



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 381 349**

②1 Número de solicitud: 201001411

⑤1 Int. Cl.:
C12N 15/82 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

②2 Fecha de presentación: **29.10.2010**

④3 Fecha de publicación de la solicitud: **25.05.2012**

④3 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
25.05.2012

⑦1 Solicitante/s: **Universidad de Málaga**
Plaza de El Ejido, s/n
29071 Málaga, ES

⑦2 Inventor/es: **Ávila Sáez, Concha;**
Rueda López, Marina;
Canales, Javier;
Crespillo, Remedios y
Cánovas Ramos, Francisco

⑦4 Agente/Representante:
No consta

⑤4 Título: **Árboles transgénicos con mayor cantidad de biomasa y de carbohidratos.**

⑤7 Resumen:

Árboles transgénicos con mayor cantidad de biomasa y de carbohidratos.

La presente invención describe la generación de árboles transgénicos (chopos) que sobreexpresan un gen de pino que codifica un factor de transcripción del tipo Zn-finger de la familia de factores de transcripción tipo Dof (DNA-one finger). Los árboles obtenidos mediante ingeniería genética se caracterizan por presentar mayor contenido en biomasa, altura superior a los controles y mayor actividad fotosintética que se traduce en un contenido en azúcares superior que los árboles no transformados, así como mayor crecimiento vegetativo y número de hojas.

ES 2 381 349 A1

DESCRIPCIÓN

Árboles transgénicos con mayor cantidad de biomasa y de carbohidratos.

5 La presente invención tiene su aplicación dentro de la industria dedicada al empleo de árboles para la obtención de biomasa principalmente con dos objetivos: producción de madera, papel y producción de bio-combustibles. El chopo es un árbol de crecimiento rápido que presenta una serie de ventajas logísticas y beneficios económicos en relación a otros cultivos anuales que puedan ser utilizados con propósitos similares como los cereales. Una de esas ventajas es la flexibilidad en cuanto al tiempo de cosecha lo que permite reducir los costes de almacenamiento y las pérdidas por degradación del material asociadas con el almacenamiento de biomasa de cultivos recogidos en cosechas anuales. Otra importante ventaja es que no se trata de un cultivo de interés agroalimentario.

Estado de la técnica

15 La madera se encuentra tradicionalmente entre los cinco productos comerciales más importantes debido a la elevada demanda de sus productos derivados, tales como el papel, fibras o materiales para la construcción. No obstante, el desarrollo de la Biotecnología supone la aparición de nuevas aplicaciones para dicho material, entre ellos está su uso como biocombustible, que puede ser utilizado como sustituto del petróleo. Es más, uno de los inventos más prometedores del siglo XXI, es la “madera líquida”, un material formado en su mayor parte por lignina, con características muy similares al plástico.

25 El sector forestal, al igual que el agrícola, está fuertemente influido por los ciclos de la naturaleza. Los árboles tienen un crecimiento lento, por lo que la urgencia en la demanda de otros sectores no permite que el bosque se regenere a la misma tasa a la que se consume, por ello es necesario buscar nuevas formas de obtener productos forestales sin tener que acudir a la explotación de los bosques nativos. Además, Las especies arbóreas tienen un enorme valor ecológico por la biodiversidad que presentan y por el relevante papel que juegan frente al efecto invernadero, al ser sumideros importantes de CO₂. Debido a esto, en los últimos 20 años se está investigando profusamente la biología de los árboles forestales, lo que se refleja en un paulatino avance biotecnológico dirigido a su cultivo a gran escala, como ya sucede con muchas especies vegetales de interés agronómico.

30 Entre las características de interés para la mejora de árboles se encuentran principalmente: el crecimiento, es decir, la generación de biomasa; la forma del tronco, importante para mantener la homogeneidad en los productos; y la calidad de la madera. La investigación actual esta focalizada en las facetas del metabolismo que nos permitan obtener dichas características, y se centra en el estudio de determinados genes relevantes y las diferentes combinaciones entre éstos que determinen los fenotipos requeridos.

35 La acumulación de metabolitos de interés por parte de las plantas se produce a través de procesos complejos que incluyen múltiples pasos regulados por enzimas, ramificación de rutas metabólicas y regulación por factores de transcripción con funciones en muchos casos redundantes. Por tanto, la manipulación de factores de transcripción puede ser una estrategia efectiva para controlar los niveles de metabolitos tanto desde el punto de vista tanto cualitativo como cuantitativo (Iwase *et al.*, Manipulation of plant metabolis pathways by transcription factors. *Plant Biotechnology* 26:29-38, 2009). Un único factor de transcripción frecuentemente regula la expresión coordinada de un grupo de genes de la respectiva ruta metabólica en cuestión.

45 PpDof5 es un factor de transcripción de pino marítimo (*Pinus pinaster*) que regula la expresión de los genes de Glutamina Sintetasa tanto en tejidos fotosintéticos como no fotosintéticos aunque su expresión mayoritariamente se localiza en las raíces y el tronco del árbol. Funciona de forma dual en la regulación de los genes de GS de pino: activando a *GS1b* e inhibiendo a *GS1a*, de esta manera controla la distribución espacial de las isoformas de GS en pino (Rueda-López *et al.*, Differential regulation of two glutamine synthetase genes by a single Dof transcription factor. *Plant Journal* 56: 73-85, 2008). Filogenéticamente este factor de transcripción está relacionado con factores Dof ancestrales que se originaron antes de la divergencia entre los ancestros de angiospermas y gimnospermas. PpDof5 podría ser uno de los genes Dof más antiguos de pino lo que sugiere que puede estar implicado en la regulación de funciones antiguas y que son esenciales para el árbol.

55 Análisis recientes del transcriptoma de plantas han relacionado a los factores Dof con la regulación de la producción de lignina (Rogers *et al.*, Comparison of lignin deposition in three ectopic lignification mutants. *New Phytologist* 168: 123-140, 2005) y con las interacciones carbono-nitrógeno en plantas (Yanagisawa *et al.*, Metabolic engineering with Dof 1 transcription factor in plants: Improved nitrogen assimilation and growth under low-nitrogen conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101: 7833-7838, 2004). Todo esto pone de manifiesto la importancia de los factores Dof en el desarrollo de los árboles dada su implicación en la regulación de dos rutas esenciales de las plantas: el metabolismo carbonado y el nitrogenado.

Explicación de la invención

65 La presente invención describe la generación de chopos transgénicos que expresan el factor Dof5 de pino. Los árboles obtenidos mediante ingeniería genética a nivel fenotípico presentan: mayor altura, diámetro del tronco y volumen de planta.

El análisis del contenido de clorofilas totales es superior, así como el de azúcares: glucosa, fructosa y sacarosa.

Se han utilizado chopos híbridos del clon 7171-B4 procedente del cruce de *Populus tremula* x *Populus alba* (Leplé *et al.*, Transgenic poplars: expression of chimeric genes using four different constructs. *Plant Cell Rep.* 11:137-141, 1992) para introducir la construcción quimérica que contenía el cDNA completo de Dof5 (SEQ ID NO: 1) bajo la acción del promotor constitutivo CaMV 35S del virus del mosaico de la coliflor en un vector binario pBI 121 (Figura 1). La cepa utilizada para la infección fue *Agrobacterium tumefaciens* EHA-105. La región T-DNA del vector empleado también posee un gen que confiere resistencia al antibiótico kanamicina y que permite la selección de las células recombinantes.

Se transformaron segmentos de hojas de árboles cultivados *in vitro* y se generaron callos que se seleccionaron por su capacidad de crecimiento y diferenciación en presencia de kanamicina (Figura 2). En las plántulas regeneradas se analizó la presencia del gen CaMV35S-Dof5-NOS mediante Southern blot utilizando como sonda el cDNA de Dof5 (SEQ ID NO: 1) (Figura 3). El proceso de aclimatación de las líneas a tierra se muestra en la Figura 4.

Los estudios de crecimiento y desarrollo indican que los árboles transgénicos presentan mayor crecimiento en altura, mayor diámetro del tallo y de la planta así como mayor biomasa global (Figura 5). El análisis de clorofilas totales se realizó utilizando el método de Arnon: Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* 24:1-15, 1949 (Figura 6) y reveló un contenido superior tanto de clorofilas totales como de clorofila a y b.

Se ha determinado el contenido de sacarosa, glucosa, fructosa y almidón para establecer si la expresión del transgén era responsable de la variación de los niveles de carbohidratos (Figura 7). El contenido de sacarosa de las líneas aumentó relativo a las plantas control así como los niveles de glucosa y fructosa, este aumento no es debido a hidrólisis espontánea de sacarosa según las condiciones usadas para la realización de la medida. Por tanto, aunque el factor de transcripción fue aislado y caracterizado en el contexto de su función como activador/represor de los genes de Glutamina Sintetasa cuyos productos génicos están implicados en la asimilación de amonio parece estar implicado también en la regulación de genes implicados en el metabolismo carbonado del árbol. Para tener una idea más generalizada sobre el efecto del transgén sobre el transcriptoma de chopo se han realizado análisis de micromatrices comerciales de chopo (Agilent 4x44K) comparando la expresión en líneas transgénicas frente a la expresión del transcriptoma de árboles control caracterizándose funcionalmente la variación de expresión usándose el software MapMan.

3500 de los 44.000 fragmentos de DNA que representando el transcriptoma de chopo en la micromatriz variaban significativamente. El análisis funcional de estos genes se muestra en la Figura 8 donde podemos ver un aumento en los niveles de expresión de algunos de los genes de la ruta de síntesis de sacarosa y almidón, lo que está de acuerdo con el incremento observado en los niveles de carbohidratos.

La inhibición de la expresión de algunos de los genes de fotosíntesis explicaría que dado el aumento de los niveles de clorofilas los árboles intenten regular la tasa de radiación luminosa que utilizan por regulación transcripcional de algunos de los genes de la ruta.

Los genes del metabolismo del nitrógeno: transportadores de nitrato de alta y baja afinidad, genes de nitrato y nitrito reductasa, genes de asimilación de amonio: GS, GOGAT y AS también se van a ver afectados por la presencia del transgén. Dado que muchos de estos genes se encuentran en forma de familia multigénica no todos los miembros de la misma familia se inducen o se reprimen, indicando un tipo de regulación diferencial de sus miembros.

Explicación de los dibujos

Figura 1. Esquema del plásmido binario conteniendo la SEQ ID NO: 1 utilizada para transformar segmentos de hojas de chopo. Se esquematiza el T-DNA que se transfiere a la planta con el borde derecho, el gen de resistencia a kanamicina NPTII bajo la acción del promotor NOS, el promotor constitutivo 35S seguido de Dof5 y el gen delator GUS, el terminador NOS y por último el borde izquierdo del T-DNA. Este plásmido se utilizó para transformar la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 que se utilizó como sistema de transformación de los discos de hoja.

Figura 2. Resultado de la selección en kanamicina de los callos conteniendo el transgen. Esta selección dio lugar a doce líneas independientes.

Figura 3. Análisis de la presencia del transgén en el genoma de los árboles transformados. Se aisló DNA genómico de cada línea que se digirió con Hind III y los fragmentos resultantes se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa y se transfirieron a un filtro de nitrocelulosa para la detección del gen quimérico empleando como sonda el cDNA de Dof5 de pino (SEQ ID NO: 1). El control corresponde a los chopos no transformados.

Figura 4. Proceso de aclimatación de las líneas transgénicas tierra. Las plantas individuales de cada línea se transfirieron a macetas conteniendo sustrato hortícola comercial donde se realizó un seguimiento de su aclimatación. En esta figura se muestra la diferencia de desarrollo vegetativo de dos de las líneas L5 y L7 que mostraban la presencia de una copia única del transgén insertada en su genoma.

ES 2 381 349 A1

Figura 5. Características fenotípicas de las líneas transgénicas obtenidas. Los datos de cada clon corresponden al menos a tres individuos con el mismo genotipo. Los árboles se cultivaron en invernadero durante 8 semanas antes de la recogida de datos. Las diferencias entre los clones transgénicos y los controles son estadísticamente significativos ($P < 0.001$).

Figura 6. Contenido en clorofila. Se utilizó la quinta hoja para la extracción de clorofilas. El método empleado utiliza acetona al 80% y fue el descrito por Arnon Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* 24: 1-15 (1949).

Figura 7. Determinación de carbohidratos. Histograma representativo de los niveles de glucosa, fructosa y sacarosa en plantas control y dos de las líneas transgénicas obtenidas: L5 y L7. La determinación se realizó utilizando la 5ª hoja de al menos tres individuos con el mismo genotipo. El método de extracción y medida de carbohidratos fue el descrito en Sahrawy *et al.*, Increased sucrose level and altered nitrogen metabolism in *Arabidopsis thaliana* transgenic plants expressing antisense chloroplastic fructose-1,6-bisphosphatase. *J. Exp. Bot.* 55: 2495-2503 (2004).

Figura 8. Visualización con la herramienta bioinformática MapMan de la respuesta del transcriptoma de la línea L5 de chopo referida a plantas control sin transformar. Se han calculado los log de los cocientes de la abundancia media de cada transcrito medida con el chip de Agilent y se ha visualizado en un mapa general del metabolismo en plantas.

Modo de realización de la invención

En la presente invención se ha empleado un clon híbrido de chopo (*Populus tremula* x *P. alba* clon 7171-BA) que fue previamente seleccionado por su capacidad de crecimiento y regeneración en cultivos *in vitro* (Leplé *et al.* Transgenic poplars: expression of chimeric genes using four different constructs. *Plant Cell Rep.* 11:137-141, 1992). Las plantas se mantuvieron en cultivos *in vitro* en cámaras con un fotoperiodo de 16 h de luz y temperatura constante de 24°C bajo una irradiancia de 30 mmol/m²s.

La construcción génica compuesta del promotor del gen 35S del virus de mosaico de la coliflor (CaMV 35S) fusionado al cDNA Dof5 de pino (Rueda-López *et al.*, Differential regulation of two glutamine synthetase genes by a single Dof transcription factor. *Plant Journal* 56: 73-85, 2008) y a la región de terminación de la transcripción del gen de la nopalina sintetasa (NOS) se realizó de la siguiente forma: El inserto de 1.7 kb conteniendo el marco de lectura completo de Dof5 (SEQ ID NO: 1). ID NO: 1 clonado en pBlueScript se transfirió al plásmido binario pBI 121 mediante el uso de enzimas de restricción (Xba I).

La orientación del cDNA de Dof5 respecto al promotor CaMV se verificó mediante secuenciación de la construcción. La orientación de la construcción respecto al gen que confiere resistencia a la kanamicina se comprobó mediante análisis de restricción. Ambos genes se transcriben en el mismo sentido (Figura 1). El vector se transfirió a la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 mediante el método de congelación-descongelación (Holsters *et al.*, Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Gen. Genet* 163:181-187, 1978).

Las bacterias transformadas se cultivaron en medio líquido 2YT (Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, New York, 1987) conteniendo estreptomina (200 mg/L) y kanamicina (50 mg/ml). Tras 48 horas de incubación a 28°C y 300 rpm, la suspensión bacteriana se centrifugó y las bacterias se resuspendieron en medio líquido M1 (medio descrito 7 ES 2 152 838 B18 por Murashige y Skoog (A revised medium for rapid growth and Bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497, 1962) suplementado con vitaminas (Morel y Wetmore, Tissue culture of monocotyledons. *Am. J. Bot.* 38:141-143, 1951), sacarosa al 3 % (p/v), y L-cisteína (1 ml/L)) y la preparación se ajustó a una densidad óptica de 0.3 unidades de absorbancia a 660 nm.

Para la transformación, los árboles se cultivaron *in vitro* en medio M1 solidificado (conteniendo 8 g/L de agar); cuando las plántulas alcanzaron una altura de 5-10 cm, se recolectaron las hojas que se preincubaron en oscuridad durante 48 horas. Las hojas se cortaron en segmentos de 1 cm² y se incubaron en la preparación de bacterias transformadas durante 2 horas a temperatura ambiente. Los segmentos de hojas se secaron sobre papel de filtro estéril para eliminar el exceso de bacterias y se procedió a una incubación de 48 h en oscuridad en medio M1 solidificado. Para la descontaminación bacteriana y selección de resistencia a antibiótico, los segmentos se transfirieron a medio M1 solidificado conteniendo timentina (200 mg/L), kanamicina (50 mg/L) y 2,4-D (1 mg/L). Tras cuatro semanas, se generaron callos que se transfirieron a nuevo medio M1 sólido con kanamicina (50 mg/L) y thidiazuron (0.1 mM) para la generación de tallos en presencia de luz. Una vez que los tallos alcanzaron 2-3 cm de altura, se separaron y cultivaron en nuevo medio (M1 con la mitad de la concentración de sales descrita por Murashige y Skoog (A revised médium for rapid growth and Bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497, 1962) para el enraizamiento de las plántulas.

Los árboles generados tras la transformación se cultivaron sobre un sustrato I artificial Metro-Mix 200 (Scotts Co., Marysville Ohio USA) y se mantuvieron en invernadero durante 3-4 meses antes de su análisis.

La presencia del gen CaMV35S-Dof5-NOS en el genoma de las plantas transformadas se estableció mediante Southern blot. Se aisló DNA genómico a partir de las hojas de los árboles transgénicos (Dellaporta *et al.* Isolation of DNA from higher plants. *Plant Mol. Biol. Rep.* 4:19-21, 1983) y se empleó como sonda el cDNA del Dof5 de pino marcado con ³²P. La determinación de clorofila se realizó en extractos de hojas preparados con acetona al 80%

ES 2 381 349 A1

(Arnon Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol. 24: 1-15, 1949). Los carbohidratos se determinaron a partir de hojas congeladas de al menos tres individuos con el mismo genotipo. Se extrajeron con etanol al 80% a 80°C durante 30 minutos seguidos de lavados posteriores con etanol al 50% a 80°C durante 15 min. Después de centrifugar la sacarosa, glucosa y fructosa se midieron enzimáticamente en el sobrenadante para determinar la reducción de NADP a 340 nm después de la adición sucesiva de glucosa-6-P-deshidrogenasa, hexokinasa, fosfoglucosa-isomerasa e invertasa (Sekin, Enzymatic determination of glucose, fructose and sucrose in tobacco. Tobacco Science 23: 75-77, 1978).

Los cambios de expresión del transcriptoma de chopo debidos a la presencia del transgén se analizaron utilizando la herramienta MapMan que permite la visualización de los cambios de expresión organizados en forma de rutas metabólicas. Esto permite visualizar la expresión coordinada, represión e inducción respectivamente, de gran número de genes que son necesarios en una determinada respuesta. En muchos casos se trata de familias génicas cuyos miembros se expresan de forma diferencial o son rutas o segmentos de rutas metabólicas que pueden tener funciones total o parcialmente solapantes (Thimm *et al.*, Mapman: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. Plant J. 37: 914-939, 2004). La herramienta puede usarse como una aplicación en la Web o descargada en el ordenador desde <http://gabi.rzpd.de/projects/MapMan/>.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 381 349 A1

REIVINDICACIONES

- 5 1. Árboles transgénicos con mayor crecimiento vegetativo, mayor altura, mayor volumen, mayor diámetro del tronco y contenido en biomasa que los árboles no transformados, **caracterizados** por la introducción del gen SEQ ID NO: 1.
- 10 2. Uso de los árboles transgénicos según la reivindicación 1 para la producción de bioetanol.
3. Uso de la biomasa de los árboles transgénicos según la reivindicación 1 para la industria de la madera o del papel.
- 15 4. Uso de la biomasa de los árboles transgénicos según la reivindicación 1 para biorefinerías.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIGURA 1

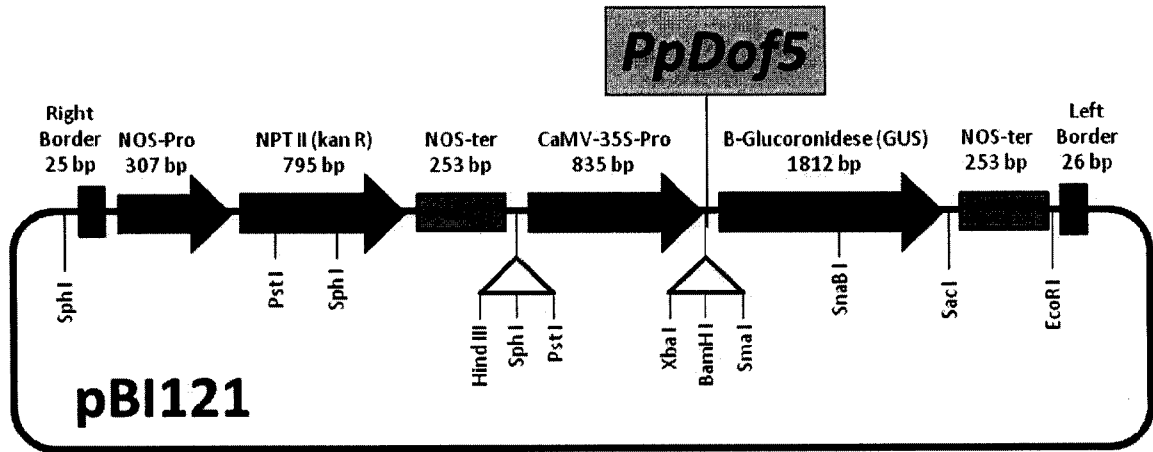


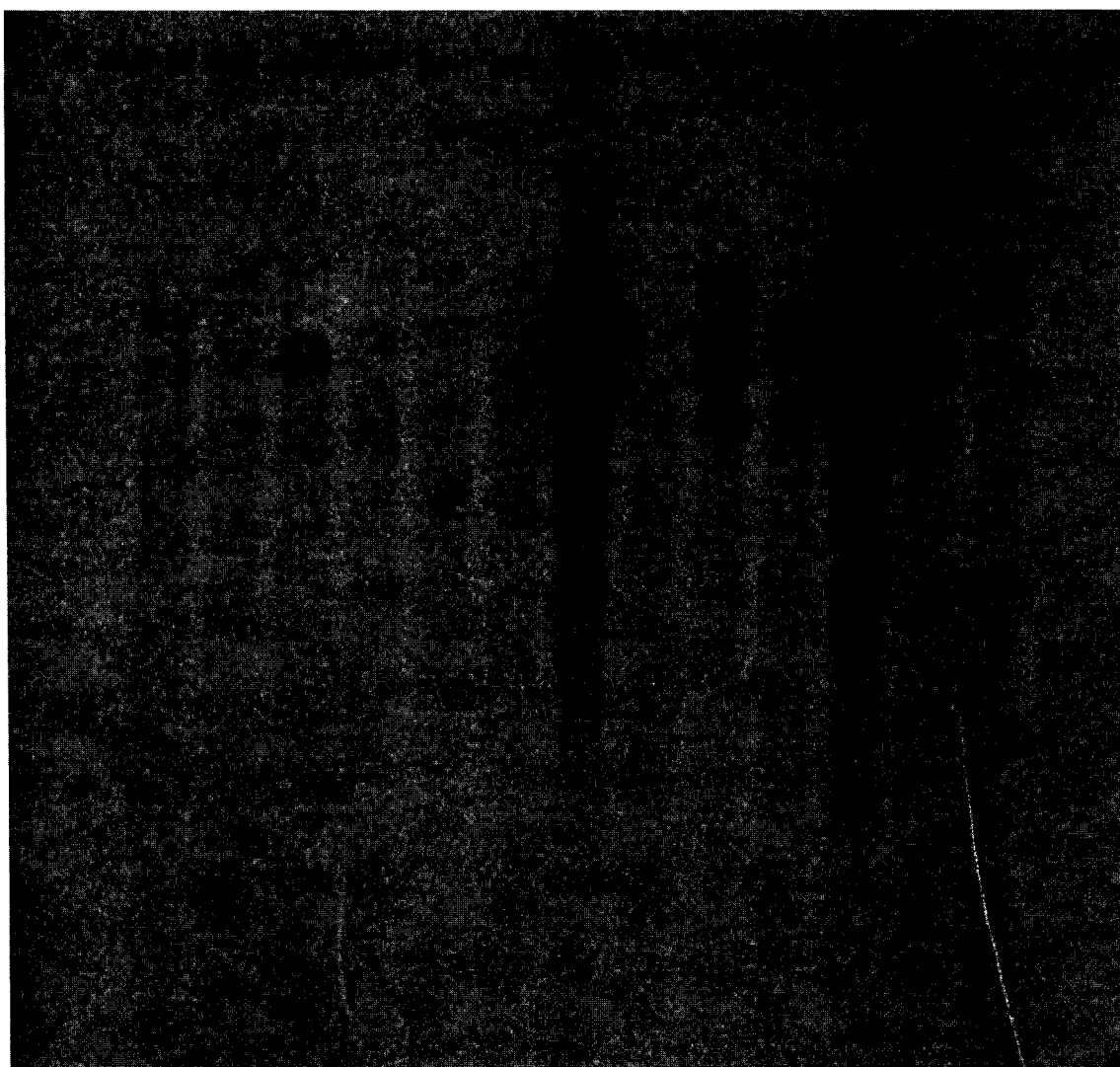
FIGURA 2



ES 2 381 349 A1

FIGURA 3

C L1 L2 L3 L4 L5 L6 L7 L8 L9 L10 L12 L13



ES 2 381 349 A1

FIGURA 4

CONTROL LÍNEA 5 LÍNEA 7



FIGURA 5

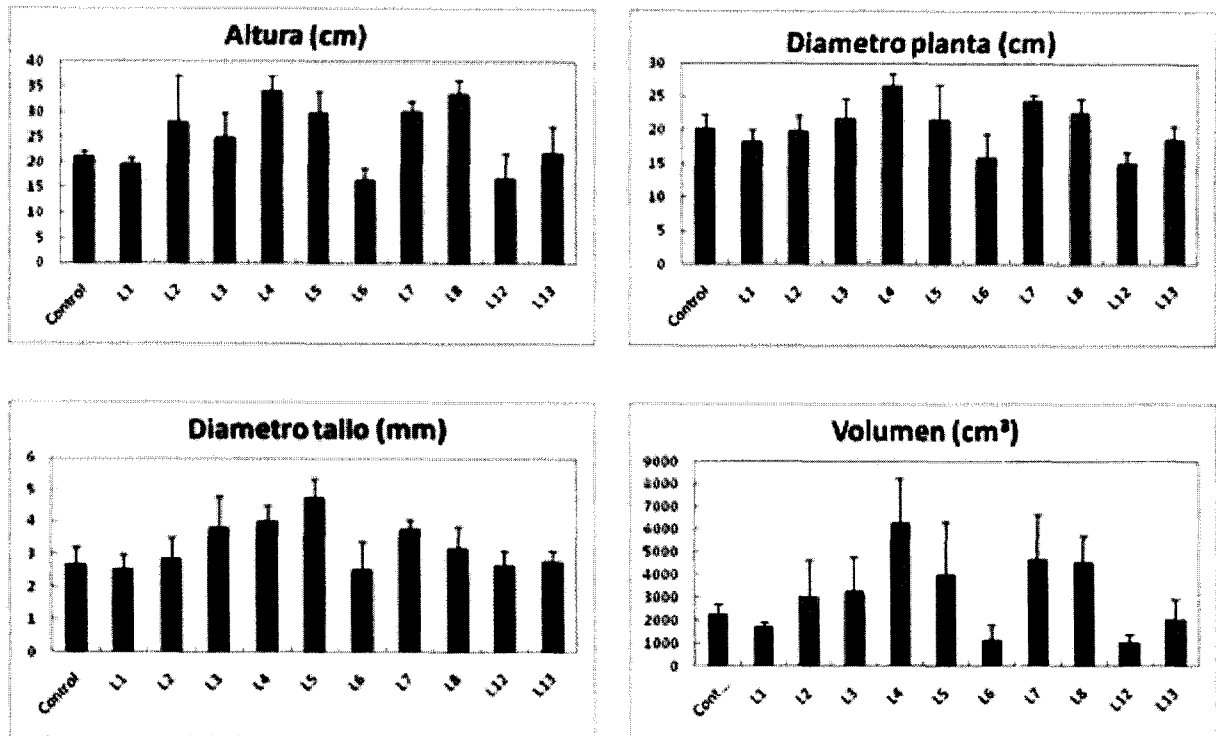


FIGURA 6

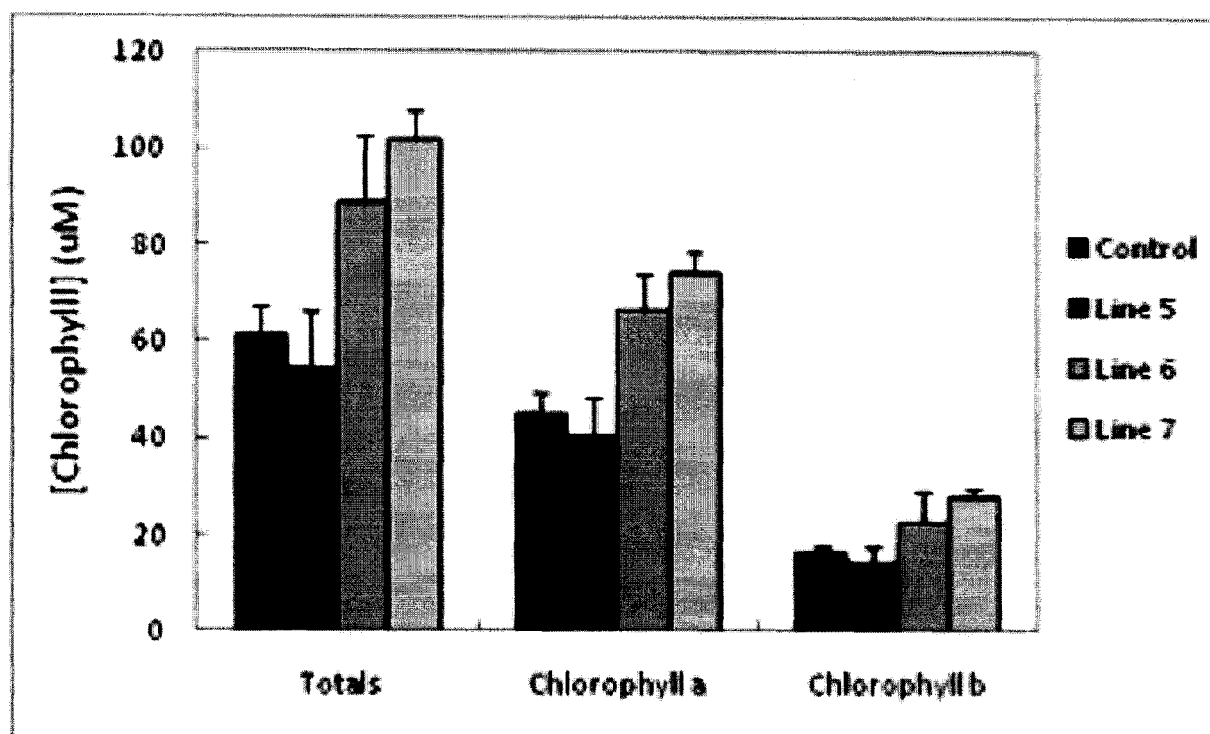


FIGURA 7

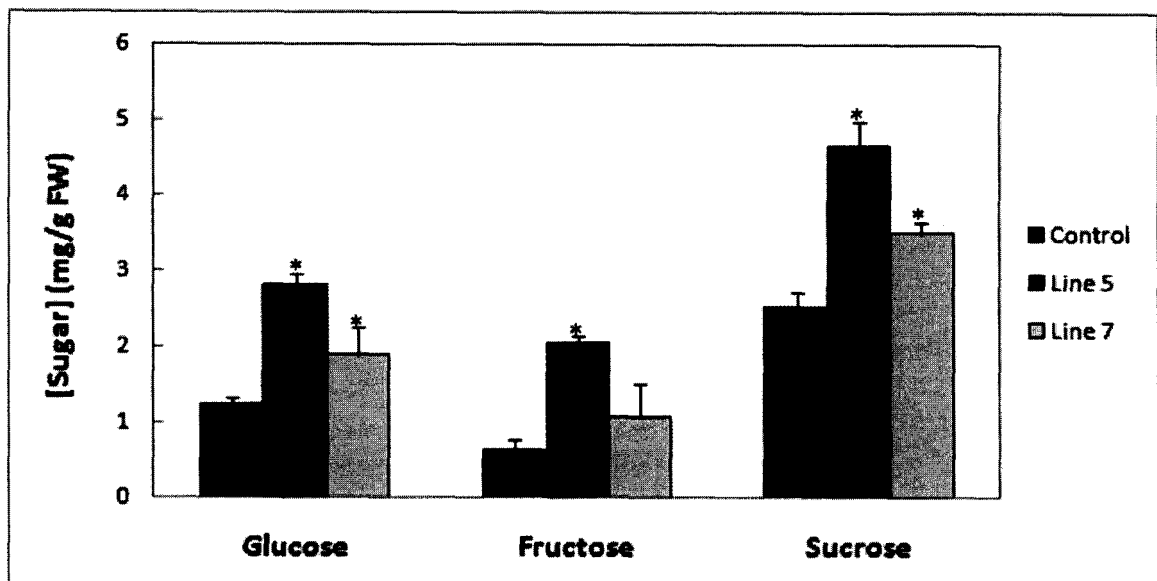
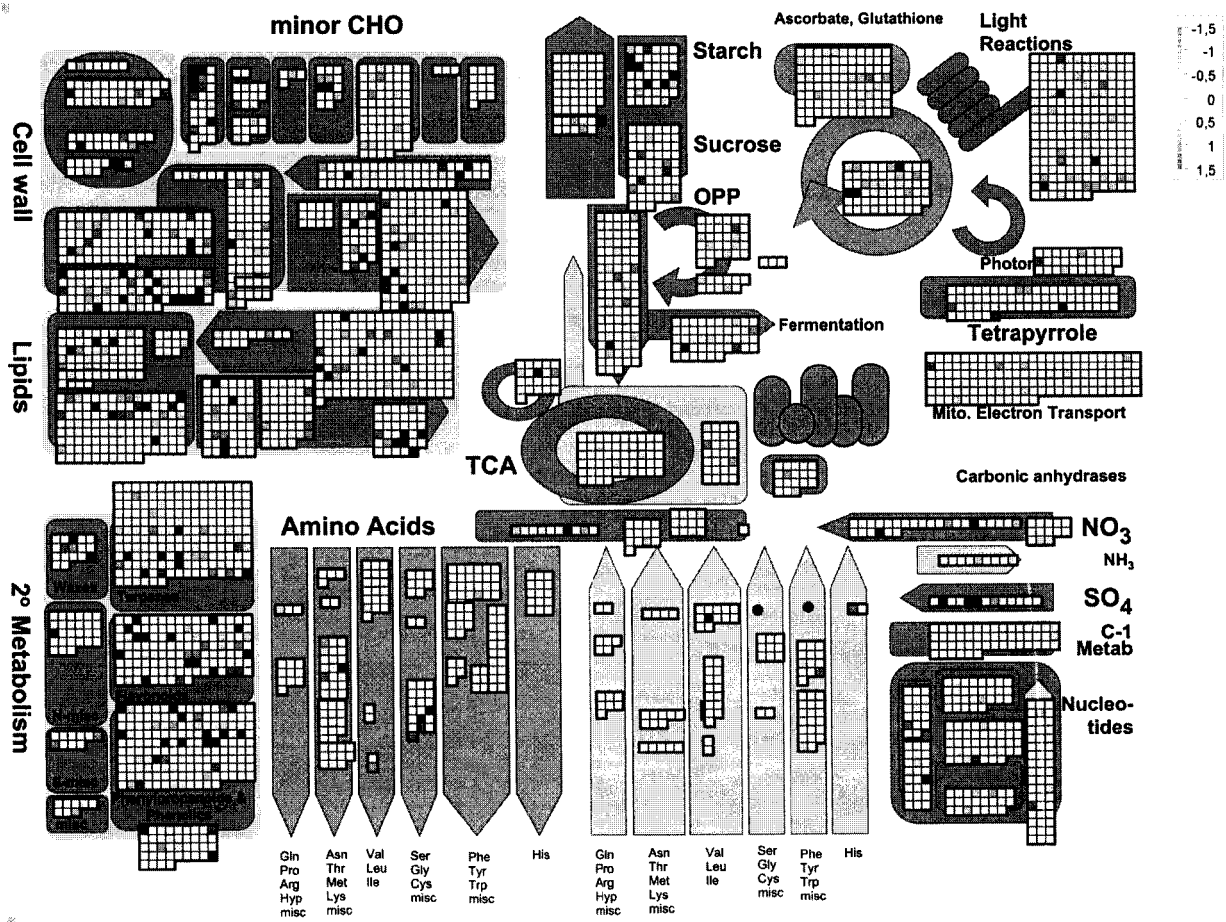


FIGURA 8



ES 2 381 349 A1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Málaga

5 <120> Árboles transgénicos con mayor cantidad de biomasa y de carbohidratos

<140> P201001411

10 <141> 2010-10-29

<160> 1

<210> 1

15 <211> 1743

<212> ADN

<213> *Pinus pinaster*

20 <400> 1

	ggcacgaggt gctgtctgcg ctgtgccgtg ctgtgtgtgg ccacagaatt cacaataggg	60
25	aattttatta atgctgagag gaataggtat ttgaaggatg aactgagggc gattttgggc	120
	ttgtgaatga acttagcctt agctccagag atgcaggtct cgagttcgag tttcgagggc	180
	atcccagata tggctgtagc ggttcagaat cttggcggga ggcgctctaa gccgcatccc	240
30	acacaggtac agaaatgcc gcgctgcat tcgctcaaca ccaagttctg ttattataac	300
	aactataatc tgctgcagcc tcgctatttc tgcaagaatt gcaggcggta ttggaccaa	360
35	ggcggagcct tgcgcaacgt tcctgttggg ggaggggtga ggaagaaca gcggtccaac	420
	aagcgggaatt ccgataaaag gcccgccgc tcctctgctg taccggctag tgccgccgat	480
40	aatcaggagc cgggcggagc ctccggccgc tcttcaagct cttcgctggt taacggatcg	540
	gataggagca gcatcggctt tgaatcagac tgcaataaca ccaccagag caccaccacc	600
	accaacaccg gcggcgctac cggcaccccc gccgggtgta gctccggcca actgttcgac	660
45	ggtatgaatc caatcaatcc gcctccgccg tcgctggatc ctcaagctcg cggcgcgctt	720
	ctgaactctg gtaacaatct gagctccatc ttagacccca gtgcttacga aaatgctcag	780
50	tttagctgca tggatcctgt aatcagcagt actccagatt ggagcagagg ctttaagcatg	840
	ccttgggaagc agcagcagac attgacgtca ttattaaccg atggcatcag aacgtcactg	900
55	gatggggttc tgagccagcc tccgccatta ttagaggaca ttaacagttt agcgggaagcc	960
	gctaccaggt ctgtatttgg ggtcaagact tcagcggcca cggctccgtg gccatcttta	1020
60	caggaggacg acaacattaa agctcagtcg cttcagggtc tcgaatggca gacggcgaac	1080
	ggtaacagta gcagtgcgc agggcttctt gaaatacaga gcgatcttgg gccatgggggt	1140
	gctggaagtt ggccagatct tggaaattat ggtccagggg gcagtttgcc atgatttttc	1200
65	tcagatcttt aatcttgact ccattaaacc agatgttttc cttttctttt ttccttttct	1260

ES 2 381 349 A1

ctttctttac tgataacaac ctacaggttc taaactccgt tttgcttcat tcctgaagac 1320
tccggtttga tcttttttgt taatgattca tatgtataag aggttttgag ttggggagcg 1380
5 tttttgtttt taaatctctg gtaagtaagt aacagcagga ggcattgtta ttatttatta 1440
ttcttttgta tagtttgctg tagggaagaa gaagaagaaa gaactataga tatgtgtatc 1500
10 tgtgtgctta tctacgtggt ctgctgcctc attcttttgt gtgtgcaaac aagttacctg 1560
tgaaaccaag aatgattct caatatagtt atatttttat gtaatgtaca gggccctctg 1620
15 tacagttggt tgatgaggaa aagtcctat ggcggtggtg aagaggcaaa accccattac 1680
tgtctgtgtg gaataattat tttgtttgct atgtaaaacc agaccagtgg attggagtac 1740
agt 1743
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201001411

②② Fecha de presentación de la solicitud: 29.10.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12N15/82** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 2006040685 A2 (SWETREE TECHNOLOGIES AB; HERTZBERG MAGNUS) 20.04.2006	1-4
A	WO 0009726 A1 (RUTGERS, THE STATE UNIVERSITY OF NEW JERSEY) 24.02.2000	1-4
A	US 20090288226 A1 (HALLAHAN DAVID L; KEIPER-HRYNKO NATALIE M) 19.11.2009	1-4
A	RUEDA-LÓPEZ et al. Differential regulation of two glutamine synthetase genes by a single Dof transcription factor.2008. <i>The Plant Journal</i> Vol. 56, páginas 73-85.	1-4

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
14.02.2012

Examinador
I. Rueda Molíns

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXT

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 14.02.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-4	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-4	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2006040685 A2 (SWETREE TECHNOLOGIES AB; HERTZBERG MAGNUS)	20.04.2006
D02	WO 0009726 A1 (RUTGERS, THE STATE UNIVERSITY OF NEW JERSEY)	24.02.2000
D03	US 20090288226 A1 (HALLAHAN DAVID L; KEIPER-HRYNKO NATALIE M)	19.11.2009
D04	RUEDA-LÓPEZ et al. Differential regulation of two glutamine synthetase genes by a single Dof transcription factor. <i>The Plant Journal</i> Vol. 56, páginas 73-85.	2008

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Artículos 6 y 8 LP11/1986)**

La solicitud de patente reivindica, en la reivindicación 1, árboles transgénicos con mayor crecimiento vegetativo, mayor altura, mayor volumen, mayor diámetro del tronco y contenido en biomasa que los árboles no transformados, caracterizados por la introducción del gen SEQ ID NO:1. En las reivindicaciones 2-4, de la solicitud de patente, se reivindica el uso de los citados árboles transgénicos para la producción de bioetanol, para la industria de la madera o del papel y para biorefinerías.

En los documentos D01, D02 y D03 se divulga cómo es posible aumentar el ritmo de crecimiento en especies leñosas mediante la obtención de especies leñosas transgénicas. Los transgenes empleados en los citados documentos, para conseguir dicho objetivo, no coinciden con la secuencia SEQ ID NO:1, empleada en la solicitud de patente. En el documento D04 se divulga una secuencia con número de acceso en EMBL AM884254 que presenta un 100% de identidad con la secuencia SEQ ID NO:1 empleada en la solicitud de patente. A partir de la información divulgada en los documentos D01, D02, D03 y D04 no resultaría evidente, para un experto en la materia, el empleo de la secuencia SEQ ID NO:1 para la obtención de árboles transgénicos con las características de mayor crecimiento vegetativo, mayor altura, mayor volumen, mayor diámetro del tronco y contenido en biomasa. Por tanto, las reivindicaciones 1-4 presentan novedad y actividad inventiva según lo establecido en los Artículos 6 y 8 LP11/1986.