



(12)

SOLICITUD de PATENTE

(43) Fecha de publicación: **09/06/2004** (51) Int. Cl. 7: **C12N 15/82**
 (22) Fecha de presentación: **02/12/2002**
 (21) Número de solicitud: **JL02000044**

(71) Solicitante:
**CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS
 AVANZADOS DEL IPN-UNIDAD IRAPUATO
 Km. 9.6 Libramiento Norte Carretera Irapuato-
 Leon. 36500 Irapuato Guanajuato MX**

(72) Inventor(es):
**JOSE LUIS CABRERA PONCE
 Km. 9.6 Libramiento Norte, Carretera Irapuato-
 Leon Irapuato Guanajuato 36500 MX**

(74) Representante:
**BENJAMIN RODRIGUEZ GARAY
 Av. Normalistas No.
 800 Guadalajara Jalisco 44270 MX**

(54) Título: **TRANSFORMACION GENETICA EN EL GENERO AGAVE Y PRODUCCION DE PLANTAS
 TRANSGENICAS RESISTENTES A HERBICIDAS.**

(54) Title: **GENETIC TRANSFORMATION IN AGAVE GENUS AND PRODUCTION OF HERBICIDE-RESISTANT
 TRANSGENIC PLANTS.**

(57) Resumen

Se desarrollo un protocolo de transformacion estable en el genero Agave mediante biobalística, Agrobacterium tumefaciens y Agrobacterium rhizogenes. Callos embrigenicos con una alta capacidad de regeneracion son bombardeados con microparticulas de tungsteno cubiertas con ADN de mezclas de plasmidos que pueden contener genes marcadores. Para el caso de la transformacion con A. tumefaciens y A. rhizogenes, los callos embrigenicos se co-cultivan con las bacterias por terminos de 48 horas y posteriormente se transfieren a medios selectivos para obtener las celulas transformadas. Los genes utilizados en este protocolo son: el gen bar, el cual codifica para la enzima fosfinocitrin acetil transferasa, el gen hpt que confiere resistencia a higromicina, el gen npt II el cual confiere resistencia a los antibioticos aminoglicosidos; asi como el gen reportero gus para detectar la actividad enzimatica de la b-glucoronidasa. La expresion del gen bar (que confiere resistencia al herbicida PPT) puede ser observada en pequenas plantas transformadas de Agave tequilana provenientes de callos seleccionados, al aplicar el herbicida Bastatm. Tambien proporciona plantas transgenicas de Agave, las cuales son resistentes al mencionado herbicida mediante la incorporacion del transgene bar. Esta tecnologia de transformacion genetica puede ser ampliamente utilizada en el mejoramiento genetico del genero Agave.

(57) Abstract

The present discloses a development of a protocol of stable transformation in the Agave genus by means of biobalistic, Agrobacterium tumefaciens and Agrobacterium rhizogenes. Embryogenic calluses with a high regeneration capacity are bombarded with tungsten particles covered with AND of plasmid mixtures which can contain marker genes. For the case of the transformation with A. tumefaciens and A. rhizogenes, the embryogenic calluses are co-cultured with the bacteria for periods of 48 hours and then are transferred to selective means to obtain transformed cells. The genes employed in this protocol are: bar gene, which codifies for the acetyl-transferase phosphino citrin, the hpt gene which confers resistance to hygromycin, the npt II gene which confers resistance to aminoglycoside antibiotics; as well as the gus reporter gene for detecting the enzymatic activity of beta-glucuronidase. The bar gene expression (which confers resistance to herbicide PPT) can be observed in small plants tran sformed of Agave tequilana from selected calluses,

when applying the herbicide Basta™. It also provides transgenic Agave plants, which are resistant to the mentioned herbicide by means of the incorporation of the bar transgene. This technology of genetic transformation can be largely employed in the genetic enhancement of the Agave genus.

**TRANSFORMACIÓN GENÉTICA EN EL GENERO *Agave*
Y PRODUCCIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS RESISTENTES A
HERBICIDAS**

5

ANTECEDENTES

La manera de propagar convencionalmente al *A. tequilana* durante años por un método asexual, ha conducido a la clonación de los genotipos seleccionados y encontrar pocas variantes dentro de la superficie cultivada, lo que ha facilitado la incidencia y proliferación de enfermedades.

- 10 Una alternativa para enfrentar este tipo de problemas es el mejoramiento genético del cultivo. El agave tequilero, es una especie semélpara con un largo ciclo de vida, características que dificultan la implementación de un programa de mejoramiento genético convencional. Solo se tiene un ejemplo de mejoramiento genético convencional en el género *Agave* y fue llevado a cabo en Tanzania, por medio del cual se obtuvo después de
- 15 20 años de trabajo un híbrido interespecífico (*A. amaniensis* Trel. X *A. angustifolia* Haw) sobreproductor de fibra (Lock, 1985).

Lo anterior, demuestra que la generación de plantas de agave mejoradas genéticamente, se deben obtener mediante otro tipo de técnicas, y una serie de opciones las ofrece la biotecnología vegetal.

- 20 El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* es una excelente opción, ya que se pueden cultivar células somáticas (no sexuales) aisladas de cualquier parte de una planta. Estas células pueden ser modificadas genéticamente por diferentes métodos (fusión de protoplastos, mutagénesis, producción de haploides, transformación etc..) para después a partir de ellas producir una nueva planta en tiempos relativamente cortos.

- 25 Un componente exitoso y necesario para la transferencia de genes (transformación genética) es la habilidad para regenerar plantas de aquellas células vegetales que han sido transformadas, siendo el más efectivo y seguro el método de regeneración de embriogénesis somática (Ellis y col., 1993).

- Recientemente, Rodríguez-Garay y col., (2001, Número de Solicitud de Patente en México: JL/a/2001/000023) reportaron el establecimiento de un protocolo eficiente de embriogénesis somática en *Agave tequilana* Weber var. azul, el cual puede incrementar las

probabilidades de éxito al tratar de establecer un programa de mejoramiento genético *in vitro* por medio de transformación.

En el año de 1983 se inició el desarrollo de protocolos para la transformación genética de plantas de interés agronómico (Herrera-Estrella y col., 1983). A partir de esa fecha, la
5 introducción y expresión de genes foráneos en un genoma ha sido una herramienta de investigación en la biología vegetal y una herramienta práctica en el mejoramiento genético de los cultivos. En la actualidad se han establecido métodos para una introducción estable de genes novedosos dentro del genoma de cerca de 120 diferentes especies vegetales (Birch, 1997).

10 En 1987, un grupo de investigadores de la Universidad de Cornell (Klein y col., 1987) reportó un método capaz de introducir ADN dentro de células de tejidos intactos mediante un proceso de bombardeo de micropartículas impregnadas de información genética deseada. Estas micropartículas de alta densidad son aceleradas a una alta velocidad por medio de una pistola disparadora generalmente en condiciones de vacío. Los
15 microproyectiles son disparados a velocidades suficientes para penetrar la pared y membranas celulares (Klein y col., 1988). La anterior metodología es llamada "biobalística" y es una técnica versátil, aplicable a un amplio espectro de organismos incluyendo a las plantas monocotiledóneas (Chowdury y col., 1997).

Una vez que se realiza la transformación es necesaria la selección de las clonas
20 transformadas, por lo que se deben extremar cuidados en la elaboración del sistema de selección. Un agente selectivo es aquel que permite diferenciar las células transgénicas de las no transformadas, pudiendo ser un antibiótico (kanamicina, paromomicina, higromicina) ó un herbicida (biálafos, glifosato). La actividad y resistencia de cada uno de ellos esta dada por un gen marcador que permite la selección.

25 Se reporta una invención que tuvo como finalidad el establecimiento de un protocolo de transformación genética de plantas del género *Agave*, haciendo uso de la técnica de biobalística y así ofrecer una metodología que permita desarrollar programas de mejoramiento genético en dicha especie.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

1) Breve descripción de figuras: Se describen las figuras mencionadas en el texto siguiente:

Figura 1. Se describen algunos pasos de la transformación genética de callo embriogénico de *Agave tequilana* Weber var. Azul, a manera de ejemplo. a) Análisis histológico de la expresión transitoria del gen *gus* en el callo embriogénico 72 hrs. después del bombardeo. b) Callo embriogénico control no bombardeado. c) Callo embriogénico resistente a sulfato de paromomicina/PPT derivado del bombardeo después de 3 meses en el medio de selección. Barra = 1 mm.

10

Figura 2. Plantas de *Agave tequilana* Weber var. Azul regeneradas de callos embriogénicos. A) Planta control no transformada después de un mes de tratamiento con una solución 6% v/v de herbicida glufosinato de amonio. b) Planta transformada con *nos-bar* (Lutz y col., 2001) (Ver SEQ ID NO: 1) después de un mes de tratamiento con una solución 6% v/v de herbicida glufosinato de amonio. Barra = 1 cm.

Figura 3. Análisis de hibridización "Southern blot" de plantas de *Agave tequilana* regeneradas a partir de líneas celulares resistentes a PPT. Línea 1 = control *bar* positivo de papaya transformada. Línea 2 = control negativo de planta de agave no transformada. Líneas 3 a la 9 = ADN genómico de siete plantas de agave transformadas genéticamente. La flecha indica la banda marcadora esperada con peso molecular de 1.3 Kb.

1) Selección del material embriogénico:

a) Callos embriogénicos obtenidos en el medio de inducción de embriogénesis somática reportado por Rodriguez-Garay y col. (2001, Número de Solicitud de Patente en México: JL/a/2001/000023) se subdividen (en pedazos de aproximadamente 3 mm³) y se colocan 25 pedazos por caja de petri (aproximadamente 300 mg de callo/caja de petri). Los fragmentos de callo son subcultivados e incubados durante 24 horas en el medio de expresión de la embriogénesis, el medio está constituido por las sales del medio MS (Murashige y Skoog, 1962) (con una modificación en el contenido de NH₄NO₃ reducido a 5 mM), vitaminas L2 (Phillips y Collins, 1979), 30 g/l de sacarosa

y gelificado con 6 g/l de "gellam gum", el medio es suplementado con glutamina e hidrolizado de caseína en concentraciones que van de 100 a 800 mg/l.

- b) El callo se clasifica en dos tipos de acuerdo a su apariencia, a) friable: de una consistencia blanda, forma grumos y es fácilmente manejable y b) blanco compacto: de consistencia dura con la superficie externa lustrosa.
- 5 c) Las condiciones de incubación tanto para la inducción de embriogénesis, preparación del material para el bombardeo y la selección de los materiales bombardeados son las siguientes: 27 ± 2 °C, un fotoperíodo de 16 horas luz y una intensidad lumínica de $25 \mu\text{moles/m}^2/\text{s}$.

10

2) Pretratamiento osmótico de los callos embriogénicos:

Los callos embriogénicos son expuestos durante las 8 horas previas al bombardeo y las 16 posteriores, a los siguientes tratamientos osmóticos: 1) medio de expresión + 0.1 a 0.8 M de manitol + 0.1 a 0.8 M de sorbitol, ó 2) medio de expresión suplementado con una concentración de 30 a 150 g/l de sacarosa.

3) Preparación de las micropartículas de tungsteno:

Se utiliza una técnica descrita por Tomes y col. (1995) y modificada por Cabrera-Ponce y col. (1997) (CINVESTAV - IPN Unidad Irapuato).

- a) Se pesan 60 mg de partículas de tungsteno de $1.8 \mu\text{m}$ y se colocan en un tubo de vidrio de 15 ml de capacidad.
- b) Las partículas se resuspenden en 2 ml de HNO_3 0.1 N, sonicando en hielo durante 20 minutos.
- 25 c) Posteriormente se centrifugan a 10,000 rpm durante 2 minutos.
- d) Una vez sonicadas se elimina el sobrenadante y se adicionan 2 ml de etanol concentrado, transfiriendo la muestra a un tubo eppendorf de 2 ml y se sonica brevemente.
- e) Se centrifuga a 10,000 rpm durante 2 minutos.
- 30 f) El sobrenadante se elimina y se agrega 1 ml de agua desionizada estéril.

- g) Se toman 4 alícuotas de 250 µl de la suspensión con tungsteno y se colocan una por tubo, se resuspenden en 750 µl con agua desionizada estéril.
- h) Los tubos se almacenan a - 20 °C.

5 4) Ejemplos y descripción de algunos plásmidos utilizados:

Se han empleado diferentes plásmidos y combinaciones de los mismos en los bombardeos, los plásmidos se describen a continuación:

pBarGus. Es un plásmido constituido por:

- El promotor CaMV 35S (promotor del virus del mosaico de la coliflor).
- 10 - El gen *bar*, obtenido a partir de *Streptomyces hygrosopicus*, que codifica para la enzima fosfotricinacetil transferasa, la cual confiere resistencia al herbicida fosfotricina (PPT) ó al compuesto glufosinato de amonio que de manera comercial se le conoce como Ignite® ó Basta® (Fromm y col., 1990).
- El gen *gus*, que codifica para la enzima β-glucoronidasa. Es un gen reportero utilizado
- 15 en pruebas histoquímicas. Las células que expresan al gen se tiñen de color azul en la presencia del reactivo 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucorónido (X-Gluc) (Jefferson y col., 1987).

pWRG1515. Plásmido que contiene el gen que codifica para la enzima higromicina-fosfotransferasa ó *hpt* (gen que confiere resistencia al antibiótico higromicina), obtenido a

20 partir de la bacteria *Escherichia coli*; asimismo, contiene al gen *gus* ambos genes están bajo el control del promotor CaMV 35S y por la región terminadora 3' de la nopalina sintetasa (Christou y col., 1991).

pBI426. Es una modificación del plásmido pUC9 que contiene a los genes *gus* y *npt II*. Los cuales proporcionan actividad a la β-glucoronidasa y resistencia al antibiótico kanamicina

25 (al codificar para la enzima neomicin-fosfotransferasa II) respectivamente. Los genes se encuentran bajo la regulación de un promotor doble 35S del virus del mosaico de la coliflor (Datla y col., 1991).

pBI121. Al igual que el anterior es un plásmido que contiene el gen *npt II* con resistencia a los antibióticos aminoglicósidos (como lo es el sulfato de kanamicina) y el gen *gus*.

30 Regulados bajo el control del promotor 35 S del virus del mosaico de la coliflor (por duplicado) y la región terminadora *nos* (nopalina sintetasa) (Jefferson y col., 1987).

Nota: Las técnicas de aislamiento y purificación de los diferentes plásmidos se realizan de acuerdo al protocolo reportado por Sambrook y col. (1989). La concentración recomendada para realizar el ajuste de las preparaciones de ADN es de 1 µg/ml.

5) Recubrimiento de las micropartículas de tungsteno con el ADN:

Técnica descrita por Tomes y col., (1995). Modificada por Cabrera-Ponce y col., (1997) (CINVESTAV - IPN Unidad Irapuato).

a) Las partículas de tungsteno son sonicadas brevemente.

b) Se agregan en un tubo eppendorf estéril en el orden escrito los siguientes componentes:

- 50 µl de la preparación de tungsteno (750 µg)
- 10 µg del ADN total (mezcla de los diferentes plásmidos)
- 50 µl de CaCl₂ (2.5 M)
- 20 µl de espermidina (0.1 M)

15 Nota: un tubo con cada preparación de ADN sirve para 6 disparos.

c) Se mezcla y sonica brevemente hasta observar homogéneo el tungsteno en el tubo.

d) Se centrifuga durante 10 segundos a 10,000 rpm.

e) El sobrenadante se elimina.

f) Se adicionan 250 µl de etanol al 100%, sonicando posteriormente.

20 g) Las partículas son centrifugadas durante 10 segundos a 10,000 rpm.

h) El sobrenadante se elimina.

i) Se agregan 60 µl de etanol concentrado.

j) Para observar un aspecto homogéneo de las partículas en el tubo es necesario sonicar.

k) Se aplican 10 µl de la mezcla en las membranas kapton (macrocarreadores). Por cada

25 disparo existen 125 µg de tungsteno impregnado de 1.6 µg de ADN.

l) Es recomendable que cuando se preparen las micropartículas no se dejen por más de una hora en las membranas macrocarreadoras, ya que existe la posibilidad de que estas se hidraten y no permitan la proyección eficiente del ADN-tungsteno al momento de la explosión del gas helio.

6) Condiciones utilizadas para el bombardeo:

Para el bombardeo de genes (biobalística) se utilizó el sistema biolístico de Helio a alta presión PDS-1000 He (Bio-Rad®).

El funcionamiento del sistema se basa en el lanzamiento de micropartículas (hacia las 5 células blanco), las micropartículas son impregnadas con ADN y lanzadas a cierta velocidad, producto de la presión ejercida por una descarga de helio hacia el sistema.

Las condiciones empleadas durante los diferentes experimentos de bombardeos fueron:

- a) presión del disparo ----- 800 a 1200 psi
- b) número de disparos por placa--- 1
- 10 c) tamaño de partículas----- M10 (0.73 μm)
- d) concentración de partículas----- 125 $\mu\text{g}/\text{disparo}$ (impregnadas con 1.6 μg de ADN)
- e) vacío dentro de la cámara----- 23 in de Hg (0.07 atmósferas)
- f) distancia de disparo----- 7.0 cm.

15 7) Prueba histoquímica para comprobar la expresión transitoria de los genes reporteros:

Las pruebas se realizan con cada una de las placas a las 48 horas después de haberse efectuado el bombardeo de acuerdo al ensayo histológico descrito por Jefferson y col., (1987); modificado por McCabe y col., (1988). En ellas se analiza la expresión transitoria de la enzima β -glucoronidasa (para detectar la integración del gen *gus*), para lo cual se 20 toman aproximadamente 25 mg de callo (2 pedazos) obtenidos de la placa bombardeada se incuban en 80 μl de una solución de tinción, la cual consiste en un reactivo X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucorónido) al 0.05% w/v el cual al ser hidrolizado por la enzima β -glucoronidasa, precipita en un color azul índigo, detectable en los sitios de expresión después de 24 horas de incubación de los explantes en el reactivo a 37 °C (ver 25 siguiente tabla y figura 1).

Plasmido*	Agente selectivo	Platos	Foci azules por plato bombardeado	Medias de clones por plato bombardeado
pBarGus + pBI121	Sulfato de paromomicina (40 mg/l) + PPT 3 mg/l	18	119 b**	3.16 b
pWRG1515 pBI121	+ Higromicina (20 mg/l) + PPT 3 mg/l	18	13 a	0.50 a
pBarGus	Sulfato de paromomicina (40 mg/l) + PPT 3 mg/l	18	169 b	0.44 a
pWRG1515 pBarGus	+ Higromicina (20 mg/l) + PPT 3 mg/l	18	124 b	0.0 a
Control (no bombardeado)	Sulfato de paromomicina (40 mg/l) + PPT 3 mg/l	12	0 a	0.0 a

* Cada plato (300 mg de callo embriogénico) fue bombardeado con 166 µg of ADN

** Medias seguidas por la misma letra no son diferentes estadísticamente ($p=0.05$) usando la prueba LSD.

5 8) Selección del material transgénico:

Los explantes bombardeados se colocan en el medio de inducción de embriogénesis somática de *Agave tequilana* suplementado con el (los) agente(s) selectivo(s) correspondiente(s), dependiendo del plásmido ó mezcla de plásmidos utilizados en el bombardeo.

- 10 a) Se seleccionan callos en 20 mg/l del antibiótico higromicina B (GIBCO® No. Cat. 10687-010) para detectar la integración de pWRG1515.
- b) Para detectar la integración de pBarGus se exponen los callos a 3 mg/l del herbicida glufosinato de amonio-PPT (Riedel-de Häen® No. Cat. 45520).
En la figura No.1 se muestra la selección de callos resistentes al herbicida glufosinato de Amonio.
- 15 c) Para detectar la integración del plásmido pBI426 y pBI121 se adicionan 40 mg/l del antibiótico aminoglicósido sulfato de paromomicina (Sigma® No. Cat. P-5057).

d) Cuando se emplean mezclas de plásmidos en los bombardeos, se seleccionan los explantes en el medio de inducción conteniendo mezclas de los agentes selectivos a las dosis correspondientes.

5 9) Propagación del material transgénico y regeneración de plantas:

En el agave tequilero es necesario subcultivar los callos transgénicos a intervalos de cuatro semanas transfiriéndolos a un medio fresco de inducción de embriogénesis con el agente selectivo. Los callos embriogénicos transgénicos son seleccionados aproximadamente a los 90 días después del bombardeo y van incrementando su biomasa hasta llegar a obtener una población apropiada para aislar ADN y para regenerar plantas *in vitro*.

La obtención de plantas transgénicas *in vitro* se logra a partir de los callos embriogénicos transformados, al colocarlos en el medio de expresión de embriogénesis somática.

15 10) Aplicación de herbicida para comprobar resistencia en plantas:

Plantas de entre 3 y 5 cm de altura cultivadas *in vitro* ó adaptadas a invernadero, y regeneradas a partir de clonas seleccionadas con resistencia al herbicida glufosinato de amonio se impregnan en la punta de la hoja (aproximadamente 1 cm) con una solución esterilizada por filtración a concentración del 2 al 8% del producto comercial Basta® (el herbicida contiene 200 g/l del ingrediente activo químicamente sintetizado: glufosinato de amonio), mostrando al cabo de 30 días después de la aplicación daños visibles en las hojas aquellas plantas que no son transgénicas, como se aprecia en la figura 2.

11) Análisis molecular de los materiales seleccionados:

Es posible comprobar la naturaleza transgénica del material seleccionado mediante el análisis molecular por hibridación con la técnica "Southern blot". En la figura No. 3 se muestra el análisis molecular de 7 líneas resistentes al herbicida glufosinato de amonio.

Tomando en cuenta la tecnología descrita anteriormente que incluye la obtención de callos embriogénicos del género *Agave* competentes para ser transformados genéticamente, los genes dominantes de selección funcionales en *Agave*, las condiciones de selección

correspondientes y la metodología para regenerar plantas transgénicas de los callos embriogénicos seleccionados, resulta obvio que estas condiciones pueden ser aplicadas para la utilización de otros sistemas de transformación genética, como sería el caso del sistema basado en el plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens* ó *Agrobacterium* 5 *rhizogenes*. Las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* que se recomienda usar son la cepa LBA 4404 y la cepa C58 C1 conteniendo vectores binarios que porten uno de los genes de selección dominantes que confieren resistencia al herbicida glufosinato de amonio-PPT ó a higromicina. Los genes de interés para ser expresados en *Agave* se introducen entre el 10 borde derecho e izquierdo del T-DNA presente en el vector binario.

10 Para utilizar el sistema *Agrobacterium*, los callos embriogénicos de *Agave* se co-cultivan con una suspensión conteniendo 10^7 a 10^9 células de *Agrobacterium* por mililitro.

El co-cultivo se realiza por 48 horas a 25°C, después de lo cual se elimina el exceso de bacterias con un papel filtro. Los callos embriogénicos co-cultivados se transfieren a medio de inducción de callos embriogénicos suplementado con el agente selectivo

15 correspondiente y 500 mg/lit Cefotaxima.

20 Para incrementar la eficiencia de transformación se utiliza una concentración de 20 a 50 μM de acetosiringona en el medio utilizado para el co-cultivo de los callos de *Agave* con *Agrobacterium*.

Los callos se cultivan como anteriormente se describió, hasta que se obtienen callos 20 embriogénicos claramente resistentes al agente selectivo. A partir de estos callos transgénicos se regeneran plantas transgénicas que expresan de manera funcional los genes de interés.

BIBLIOGRAFÍA:

- Birch, R. G. 1997. Plant transformation: Problems and strategies for practical application. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 297-326.
- Chowdury, M. K. U., G. K. A. Parveez, y N. M. Saleh. 1997. Evaluation of five promoters
5 for use in transformation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) *Plant Cell Rep.* 16: 277-281.
- Christou P., T. L. Ford, y M. Kofron. 1991. Production of transgenic rice (*Oriza sativa* L.)
Plants from agronomically important Indica and Japonica varieties via electric
discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos.
10 *Biotechnology.* 9: 957-962.
- Datla, R. S. S., J. K. Hammerlindl, L. E. Pelcher, W. L. Crosby, y G. Selvaraj. 1991. A
bifunctional fusion between β -glucuronidase and neomycin phosphotransferase: a broad
spectrum marker enzyme for plants. *Gene.* 101: 239-246.
- Ellis, D. D., E. E. McCabe, S. McInnis, R. Ramachadran, D. R. Russell, K. M. Wallace,
15 B. J. Martinell, D. R. Roberts, K. F. Raffa, y B. H. McCown. 1993. Stable
transformation of *Picea glauca* by particle acceleration. *Bio/Technology.* 11: 84-89.
- Fromm., M.E, F. Morrish, C. Armstrong, R. Williams, J. Thomas, y T. M. Klein. 1990.
Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants.
Biotechnology 8: 833-839.
- 20 Herrera-Estrella, L., M. de Block, M. Van Montagu y J. Schell. 1983. Chimeric genes as
dominant selectable markers in plant cells. *EMBO J.* 2: 987-990.
- Jefferson, R. A. 1987. Assaying chimeric genes in plants: The *gus* gene fusion system. *Plant
Molec. Biol. Rep.* 5: 387-405.
- Klein, T. M., E. D. Wolf, R. Wu, y J. C. Sanford. 1987. High-velocity microprojectiles for
25 delivering nucleic acids into living cells. *Nature.* 327: 70-73.
- Klein, T. H., M. Fromm, A. Weissinger, D. Tomes, S. Schaaf, M. Sletten, y J. C. Sanford.
1988. Transfer of foreign genes into intact maize cells with high-velocity
microprojectiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85: 4305-4309.
- Lock, G. W. 1985. On the scientific and practical aspects of sisal (*Agave sisalana*)
30 cultivation. En: Cruz, C., L. del Castillo, M. Robert, y R. N. Ondarza. (eds.). *Biología y*

Aprovechamiento Integral del Henequén y Otros Agaves. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México. pp. 99-119.

- Lutz, K.A., Knapp, J.E. y Maliga, P. 2001. Expression of bar in the plastid genome confers herbicide resistance. *Plant Physiol.* 125 (4):1585-1590.
- 5 McCabe, D. E., W. F. Swain, B. J. Martinell, y P. Christou. 1988. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. *Bio/technology.* 11: 596-598.
- Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Phillips, G. C. y G. B. Collins. 1979. *In vitro* tissue culture of selected legumes and plant
10 regeneration from callus cultures of red clover. *Crop sci.* 19: 59-64.
- Rodríguez-Garay, B., F. Santacruz-Ruvalcaba, y L. Portillo-Martínez. 2001. Regeneración de plantas de *Agave tequilana* Weber var. azul mediante embriogénesis somática indirecta. Número de Solicitud de Patente en México: JL/a/2001/000023. Presentada el 8 de Noviembre del 2001.
- 15 Sambrook, J., E. F. Fritsch, y T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: A Laboratory Manual.* Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Tomes, D. T., M. C. Ross, y D. D. Songstad. 1995. Direct DNA transfer into intact Plant Cells Via Microprojectile Bombardment. *In: Plant Cell, Tissue and Organ Culture: Fundamental Methods, Springer Lab Manual.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg,
20 Germany. Gamborg, O.L., Phillips, G.C. (Eds). 197-213.
-

LISTADO DE SECUENCIAS
SEQ ID NO: 1

INFORMACION PARA SEQ ID NO:1.

I.- CARACTERISTICAS DE LAS SECUENCIAS.

- 5 (A) LONGITUD : 555 pares de bases
(B) TIPO : Nucleótidos
(C) TIPO DE CADENA : Doble cadena
(D) TOPOLOGÍA: Doble cadena

II.- TIPO DE MOLECULA (tipo de molécula secuenciada en la SEQ ID NO: 1):

- 10 Líneal
ADNc

III.- HIPOTETICA: No

IV.- ANTI-SENTIDO: No

V.- TIPO DE FRAGMENTO: ADN del gen completo

- 15 VI.- FUENTE ORIGINAL (fuente original de molécula secuenciada en SEQ ID NO:1)

- (A) ORGANISMO : *Streptomyces hygroscopicus*
(B) CEPA; ATC 21705
(C) INDIVIDUAL / AISLADA : HP632
20 (D) ESTADO DE DESARROLLO: Miceliar
(E) HAPLOTIPO; Genoma lineal
(F) TIPO DE TEJIDO; Microorganismo
(G) TIPO DE CELULA; Unicelular
(H) LINEA CELULAR; HP632
25 (I) ORGANELO; Localizado en citoplasma

VII.- FUENTE INMEDIATA (fuente experimental inmediata de la secuencia en SEQ ID NO:1):

- (A) BIBLIOTECA : Plásmido episomal

(B) CLONA(S); HB101/pWRG1515

VIII.- POSICION EN EL GENOMA (posición de la secuencia en la SEQ ID NO: 1 en el genoma):

- 5 (A) CROMOSOMA/SEGMENTO: No
(B) POSICION EN EL MAPA; No

IX.- CARACTERISTICAS :

- (A) NOMBRE/CLAVE : No
(B) LOCALIZACION: No
10 (C) METODO DE IDENTIFICACIÓN: Experimentalmente
(D) OTRA INFORMACION: Actividad biológica/enzimática

X.- DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. NO: 1

ATGGCTAGCC CAGAAAGAAG ACCGGCCGAT ATTAGACGTG CTACAGAAGC TGATATGCCA 60
GCAGTTTGTA CAATTGTTAA TCATTATATA GAAACAAGTA CCGTAAACTT TCGAACTGAA 120
CCTCAAGAAC CTCAAGAATG GACTGATGAT TTAGTCCGTT TACGAGAGCG CTATCCTTGG 180
CTTGTAGCAG AAGTTGACGG AGAAGTAGCT GGGATTGCAT ATGCGGGCCC GTGGAAAGCA 240
CGAAATGCAT ATGATTGGAC GGCTGAATCA ACTGTGTACG TTTCACCACG TCATCAACGG 300
ACAGGACTTG GTTCTACTTT ATATACCCAT CTA CTACTGAAAT CTTTGGAGGC ACAGGGTTTT 360
AAGAGTGTGG TAGCTGTTAT AGGATTGCCG AATGATCCCT CGGTACGCAT GCACGAAGCT 420
CTCGGATATG CTCCCAGAGG TATGTTGAGG GCCGCAGGTT TCAAACATGG AAATTGGCAT 480
GATGTAGGTT TTTGGCAACT TGACTTCTCT TTACCAGTAC CTCCTCGTCC CGTTTTACCC 540
GTTACTGAGA TCTGA 555

REIVINDICACIONES

1) El procedimiento para la transformación genética por medio de biobalística en callos embriogénicos de *Agave*. Proceso que comprende las siguientes etapas:

5 a) Selección del material embriogénico: Callos embriogénicos obtenidos en el medio de inducción de embriogénesis somática reportado por Rodríguez-Garay y col. (2001, Número de Solicitud de Patente en México: JL/a/2001/000023) se subdividen (en pedazos de aproximadamente 3 mm³) y se colocan 25 pedazos por caja de petri (aproximadamente 300 mg de callo/caja de petri). Los fragmentos de callo son subcultivados e incubados

10 durante 24 horas en el medio de expresión de la embriogénesis. El medio está constituido por las sales del medio MS (Murashige y Skoog, 1962) (con una modificación en el contenido de NH₄NO₃ reducido a 5 mM), vitaminas L2 (Phillips y Collins, 1979), 30 g/l de sacarosa y gelificado con 6 g/l de "gellam gum", además, el medio es suplementado con glutamina e hidrolizado de caseína en concentraciones que van de 100 a 800 mg/l. El callo
15 se clasifica en dos tipos de acuerdo a su apariencia, i) friable: de una consistencia blanda, forma grumos y es fácilmente manejable y ii) blanco compacto: de consistencia dura con la
● superficie externa lustrosa. Las condiciones de incubación tanto para la inducción de embriogénesis, preparación del material para el bombardeo y la selección de los materiales bombardeados son las siguientes: 27 ± 2 °C, un fotoperíodo de 16 horas luz y una
20 intensidad lumínica de 25 μmol/m²/s.

b) Pretratamiento de los callos embriogénicos: Los callos embriogénicos son expuestos durante las 8 horas previas al bombardeo y las 16 posteriores, a los siguientes tratamientos osmóticos: 1) medio de expresión + 0.1 a 0.8 M de manitol + 0.1 a 0.8 M de sorbitol, ó 2) medio de expresión suplementado con una concentración de 30 a 150 g/l de
● 25 sacarosa.

c) Condiciones utilizadas para el bombardeo:

- • presión del disparo ----- 800 a 1200 psi
- número de disparos por placa--- 1
- tamaño de partículas----- M10 (0.73 μm)
- 30 • concentración de partículas----- 125 μg/disparo (impregnadas con 1.6 μg de ADN)
- vacío dentro de la cámara----- 23 in de Hg (0.07 atmósferas)
- distancia de disparo----- 7.0 cm.

d) Selección, multiplicación y regeneración de plantas a partir del material transgénico: Los explantes bombardeados se colocan en el medio de inducción de embriogénesis somática de *Agave tequilana* suplementado con el (los) agente(s) selectivo(s) correspondiente(s), dependiendo del plásmido ó mezcla de plásmidos utilizados en el 5 bombardeo. En el agave tequilero es necesario subcultivar los callos transgénicos a intervalos de cuatro semanas transfiriéndolos a un medio fresco de inducción de embriogénesis con el agente selectivo. Los callos embriogénicos transgénicos son seleccionados aproximadamente a los 90 días después del bombardeo y van incrementando su biomasa hasta llegar a obtener una población apropiada para aislar ADN y para 10 regenerar plantas *in vitro*.

La obtención de plantas transgénicas *in vitro* se logra a partir de los callos embriogénicos transformados, al colocarlos en el medio de expresión de embriogénesis somática.

2) El procedimiento descrito en la reivindicación 1 aplicado a *Agave tequilana*.

15

3) El procedimiento descrito en la reivindicación 1 aplicado a *Agave tequilana* Weber.

4) El procedimiento descrito en la reivindicación 1 aplicado a *Agave tequilana* Weber variedad azul.

20

5) El proceso de transformación genética según las cláusulas anteriores, caracterizado por que puede ser empleado para realizar mejoramiento genético *in vitro*, utilizando células embriogénicas como metodología de regeneración.

25 6) El procedimiento para la transformación genética de *Agave* por medio de *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogens*. El procedimiento consiste en los siguientes pasos:

a) Callos embriogénicos obtenidos en el medio de inducción de embriogénesis somática reportado por Rodríguez-Garay y col. (2001, Número de Solicitud de Patente en México: JL/a/2001/000023) se subdividen (en pedazos de aproximadamente 3 mm³) y se 30 colocan 25 pedazos por caja de petri (aproximadamente 300 mg de callo/caja de petri). Los fragmentos de callo son subcultivados e incubados durante 24 horas en el medio de

expresión de la embriogénesis, el medio esta constituido por las sales del medio MS (Murashige y Skoog, 1962) (con una modificación en el contenido de NH_4NO_3 reducido a 5 mM), vitaminas L2 (Phillips y Collins, 1979), 30 g/l de sacarosa y gelificado con 6 g/l de "gellam gum", el medio es suplementado con glutamina e hidrolizado de caseína en 5 concentraciones que van de 100 a 800 mg/l.

b) Co-cultivo de callos embriogénicos con cepas de *Agrobacterium* no oncogénicos, que portan un vector binario que contiene un gen dominante de selección y el gen de interés. El co-cultivo se lleva a cabo por 48 hrs. después de lo cual el exceso de bacteria.

c) Selección, multiplicación y regeneración de plantas a partir del material co-cultivo con *Agrobacterium*. Los explantes se colocan en medio de inducción de embriogénesis somática de *Agave tequilana* suplementado con el (los) agentes selectivos correspondientes, dependiendo del gen dominante de selección presente en el plásmido binario y un antibiótico para eliminar las células remanentes del *Agrobacterium*.

15 7) El procedimiento descrito en la reivindicación 6 aplicado a *Agave tequilana*.

8) El procedimiento descrito en la reivindicación 6 aplicado a *Agave tequilana* Weber.

9) El procedimiento descrito en la reivindicación 6 aplicado a *Agave tequilana* Weber var. Azul.

10) Plantas transgénicas de *Agave* resistentes a herbicidas glufosinato de amonio, caracterizadas porque contienen el gene *bar* de la secuencia SEQ ID NO: 1.

25 11) Plantas transgénicas según la reivindicación 10 porque comprenden a *Agave tequilana* Weber.

12) Plantas transgénicas según la reivindicación 10 porque comprenden a *Agave tequilana* Weber var. Azul.

13) Plantas transgénicas de *Agave* resistentes a herbicida glufosinato de amonio.

14) Plantas transgénicas de *Agave tequilana* resistentes a herbicida glufosinato de amonio.

5

15) Plantas transgénicas de *Agave tequilana* Weber var. Azul resistentes a herbicida glufosinato de amonio.



10



RESUMEN

Se desarrolló un protocolo de transformación estable en el género *Agave* mediante biobalística, *Agrobacterium tumefaciens* y *Agrobacterium rhizogenes*. Callos 5 embriogénicos con una alta capacidad de regeneración son bombardeados con micropartículas de tungsteno cubiertas con ADN de mezclas de plásmidos que pueden contener genes marcadores. Para el caso de la transformación con *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes*, los callos embriogénicos se co-cultivan con las bacterias por términos de 48 10 horas y posteriormente se transfieren a medios selectivos para obtener las células transformadas. Los genes utilizados con este protocolo son: el gen *bar*, el cual codifica para la enzima fosfinotricin acetil transferasa, el gen *hpt* que confiere resistencia a higromicina, el gen *npt II* el cual confiere resistencia a los antibióticos aminoglicósidos; así como el gen reportero *gus* para detectar la actividad enzimática de la β -glucoronidasa.

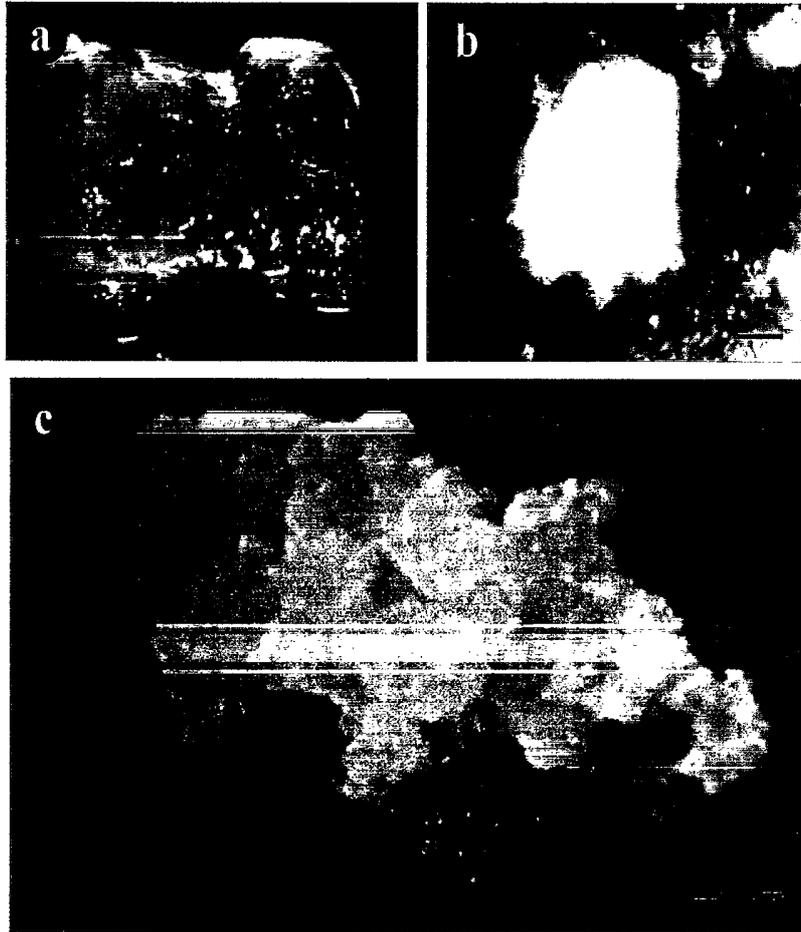
La expresión del transgene *bar* (que confiere resistencia al herbicida PPT) puede ser 15 observada en pequeñas plantas transformadas de *Agave tequilana* provenientes de callos seleccionados, al aplicar el herbicida Basta™. También, proporciona plantas transgénicas de *Agave*, las cuales son resistentes al mencionado herbicida mediante la incorporación del transgene *bar*. Esta metodología de transformación genética puede ser ampliamente utilizada en el mejoramiento genético del género *Agave*.

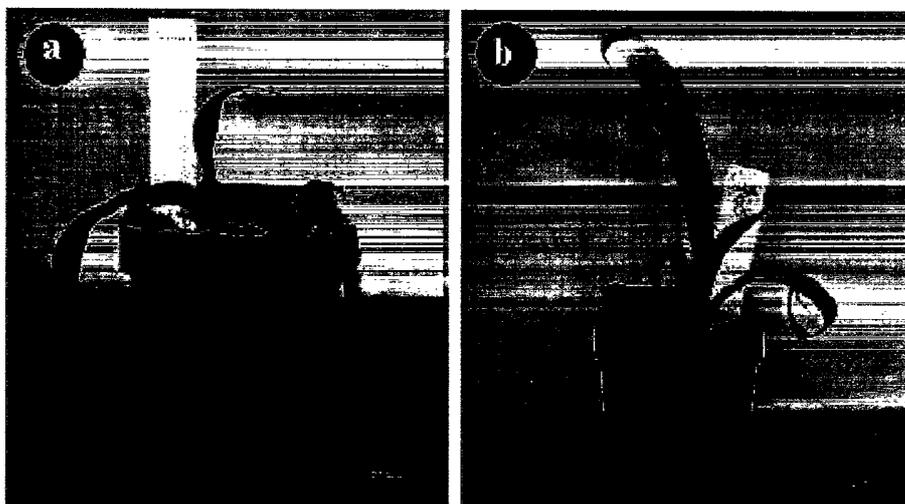
20

25

30

1/3
Figura No. 1





3/3
Figura No. 3

