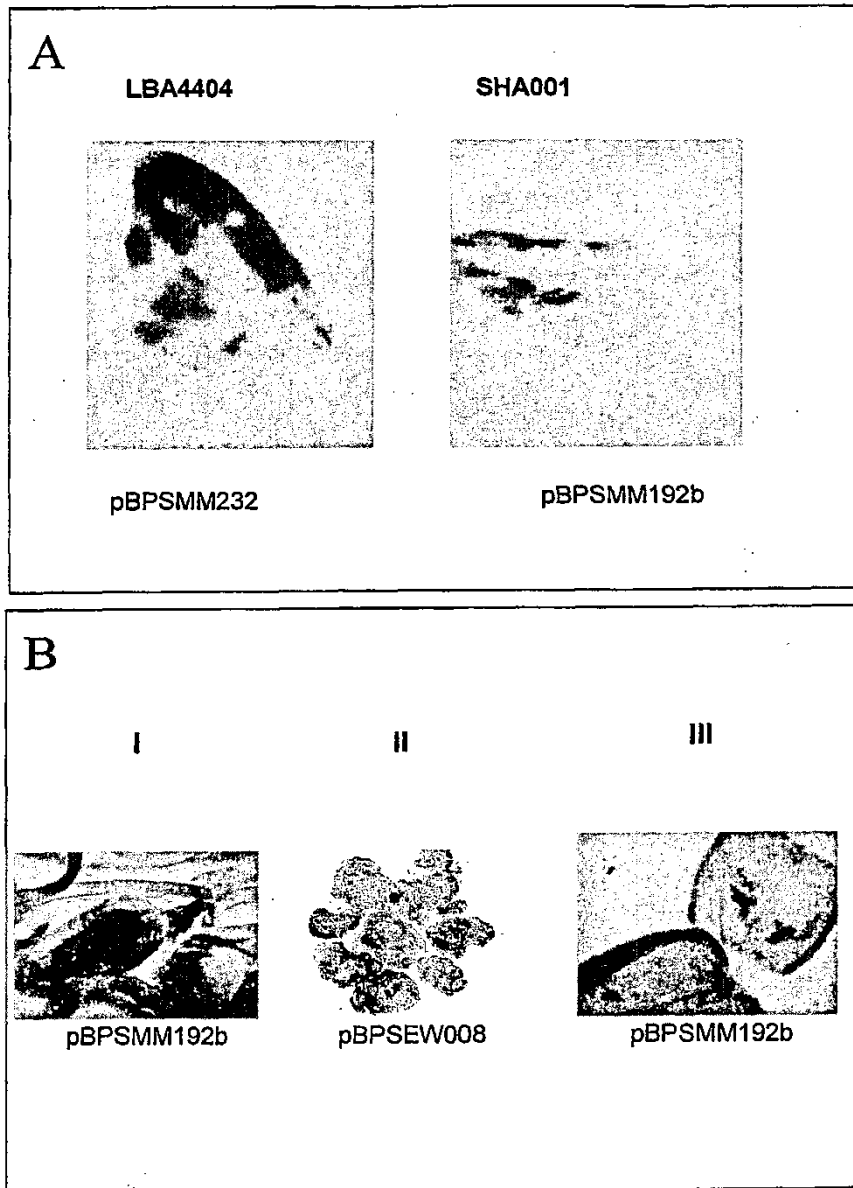


Fig. 8

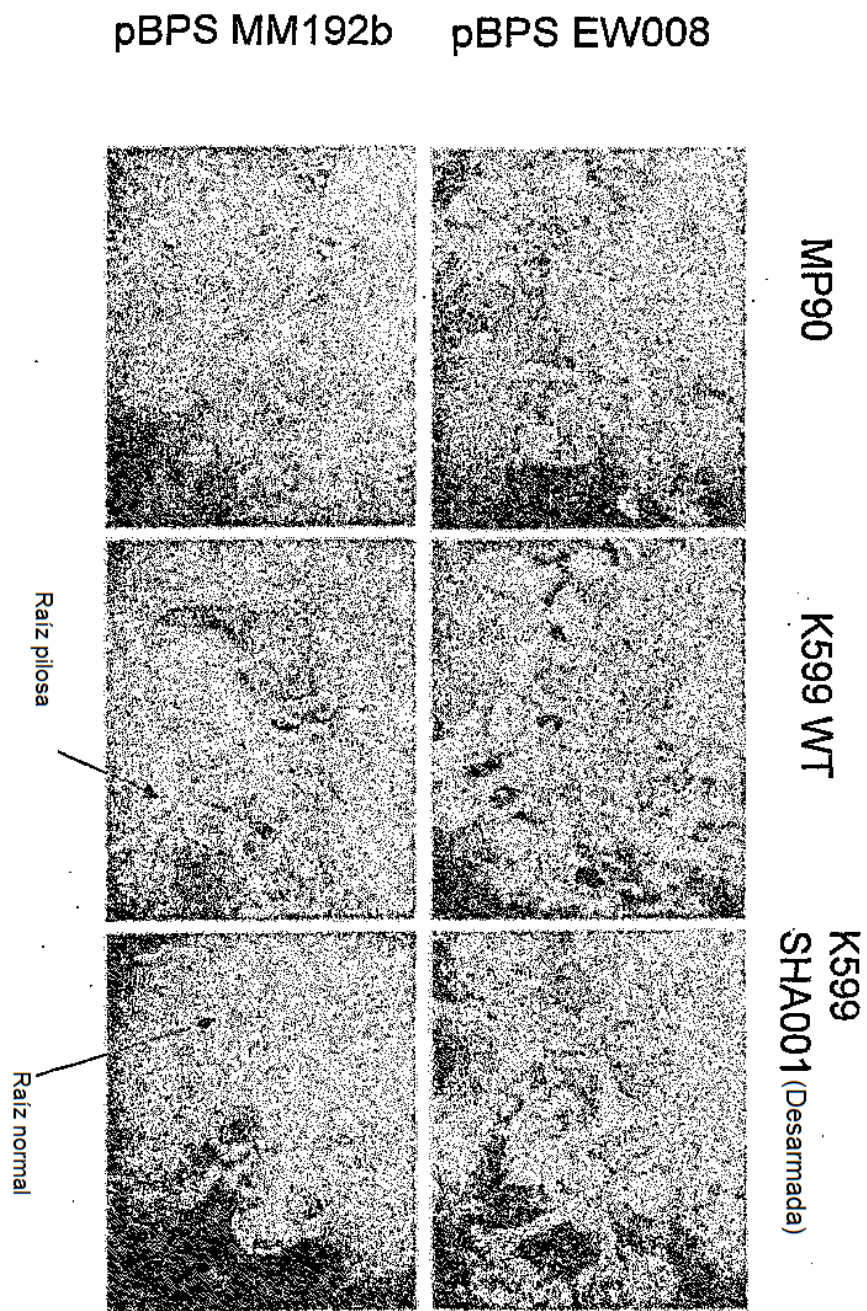


Fig. 9

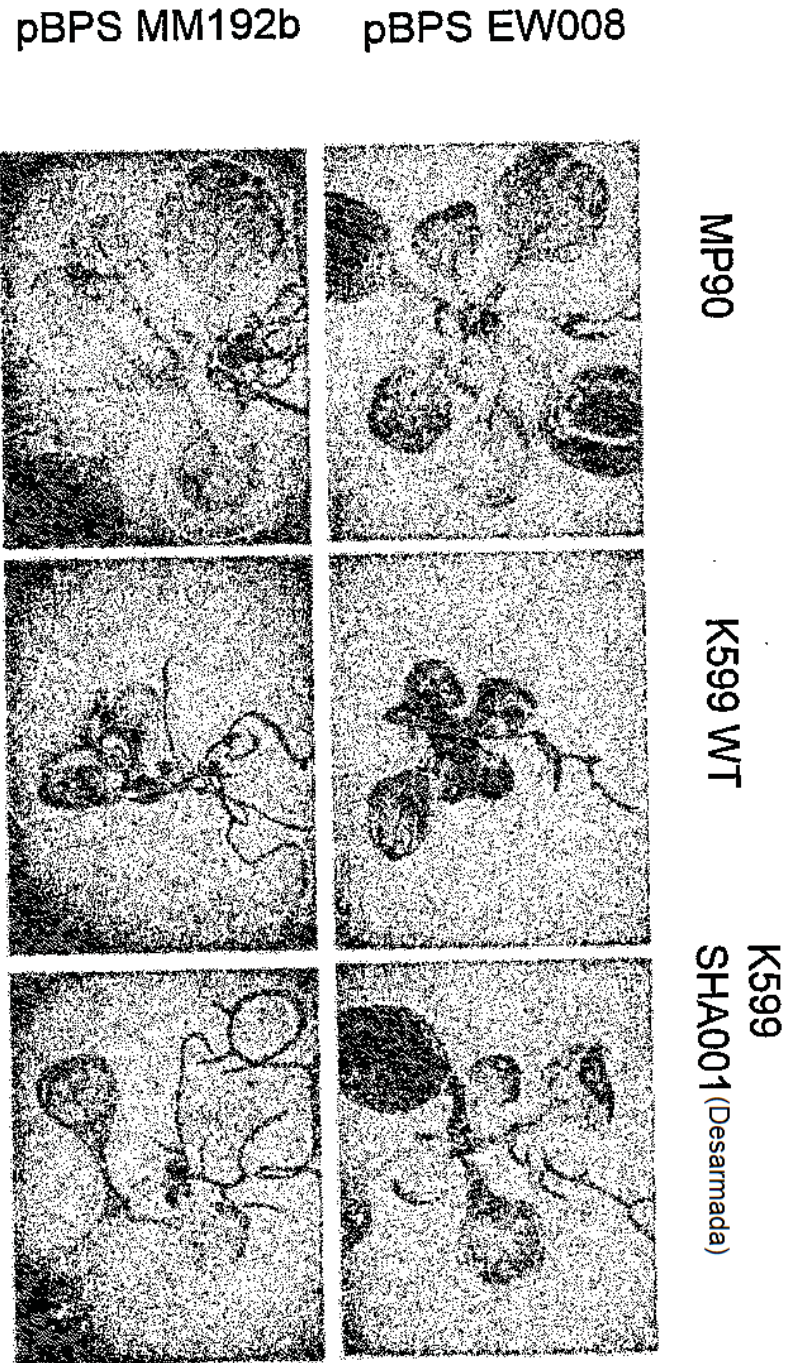


Fig. 10

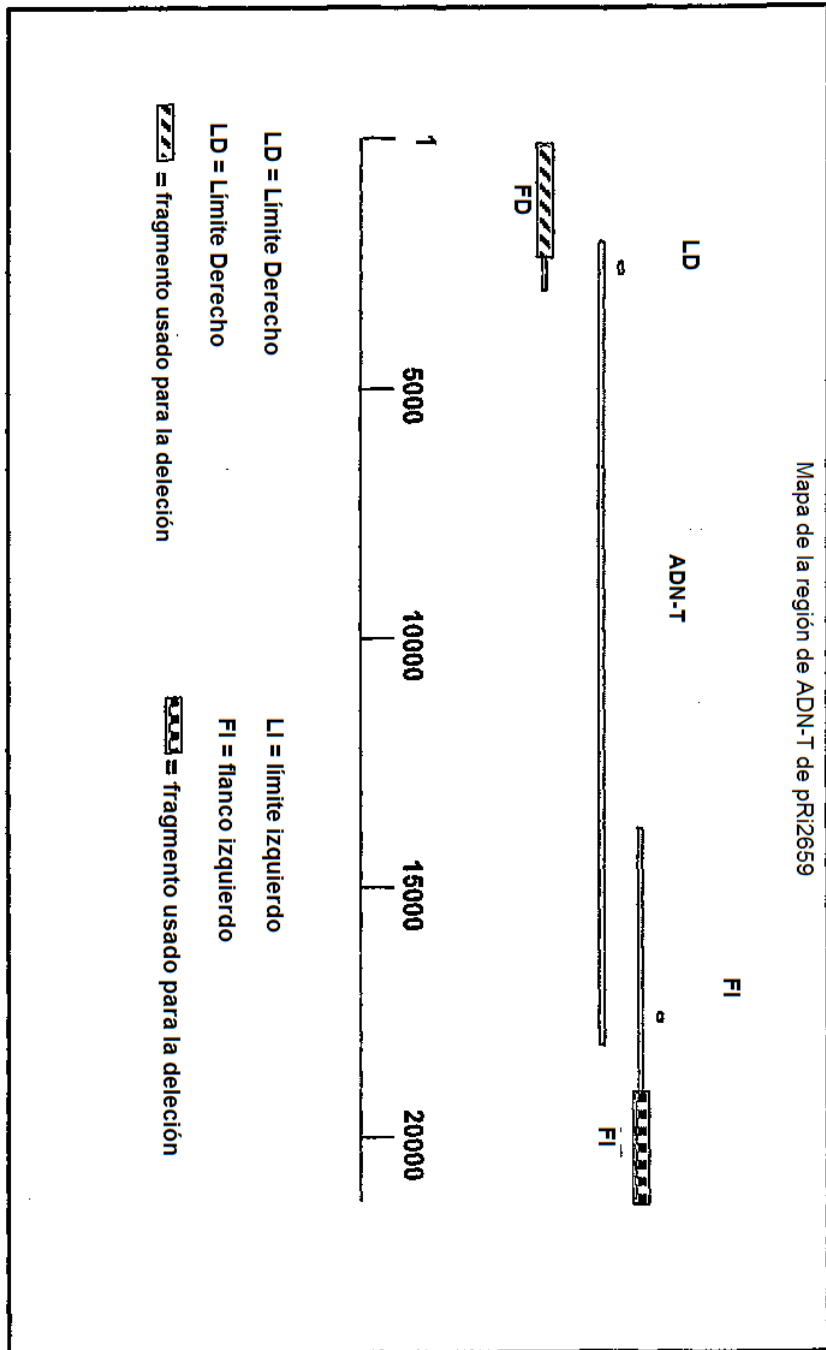


Fig. 11

Construcción de casetes de delección

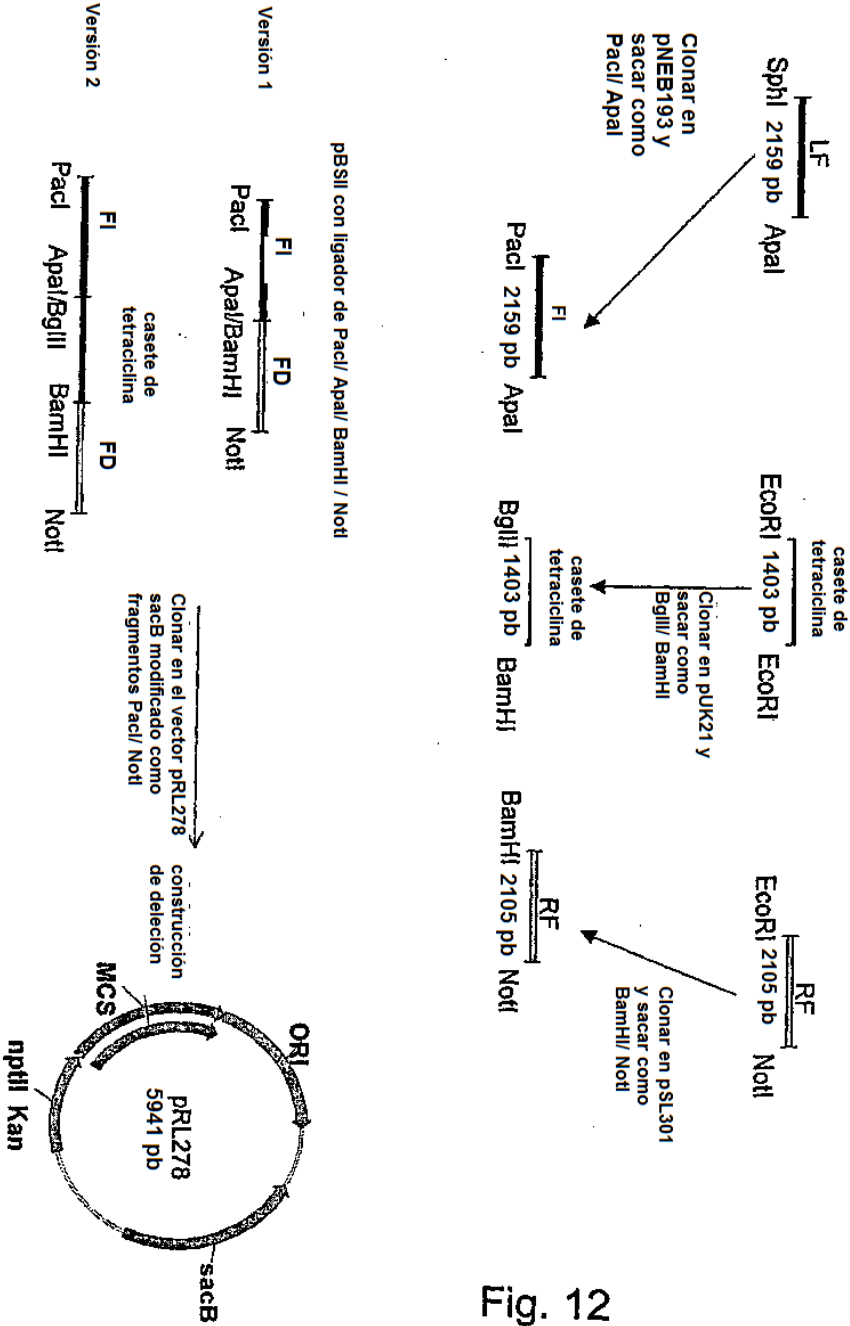


Fig. 12

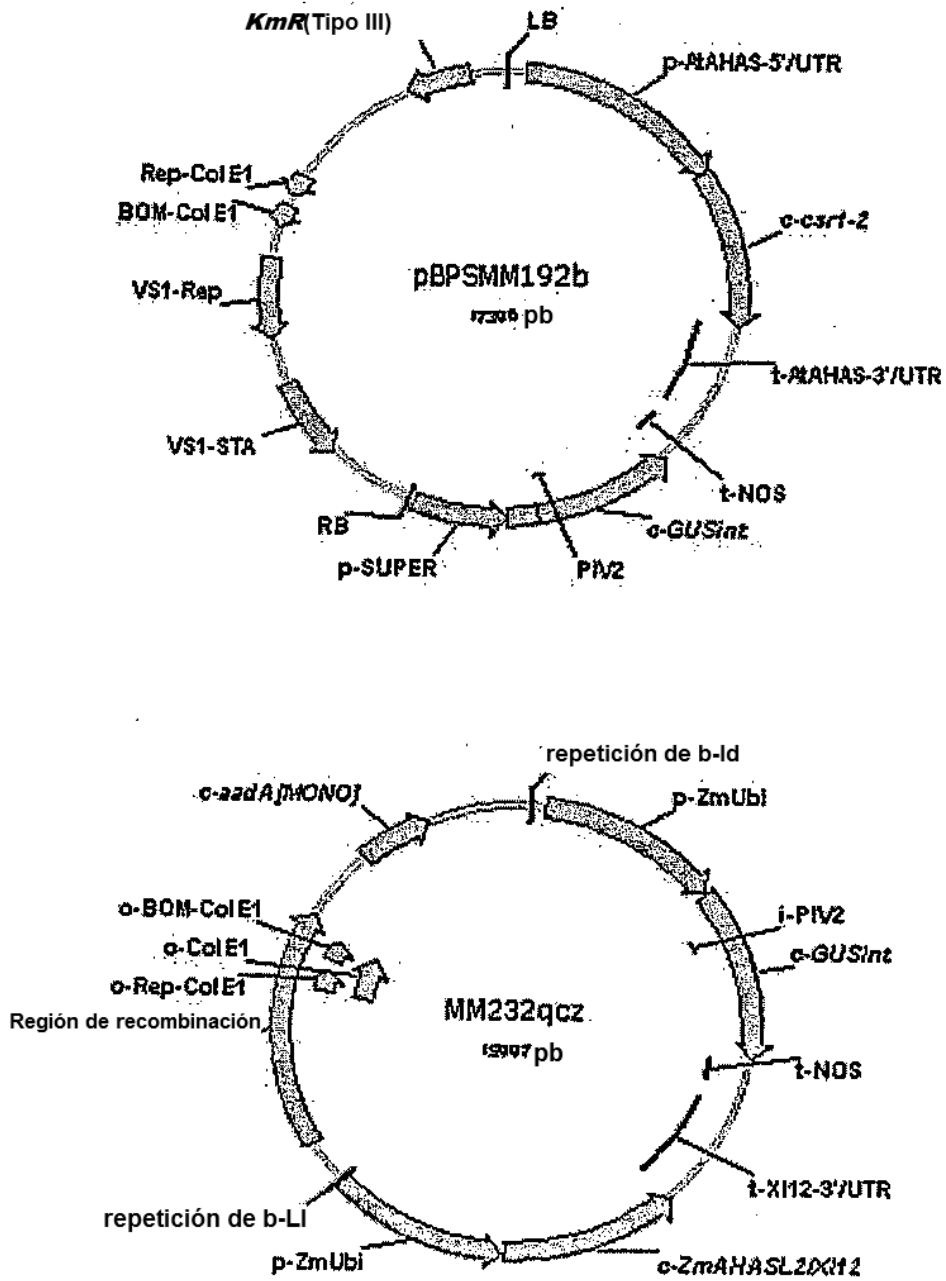


Fig. 13A

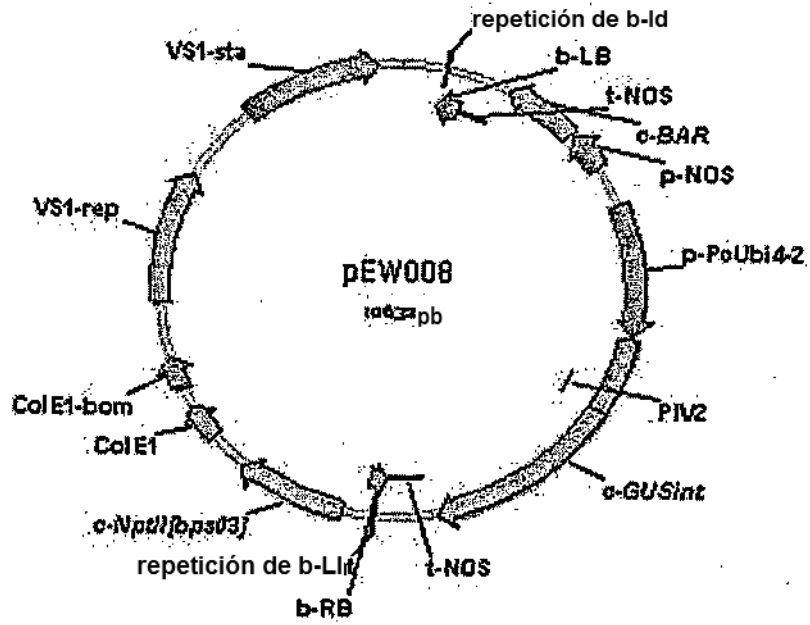


Fig. 13B

ES 2 543 086 T3

	1	M1			50
K599_23S	AATGAGGGTT	TGG..GTT.G	AGACTAATCG	T.....CGA	TGCGAATTG.
AE008980#2	AGCGTGGGGT	CGGTAGTTCG	AGCTACCCG	GGCCCACCAT	TGGTTTTTGA
AE009348#2	AGCGTGGGGT	CGGTAGTTCG	AGCTACCCG	GGCCCACCAT	TGGTTTTTGA
AE008265	AGCGTGGGGT	CGGTAGTTCG	AGCTACCCG	GGCCCACCAT	TGGTTTTTGA
AE007948#2	AGCGTGGGGT	CGGTAGTTCG	AGCTACCCG	GGCCCACCAT	TGGTTTTTGA
AE009201	AGCGTGGGGT	CGGTAGTTCG	AGCTACCCG	GGCCCACCAT	TGGTTTTTGA
U45329	...TGGCG	TTG.AGCTGG	TGATTGATTG	G.....TG	TGGAATAATG.
AB102735#2	AATGAGGGTT	TGG..GTT.G	AGACTGTTGG	T.....TGA	TGCGAATTG.
	51				100
K599_23S	..TTGCCGC.	.GCCTGGTTG	ATGA..GACC	T.GGGTGATC	GAGCTGGATG
AE008980#2	ATTTCCTGA	TCCCTGGCGG	TTAT..GCTG	TCGGGTGTTT	GCGATGGTTG
AE009348#2	ATTTCCTGA	TCCCTGGCGG	TTAT..GCTG	TCGGGTGTTT	GCGATGGTTG
AE008265	ATTTCCTGA	TCCCTGGCGG	TTAT..GCTG	TCGGGTGTTT	GCGATGGTTG
AE007948#2	ATTTCCTGA	TCCCTGGCGG	TTAT..GCTG	TCGGGTGTTT	GCGATGGTTG
AE009201	ATTTCCTGA	TCCCTGGCGG	TTAT..GCTG	TCGGGTGTTT	GCGATGGTTG
U45329	..TTGCCGA.	.GCTGAAGG	TTTACGGATC	TTGGGTGATC	GAGCTGGATG
AB102735#2	..TTGCCGC.	.GCCTGGTTG	ATGA..GACC	T.GGGTGATC	GAGCTGGATG
	101				150
K599_23S	GGGCTGTAGC	TCAGCTGGGA	GAGCACCTGC	TTTGCAAGCA	GGGGGTCCAGC
AE008980#2	GGGCTGTAGC	TCAGCTGGGA	GAGCACCTGC	TTTGCAAGCA	GGGGGTCCAGC
AE009348#2	GGGCTGTAGC	TCAGCTGGGA	GAGCACCTGC	TTTGCAAGCA	GGGGGTCCAGC
AE008265	GGGCTGTAGC	TCAGCTGGGA	GAGCACCTGC	TTTGCAAGCA	GGGGGTCCAGC
AE007948#2	GGGCTGTAGC	TCAGCTGGGA	GAGCACCTGC	TTTGCAAGCA	GGGGGTCCAGC
AE009201	GGGCTGTAGC	TCAGCTGGGA	GAGCACCTGC	TTTGCAAGCA	GGGGGTCCAGC
U45329	GGGCTGTAGC	TCAGCTGGGA	GAGCACCTGC	TTTGCAAGCA	GGGGGTCCAGC
AB102735#2	GGGCTGTAGC	TCAGCTGGGA	GAGCACCTGC	TTTGCAAGCA	GGGGGTCCAGC
	151	M2			200
K599_23S	GGTTCGATCC	CGCTCAGCTC	CACCAATTG.TT	
AE008980#2	GGTTCGATCC	CGCTCAGCTC	CACCAATCGC	GGAACCGGAT	TGGTGTGGTT
AE009348#2	GGTTCGATCC	CGCTCAGCTC	CACCAATCGC	GGAACCGGAT	TGGTGTGGTT
AE008265	GGTTCGATCC	CGCTCAGCTC	CACCAATCGC	GGAACCGGAT	TGGTGTGGTT
AE007948#2	GGTTCGATCC	CGCTCAGCTC	CACCAATCGC	GGAACCGGAT	TGGTGTGGTT
AE009201	GGTTCGATCC	CGCTCAGCTC	CACCAATCGC	GGAACCGGAT	TGGTGTGGTT
U45329	GGTTCGATCC	CGCTCAGCTC	CACCAATTAC	...A.....
AB102735#2	GGTTCGATCC	CGCTCAGCTC	CACCAATTA.T.	
	201	M3			250
K599_23S	TTGTCCTGAC	GCTGTGCGGA	TCTAACGATC	GCTGCGCTCC	GGACGGGCCG
AE008980#2	ATGTGCTGAC	GCTGTGCGGG	CTTTGC...C	GCTGCGCTTC	GCACGGGCCG
AE009348#2	ATGTGCTGAC	GCTGTGCGGG	CTTTGC...C	GCTGCGCTCC	GCACGGGCCG
AE008265	ATGTGCTGAC	GCTGTGCGGG	CTTTGC...C	GCTGCGCTCC	GCACGGGCCG
AE007948#2	ATGTGCTGAC	GCTGTGCGGG	CTTTGC...C	GCTGCGCTTC	GCACGGGCCG
AE009201	ATGTGCTGAC	GCTGTGCGGG	CTTTGC...C	GCTGCGCTTC	GCACGGGCCG
U45329	CTGTCTGAC	GCTGTGCGAG	CTTACGC..T	GCTGCGCTCC	GGACGGGCCG
AB102735#2	TTGCGCTCAC	GGGTGAGCGG	TCCTTCGGAC	.CTACCCTCC	GCGAGGGC.G
	251	M4	M5		300
K599_23S	CGCCACGAGG	CGCGACGGA.	CTATCGTCTT	TTATGGGCGA	ATTGATCTGA
AE008980#2	GCCAATGATG	GCCGACGGCT	CGCTGAGCCT	GCATGGGTGA	TCTGATCGGC
AE009348#2	GCCAATGATG	GCCGACGGC.	CTATCGGCCT	GTATGGGTGG	ATTGATCGGT
AE008265	GCCAATGATG	GCCGACGGC.	CTATCGGCCT	GTATGGGTGG	ATTGATCGGT
AE007948#2	GCCAATGATG	GCCGACGGCT	CGCTGAGCCT	GCATGGGTGA	TCTGATCGGC
AE009201	GCCAATGATG	GCCGACGGCT	CGCTGAGCCT	GCATGGGTGA	TCTGATCGGC
U45329	CGGAACGATC	CGCGTGGTC.	CTTTGGACCT	GTTTGGTGGC	ATA...CGGA
AB102735#2	CCGAACGATC	GGCGACGGC.	CTATCGCGCT	GTACTGGAGA	ATTGATCCGG

Fig. 14A

```

251
K599_23S CGCCACGAGG CGCGACGGA. CTATCGTCCT TTATGGGCGA ATTGATCTGA
AE008980#2 GCCAATGATG GCCGACGGCT CGCTGAGCCT GCATGGGTGA TCTGATCGGC
AE009348#2 GCCAATGATG GCCGACGGC. CTATCGGCCT GTATGGGTGG ATTGATCGGT
AE008265 GCCAATGATG GCCGACGGC. CTATCGGCCT GTATGGGTGG ATTGATCGGT
AE007948#2 GCCAATGATG GCCGACGGCT CGCTGAGCCT GCATGGGTGA TCTGATCGGC
AE009201 GCCAATGATG GCCGACGGCT CGCTGAGCCT GCATGGGTGA TCTGATCGGC
U45329 CGGAACGATC CGCGTGGTC. CTTTGGACCT GTTTGGTGGC ATA...CGGA
AB102735#2 CCGAACGATC GGCACGCG. CTATCGGCCT GTACTGGAGA ATTGATCGGC

301
K599_23S CGGC.....
AE008980#2 AAGCAATACA GCGCGATAGC GCGTCGCCAA GAGTTTGGCG CCCTCACGGA
AE009348#2 AAG.....
AE008265 AAG.....
AE007948#2 AAGCAATACA GCGCGATAGC GCGTCGCCAA GAGTTTGGCG CCCTCACGGA
AE009201 AAGCAATACA GCGCGATAGC GCGTCGCCAA GAGTTTGGCG CCCTCACGGA
U45329 ATT.....
AB102735#2 CTGC.....

351
K599_23S .....TG. ..C..G.... ....AATTGT CTTCTGAAGA AATAA..AAG
AE008980#2 GCGCCTTTGG CGCGTGAGTG CTGGAATATC CTTTGAAGA AA.AA..ACG
AE009348#2 .....TTTG. ....ATATC CTTTGAAGA AATAA..AAG
AE008265 .....TTTG. ....ATATC CTTTGAAGA AATAA..AAG
AE007948#2 GCGCCTTTGG CGCGTGAGTG CTGGAATATC CTTTGAAGA AA.AA..ACG
AE009201 GCGCCTTTGG CGCGTGAGTG CTGGAATATC CTTTGAAGA AA.AA..ACG
U45329 .....TTGT CTTCTGAAGA AAAAAAAGG
AB102735#2 .....TG. ..C..G.... ....AATTGT CTTCTGAAGA AATAA..AAG

M6
401
K599_23S TTTGCATCCT CCTGCTAAGG ATTGATGCCT GTTCTGAATA CATTGTGAAG
AE008980#2 TTTGCATCAT TC.GC.AAGA ATTGATGCCT GTTCTGAATA CATTGTGAAG
AE009348#2 TTTGCATCAT TC.GC.AAGA ATTGATGCCT GTTCTGAATA CATTGTGAAG
AE008265 TTTGCATCAT TC.GC.AAGA ATTGATGCCT GTTCTGAATA CATTGTGAAG
AE007948#2 TTTGCATCAT TC.GC.AAGA ATTGATGCCT GTTCTGAATA CATTGTGAAG
AE009201 TTTGCATCAT TC.GC.AAGA ATTGATGCCT GTTCTGAATA CATTGTGAAG
U45329 TTTGCACCTT TC..TTATGA AC.GGTGCCT GTTCTGG.TA CATTGTGAAG
AB102735#2 TTTGCATCCT TT.GCTAAGA AA.GATGCCT GTTTGGATA CATTGTGAAG

451
K599_23S AGAAGATATG TCTGGAAGCG TCCAGGTGTT TTGGG...TT TAGGCCCGAG
AE008980#2 AGAAGATATG TCTGGAAGCG TCCAGGTGTT TTGGG...TT TAGGCCCGAA
AE009348#2 AGAAGATATG TCTGGAAGCG TCCAGGTGTT TTGGG...TT TAGGCCCGAA
AE008265 AGAAGATATG TCTGGAAGCG TCCAGGTGTT TTGGG...TT TAGGCCCGAA
AE007948#2 AGAAGATATG TCTGGAAGCG TCCAGGTGTT TTGGG...TT TAGGCCCGAA
AE009201 AGAAGATATG TCTGGAAGCG TCCAGGTGTT TTGGG...TT TAGGCCCGAA
U45329 AGAAGATTGA TCTGGAGGCT TCCAGGTATT GTGAG...GG AAACCTTGCG
AB102735#2 AGAAGATATG TCTGGAAGCG TCCAGGTGTT TTGAGCCCTT GTGGTTTGAA

M7
501
K599_23S ACGTCCGAGA CCAATCCCTG TGAAACCGTG TGATGGCTTA GTCGGCCGGA
AE008980#2 ACGTCCGAGA CCAATCCCTG AGAAACCGTG TGATGGCTTA GTCGGCCGGA
AE009348#2 ACGTCCGAGA CCAATCCCTG AGAAACCGTG TGATGGCTTA GTCGGCCGGA
AE008265 ACGTCCGAGA CCAATCCCTG AGAAACCGTG TGATGGCTTA GTCGGCCGGA
AE007948#2 ACGTCCGAGA CCAATCCCTG AGAAACCGTG TGATGGCTTA GTCGGCCGGA
AE009201 ACGTCCGAGA CCAATCCCTG AGAAACCGTG TGATGGCTTA GTCGGCCGGA
U45329 ATGTCCGAGC CCTTCC.TG ATGATCCCTA GGATGGTCTA GCCGACCTGA
AB102735#2 GCGTCCGAGC CCAGTCCCTG AGAAACCGTG TGATGGCTTA GTCGGCCGGA

```

Fig. 14B

						M8	
		551					600
K599_23S	ATTGGTGGAG	GGGTTGGAGG	TAGGAAGGAT	CGCTTGTCCG	G..GGCATT		
AE008980#2	ATTGGTGGAG	GGGTTGGAGG	TAGGAAGGAT	CGCTTGTCCG	A..GGCATT		
AE009348#2	ATTGGTGGAG	GGGTTGGAGG	TAGGAAGGAT	CGCTTGTCCG	A..GGCATT		
AE008265	ATTGGTGGAG	GGGTTGGAGG	TAGGAAGGAT	CGCTTGTCCG	A..GGCATT		
AE007948#2	ATTGGTGGAG	GGGTTGGAGG	TAGGAAGGAT	CGCTTGTCCG	A..GGCATT		
AE009201	ATTGGTGGAG	GGGTTGGAGG	TAGGAAGGAT	CGCTTGTCCG	A..GGCATT		
U45329	CTTTGGTGAA	GGATTGGAGG	TAGGAAGGAA	.GCTTGTCCG	TCTGGATTGT		
AB102735#2	ATTGGTGGAG	GGGTTGGAGG	TAGGAAGGAT	CGCTTGTCCG	A..GGCATGT		
		601					650
K599_23S	TTGTTGTTGG	A..ACTTCG.G	T..TCCTCTG	ATGAAGATGC	TGGATTGGTG		
AE008980#2	TTGTTGTTGG	A..GCTTTAAG	C..TCCTCTG	ATGGGAATGC	TGGATTGATG		
AE009348#2	TTGTTGTTGG	A..GCTTTAAG	C..TCCTCTG	ATGGGAATGC	TGGATTGATG		
AE008265	TTGTTGTTGG	A..GCTTTAAG	C..TCCTCTG	ATGGGAATGC	TGGATTGATG		
AE007948#2	TTGTTGTTGG	A..GCTTTAAG	C..TCCTCTG	ATGGGAATGC	TGGATTGATG		
AE009201	TTGTTGTTGG	A..GCTTTAAG	C..TCCTCTG	ATGGGAATGC	TGGATTGATG		
U45329	TCGTTGTTCA	TCGTCTTTGA	CGATG.TCTG	ATGAACGATC	.GGATTACCG		
AB102735#2	TTGTTGTTGG	AAGGTTTAGG	CCTTCATCTG	ATGGACATGC	TGGATTGATG		
		651					700
K599_23S	TTGCCTGACC	GCGCATCACC	GGATGATATC	TCGAGAAGCT	GGTCTTAATG		
AE008980#2	TTGCCTGACC	GCGCATCACC	GGATGATATC	TCGAGAAGCT	GGTCTTAATG		
AE009348#2	TTGCCTGACC	GCGCATCACC	GGATGATATC	TCGAGAAGCT	GGTCTTAATG		
AE008265	TTGCCTGACC	GCGCATCACC	GGATGATATC	TCGAGAAGCT	GGTCTTAATG		
AE007948#2	TTGCCTGACC	GCGCATCACC	GGATGATATC	TCGAGAAGCT	GGTCTTAATG		
AE009201	TTGCCTGACC	GCGCATCACC	GGATGATATC	TCGAGAAGCT	GGTCTTAATG		
U45329	TTGCCTGACC	GCACGGTACC	GGATTTGATC	TCGAGAAGCT	GGTCTTAA.G		
AB102735#2	TTGCCTGACC	GCGCATCACC	GGATGATATC	TCGAGAAGCT	GGTCTTAATG		
		701	M9			M10	750
K599_23S	GTATGGCTTC	GAGGTGCAC.	...CGGCGTG	CCCTCAA.A.G	AAGAC.CGTA		
AE008980#2	ATACGACCTC	GAAGTGCAC.	...CGGCGTG	CCCTCAA.A.G	AGGAT.TGTA		
AE009348#2	ATACGACCTC	GAAGTGCAC.	...CGGCGTG	CCCTCAA.A.G	AGGAT.TGTA		
AE008265	ATACGACCTC	GAAGTGCAC.	...CGGCGTG	CCCTCAA.A.G	AGGAT.TGTA		
AE007948#2	ATACGACCTC	GAAGTGCAC.	...CGGCGTG	CCCTCAA.A.G	AGGAT.TGTA		
AE009201	ATACGACCTC	GAAGTGCAC.	...CGGCGTG	CCCTCAA.A.G	AGGAT.TGTA		
U45329	ATA.GACTGC	.AAGTGAGCT	GCTCGGCGTA	GCTCCAATAA	AGCAGATCTA		
AB102735#2	ATACGACCTC	GAAGTGCAC.	...CGGCGTG	CCCTCATATG	AGGAT.TGTA		
		751					800
K599_23S	CCGA.CACGT	CGATGTCATC	GTTGGT.GTT	GCGGTTGTAA	AAGGTAACCG		
AE008980#2	TCGAACACGT	CGATGTCATC	GTTGGT.GTT	GCGGTTGTAA	AAGGTAACCG		
AE009348#2	TCGAACACGT	CGATGTCATC	GTTGGT.GTT	GCGGTTGTAA	AAGGTAACCG		
AE008265	TCGAACACGT	CGATGTCATC	GTTGGT.GTT	GCGGTTGTAA	AAGGTAACCG		
AE007948#2	TCGAACACGT	CGATGTCATC	GTTGGT.GTT	GCGGTTGTAA	AAGGTAACCG		
AE009201	TCGAACACGT	CGATGTCATC	GTTGGT.GTT	GCGGTTGTAA	AAGGTAACCG		
U45329	TCGAACACGT	CGATGTCATC	ATGAC..GAA	CCAATTGTAA	AAGGTAATTG		
AB102735#2	TCGAACACGT	CGATGTCATC	GTGACTTGAT	CTGGTTGTAA	AAGGTAACCG		
		801					850
K599_23S	TAACCGTTGT	TCCTCTCTTT	ATCGTTAGGG	ATGGAATGGC	TTTCGCGGCA		
AE008980#2	TAACCGTTGT	TCCTCTCTTT	ATCGTTAGAG	ATGGAATGGC	TTTCGCGGCA		
AE009348#2	TAACCGTTGT	TCCTCTCTTT	ATCGTTAGAG	ATGGAATGGC	TTTCGCGGCA		
AE008265	TAACCGTTGT	TCCTCTCTTT	ATCGTTAGAG	ATGGAATGGC	TTTCGCGGCA		
AE007948#2	TAACCGTTGT	TCCTCTCTTT	ATCGTTAGAG	ATGGAATGGC	TTTCGCGGCA		
AE009201	TAACCGTTGT	TCCTCTCTTT	ATCGTTAGAG	ATGGAATGGC	TTTCGCGGCA		
U45329	G.TTTTTGGG	TC.....TGGC	ATATGCGGC.		
AB102735#2	GATCTGCCGG	TCAT.....	.TC.....C	TT.....		

Fig. 14C

ES 2 543 086 T3

	851		900
K599_23S	GATTGAGTTT	TGCCCGGATG	GCCCGATTG GCACCCCTTT GAGCGCAAGC
AE008980#2	GATTGAGTTT	TGCCCGGATT	GCCCGATTG GCACCCCTTT GAGCGTAAGC
AE009348#2	GATTGAGTTT	TGCCCGGATG	GCCCGATTG GCACCCCTTT GAGCGTAAGC
AE008265	GATTGAGTTT	TGCCCGGATG	GCCCGATTG GCACCCCTTT GAGCGTAAGC
AE007948#2	GATTGAGTTT	TGCCCGGATT	GCCCGATTG GCACCCCTTT GAGCGTAAGC
AE009201	GATTGAGTTT	TGCCCGGATT	GCCCGATTG GCACCCCTTT GAGCGTAAGC
U45329	...T.....T	.GTCGATG	GTCAGGTTG GAACCCCTTT GAGCGCAAGC
AB102735#2CGAAT	GAC.GGCTT.
	901		950
K599_23S	GAGAAGGAAA	GGTCTGCCA	AATCCAACAG ATGATGAGCA TAGACAATGA
AE008980#2	GAGAAGGAAA	GGTCTGCCA	AATCCAACAG ATGATGAGCA TAGACAATGA
AE009348#2	GAGAAGGAAA	GGTCTGCCA	AATCCAACAG ATGATGAGCA TAGACAATGA
AE008265	GAGAAGGAAA	GGTCTGCCA	AATCCAACAG ATGATGAGCA TAGACAATGA
AE007948#2	GAGAAGGAAA	GGTCTGCCA	AATCCAACAG ATGATGAGCA TAGACAATGA
AE009201	GAGAAGGAAA	GGTCTGCCA	AATCCAACAG ATGATGAGCA TAGACAATGA
U45329	GAGAAGGATA	GGAATT.CCA	AACCCATAA ATGATGAGCA TTGGCAATGA
AB102735#2	..GA.....TGATGAGCA TAGACAATGA
	951		1000
K599_23S	GAACGAAGAA	GT.GAATTAA	GGGCATTGG TGGATGCCTT GGCATGCACA
AE008980#2	GAACGAAGAA	GT.GAATTAA	GGGCATTGG TGGATGCCTT GGCATGCACA
AE009348#2	GAACGAAGAA	GT.GAATTAA	GGGCATTGG TGGATGCCTT GGCATGCACA
AE008265	GAACGAAGAA	GT.GAATTAA	GGGCATTGG TGGATGCCTT GGCATGCACA
AE007948#2	GAACGAAGAA	GT.GAATTAA	GGGCATTGG TGGATGCCTT GGCATGCACA
AE009201	GAACGAAGAA	GT.GAATTAA	GGGCATTGG TGGATGCCTT GGCATGCACA
U45329	GAACGATTAA	GTCGTCGTAA	GGGCATTGG TGGATGCCTT GGCATGCACA
AB102735#2	GAACGAAGAA	GT.GAATTAA	GGGCATTGG TGGATGCCTT GGCATGCACA
	1001		1050
K599_23S	GGCGAAGAAG	GACGTGATAC	GCTGCGAAAA GCCGTGGGGA GCTGCGAATA
AE008980#2	GGCGAAGAAG	GACGTGATAC	GCTGCGAAAA GCCGTGGGGA GCTGCGAATA
AE009348#2	GGCGAAGAAG	GACGTGATAC	GCTGCGAAAA GCCGTGGGGA GCTGCGAATA
AE008265	GGCGAAGAAG	GACGTGATAC	GCTGCGAAAA GCCGTGGGGA GCTGCGAATA
AE007948#2	GGCGAAGAAG	GACGTGATAC	GCTGCGAAAA GCCGTGGGGA GCTGCGAATA
AE009201	GGCGAAGAAG	GACGTGATAC	GCTGCGAAAA GCCGTGGGGA GCTGCGAATA
U45329	GGCGATGAAG	GACGTGATAC	GCTGCGATAA GCCGTGGGGA GCTGCGAATG
AB102735#2	GGCGAAGAAG	GACGTGATAC	GCTGCGAAAA GCCGTGGGGA GCTGCGAATA
	1051		1100
K599_23S	AGCTTTGATC	CATGGATCTC	CGAATGGGGC AACCCACCTT AAATGCTTGG
AE008980#2	AGCTTTGATC	CATGGATCTC	CGAATGGGGC AACCCACCTT AAATGCTTGG
AE009348#2	AGCTTTGATC	CATGGATCTC	CGAATGGGGC AACCCACCTT AAATGCTTGG
AE008265	AGCTTTGATC	CATGGATCTC	CGAATGGGGC AACCCACCTT AAATGCTTGG
AE007948#2	AGCTTTGATC	CATGGATCTC	CGAATGGGGC AACCCACCTT AAATGCTTGG
AE009201	AGCTTTGATC	CATGGATCTC	CGAATGGGGC AACCCACCTT AAATGCTTGG
U45329	AGCTTTGATC	CATGGATTC	CGAATGGGGA AACCCACCTT AAATGCTTAG
AB102735#2	AGCTTTGATC	CATGGATCTC	CGAATGGGGC AACCCACCTT AAATGCTTGG
	1101		1150
K599_23S	AAAATCCA..GTCTGT	TT.....
AE008980#2	AAAATCCA..GTCTGT	TT.....
AE009348#2	AAAATCCA..GTCTGT	TT.....
AE008265	AAAATCCA..GTCTGT	TT.....
AE007948#2	AAAATCCA..GTCTGT	TT.....
AE009201	AAAATCCA..GTCTGT	TT.....
U45329	AAAATCCA..AACTGT	CAG.....
AB102735#2	GAAATCTGTT	TTGTTGGCTG	GATGGTCTGT TTGGGTTTAC CCATACAGGG

Fig. 14D

ES 2 543 086 T3

```

1151                                     1200
K599_23S .....
AE008980#2 .....
AE009348#2 .....
AE008265 .....
AE007948#2 .....
AE009201 .....
U45329 .....
AB102735#2 CGCTAGCCCG TCGGTGCTTT TGCACCGCGC CGTCCGCAGG CCTTTGCGCG

1201                                     1250
K599_23S TAACGAACGG CCTG...GG TTTCCAAGCA TTGTGA.TAA GGTATCTTAC
AE008980#2 TAACGAACGG CCTG...GG TTTCCAAGCA TTATTA.TAA GGTATCTTAC
AE009348#2 TAACGAACGG CCTG...GG TTTCCAAGCA TTATTA.TAA GGTATCTTAC
AE008265 TAACGAACGG CCTG...GG TTTCCAAGCA TTATTA.TAA GGTATCTTAC
AE007948#2 TAACGAACGG CCTG...GG TTTCCAAGCA TTATTA.TAA GGTATCTTAC
AE009201 TAACGAACGG CCTG...GG TTTCCAAGC. ....
U45329 TGATGA.CGG CTTG...GG TTTCTAAGCA TTGTTAATAA GGTATCTTAA.
AB102735#2 TGAGGACAGA ACTGAACAGG TTTCCAAGCA TTGTGA.TAA GGTATCTTAC

1251                                     1300
K599_23S TTTCGAATAC ATAGGGGTAA GAAGCGAACG CAGGGAAGCTG AAACATCTAA
AE008980#2 TTTCGAATAC ATAGGGGTAA GAAGCGAACG CAGGGAAGCTG AAACATCTAA
AE009348#2 TTTCGAATAC ATAGGGGTAA GAAGCGAACG CAGGGAAGCTG AAACATCTAA
AE008265 TTTCGAATAC ATAGGGGTAA GAAGCGAACG CAGGGAAGCTG AAACATCTAA
AE007948#2 TTTCGAATAC ATAGGGGTAA GAAGCGAACG CAGGGAAGCTG AAACATCTAA
AE009201 .....
U45329 TCCTGAATAC ATAGGGGTAA GAAGCGAACT CAGGGAAGCTG AAACATCTAA
AB102735#2 TTTCGAATAC ATAGGGGTAA GAAGCGAACG CAGGGAAGCTG AAACATCTAA

1301                                     1350
K599_23S GTACCTGCAG GAAAGGACAT CAACCGAGAC TCCGTAAGTA GTGGCGAGCG
AE008980#2 GTACCTGCAG GAAAGGACAT CAACCGAGAC TCCGTAAGTA GTGGCGAGCG
AE009348#2 GTACCTGCAG GAAAGGACAT CAACCGAGAC TCCGTAAGTA GTGGCGAGCG
AE008265 GTACCTGCAG GAAAGGACAT CAACCGAGAC TCCGTAAGTA GTGGCGAGCG
AE007948#2 GTACCTGCAG GAAAGGACAT CAACCGAGAC TCCGTAAGTA GTGGCGAGCG
AE009201 .....
U45329 GTACCCGAAG GAAAGGACAT CAACCGAGAC TCCGTAAGTA GTGGCGAGCG
AB102735#2 GTACCTGCAG GAAAGGACAT CAACCGAGAC TCCGTAAGTA GTGGCGAGCG

1351                                     1393
K599_23S AACGCGGACC AGGCCAGTGG CAATGATGAA TAAAGCGGAA CGA
AE008980#2 AACGCGGACC AGGCCAGTGG CAATGATGAA TAAAGCGGAA CGA
AE009348#2 AACGCGGACC AGGCCAGTGG CAATGATGAA TAAAGCGGAA CGA
AE008265 AACGCGGACC AGGCCAGTGG CAATGATGAA TAAAGCGGAA CGA
AE007948#2 AACGCGGACC AGGCCAGTGG CAATGATGAA TAAAGCGGAA CGA
AE009201 .....
U45329 AACACGGACC AGGCCAGTGG CAATGAGGAA TAAAGCGGAA CAA
AB102735#2 AACGCGGACC AGGCCAGTGG CAATGATGAA TAAAGCGGAA CGA

```

Fig. 14E

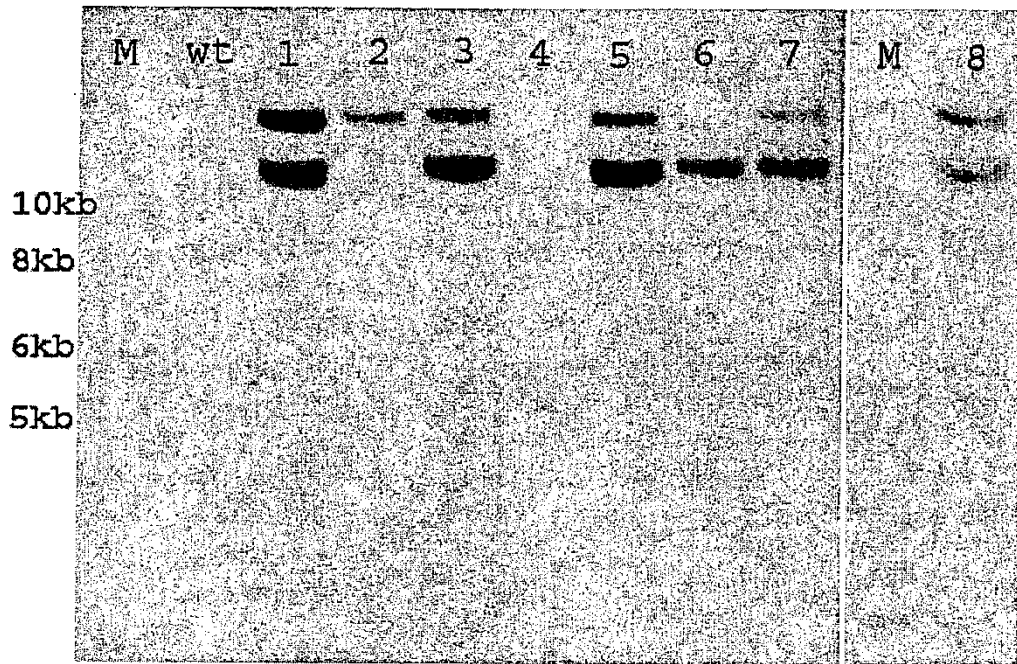


Fig. 15

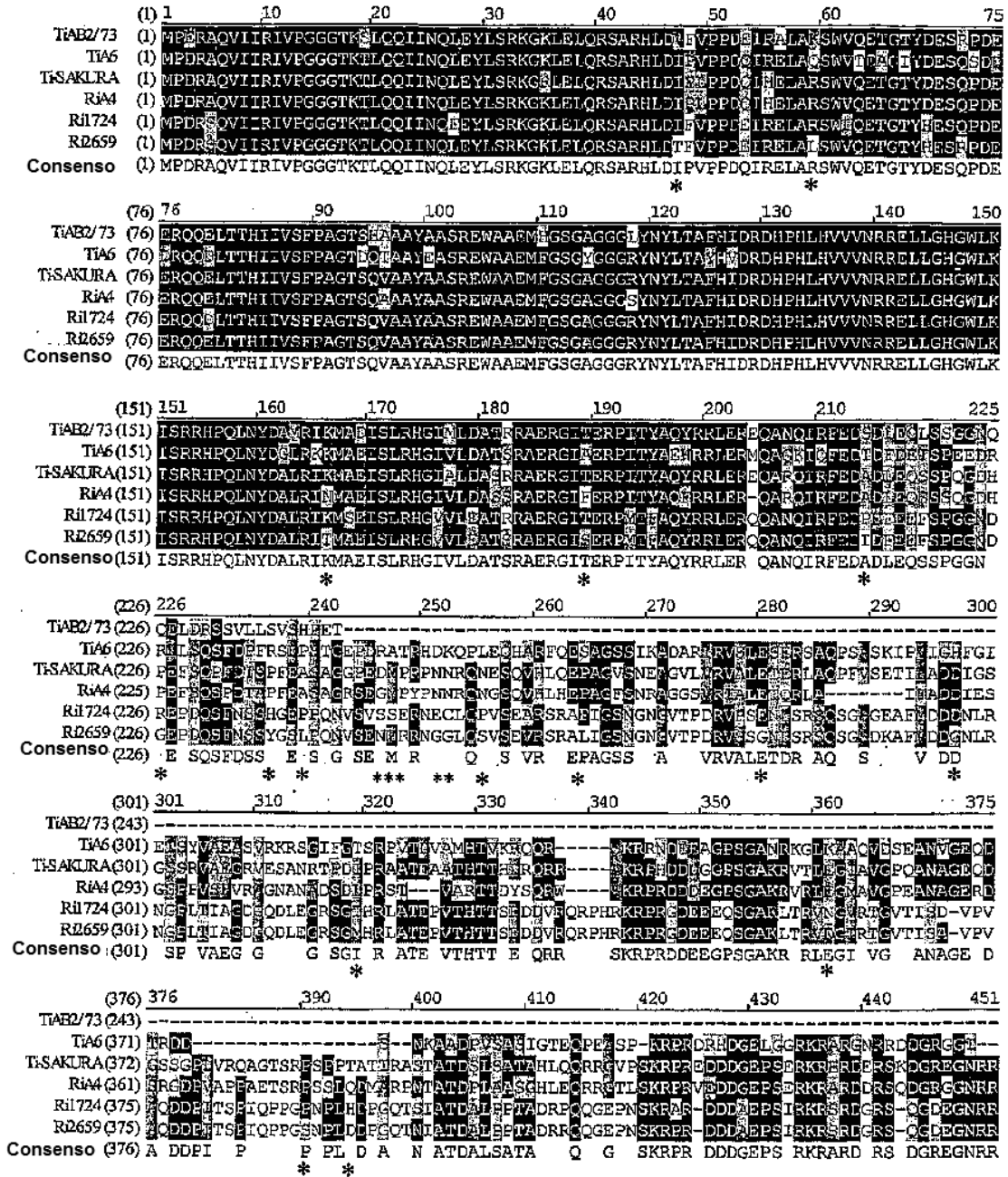


Fig. 16