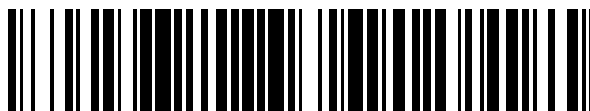


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 390 681**

51 Int. Cl.:
C12N 15/82 (2006.01)
C02F 3/32 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06822956 .6**
96 Fecha de presentación: **27.10.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1961815**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.08.2008**

54 Título: **Método de purificación de agua mediante una planta capaz de acumular fosfato inorgánico**

30 Prioridad:
27.10.2005 JP 2005313225

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
15.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
15.11.2012

73 Titular/es:
SUNTORY HOLDINGS LIMITED (100.0%)
1-40, DOJIMAHAMA 2-CHOME, KITA-KU
OSAKA 530-8203, JP

72 Inventor/es:
MATSUI, KEISUKE y
TOGAMI, JUNICHI

74 Agente/Representante:
UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 390 681 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método de purificación de agua mediante una planta capaz de acumular fosfato inorgánico

5 **Campo técnico**

La presente descripción se refiere a un organismo vegetal que acumula gran cantidad de fosfato inorgánico (por ejemplo, *Petunia*, *Torenia*) y al uso del mismo. En particular, la presente descripción se refiere a un método para producir un organismo vegetal que acumule gran cantidad de fosfato, en el que en el organismo vegetal se introduce un gen que codifica un factor de transcripción de un gen que está implicado en la reacción de falta de fosfato, a un organismo vegetal obtenido usando el método de producción y al uso del organismo vegetal para la purificación del agua.

15 **Técnica anterior**

Recientemente, junto con un aumento de sensibilización por el medio ambiente, la polución del agua se ha convertido en un gran problema. La necesidad de purificar el agua que se encuentra en la hidrosfera, tal como en ríos, lagos y estanques, ha aumentado. La polución del agua se produce principalmente por contaminación de sustancias tóxicas, tales como dioxina y metales pesados, por la afluencia excesiva de fósforo, nitrógeno, etc., y motivos similares.

Las cantidades excesivas de fósforo y de nitrógeno provienen del drenaje de campos de cultivo, de materiales de deshecho de ganado, alcantarillado, vertidos industriales y similares. Esto acelera la eutrofización de la hidrosfera, lo que conduce al crecimiento de productores primarios tales como algas y microorganismos que son causas directas de la generación de algas cianófitas-clorófitas, organismos de la marea roja, etc. Normalmente, un elemento que puede ser un factor limitante para los productores primarios es el nitrógeno o el fósforo. Sin embargo, en el agua, las algas fijadoras de nitrógeno están habitualmente presentes, y debido a las aguas residuales de la tierra, frecuentemente hay muchos iones de ácido nítrico en el agua. Por lo tanto, con respecto al crecimiento de productores primarios, un elemento generalmente limitante es el fósforo. El aire no suministra fósforo. Adicionalmente, dado que los iones fosfóricos multivalentes y cargados negativamente se unen fuertemente a partículas minerales en el suelo, el fósforo rara vez está contenido en el agua residual procedente de la tierra que no está fertilizada (véase T. G. Spiro et al., "Chikyu-kankyo no Kagaku (Chemistry of Global Environment)", Japan Scientific Societies Press, 2000). Por otra parte, el crecimiento de productores primarios puede suprimirse eficazmente eliminando el fósforo del agua.

La eutrofización de lagos, estanques, ríos y océanos debido a la fabricación diaria realizada por el ser humano se ha cuestionado desde hace bastante tiempo. En las actuales circunstancias, los iones inorgánicos (por ejemplo, fósforo, nitrógeno o similar) apenas se eliminan por tratamiento de aguas residuales usando el método de lodo activado, que normalmente se emplea en plantas de tratamiento de aguas residuales y por lo tanto la eutrofización no puede reducirse.

La eliminación del fósforo y del nitrógeno de las zonas acuáticas es un medio eficaz para solucionar el problema de la polución del agua. Con el fin de eliminar el fósforo y el nitrógeno, la purificación del agua se realiza usando diversos métodos tales como métodos físicos, métodos químicos y métodos biológicos. Se desea un método que sea económico y muy eficaz (Keinosuke Motohashi, "Suishitsu-Joka Manyuaru (Manual for Water purification)", Kaibundo Publishing Co., Ltd., 2001).

Los métodos físicos y químicos (por ejemplo, método electrolítico, método por cristalización, método de agregación/separación, etc.) son superiores en cuanto a la eficacia en la eliminación, pero requieren equipos complicados, el uso continuado de productos químicos y similar, dando como resultado un alto coste. En lo que respecta a los métodos biológicos, el método de lodo activado, el método Phostrip, (una técnica en la que el método de lodo activado se combina con la adición de agentes agregantes) y métodos similares se usan ampliamente. Sin embargo, recientemente, con los avances de las técnicas de purificación, ha surgido el problema del aumento de costes.

Generalmente se ha utilizado un método de purificación ambiental con plantas denominado fitorremediación. La utilización de plantas se ha intentado de manera activa en el campo de la purificación del agua ya que el fósforo y el nitrógeno, que son causantes de la contaminación del agua, son sustancias nutritivas esenciales para las plantas. Por lo tanto, las plantas absorben activamente estas sustancias desde sus raíces. Existen muchas publicaciones en las que se intentó la fitorremediación usando plantas acuáticas tales como el Jacinto y el Phragmites de agua, cuya capacidad para absorber el fósforo y el nitrógeno es relativamente alta y se desarrollan bien (Keinosuke Motohashi, "Suishitsu-Joka Manyuaru (Manual for Water purification)", Kaibundo Publishing Co., Ltd., 2001). Sin embargo, el alto coste de recolección de plantas acuáticas, tales como el Jacinto de agua, difícil de gestionar, incluye en el ecosistema y al igual se admiten como problemas. (Keinosuke Motohashi, "Suishitsu-Joka Manyuaru (Manual for Water purification)", Kaibundo Publishing Co., Ltd., 2001). Otro problema es que, dado que la mayoría de la biomasa vegetal recolectada no puede utilizarse eficazmente y por lo tanto requiere desecharse, se requiere un gasto

adicional. Si la biomasa recolectada pudiera usarse directamente como un fertilizante, sería un método de procesamiento asequible. Sin embargo, la capacidad de absorción de las plantas existentes que se utilizan en la purificación tiene limitaciones y por lo tanto el contenido de fósforo y nitrógeno en su interior es bajo. Por esta razón, tales plantas no pueden usarse como fertilizantes.

Se ha desarrollado un aparato de cultivo hidropónico que utiliza flores terrestres y plantas ornamentales para combinar fines estéticos con purificación (véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente Japonesa abierta a inspección pública N° Hei 9-56278). Sin embargo, hasta el momento, no hay ningún método eficaz para el tratamiento de biomasa vegetal después de la floración.

Existe un ejemplo conocido en el que se usaron vegetales para la purificación del agua y se intentó una utilización eficaz de las plantas recolectadas. Sin embargo, es poco probable que el público consumidor acepte gustosamente vegetales que crezcan en zonas acuáticas contaminadas.

Se han realizado estudios para aclarar cómo las plantas absorben, acumulan y utilizan el fósforo. El fósforo es una sustancia nutritiva esencial para las plantas. El fosfato se introduce inicialmente en una planta desde sus raíces, se transporta a un vaso y después se suministra a la parte aérea para utilizarse. El fosfato está implicado en muchos fenómenos vitales y se utiliza cambiando en forma de fosfolípidos, nucleótidos, proteínas fosforiladas o formas similares. En las células, el fosfato se acumula en las vacuolas y se suministra al citoplasma de acuerdo con las necesidades. En las semillas, el fosfato se acumula en forma de inositol hexafosfato (ácido fítico) más estable.

Las plantas solo pueden asimilar el fósforo en forma de fosfato inorgánico (en lo sucesivo en el presente documento denominado "fosfato"). Otras formas de fósforo, tales como fosfato orgánico insoluble, no pueden ser asimiladas por las plantas. En general, la concentración de fosfato en el suelo es baja y es deficiente para las plantas. En tales circunstancias, las plantas han desarrollado sistemas para asimilar agresivamente el fosfato. Una proteína clave para asimilar el fosfato en las plantas desde sus raíces es el transportador de fosfato, que se encuentra en la membrana celular. En lo que respecta a *Arabidopsis*, se conocen 9 transportadores de alta afinidad y 1 transportador localizado en los cloroplastos. En una célula de *Nicotiana* cultivada se describió que la captación del fosfato se aceleró por la sobreexpresión del PHT1, un transportador de fosfato con alta afinidad localizado en la membrana celular, lo que condujo a un aumento en la tasa de crecimiento de la célula (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94,7098-7102,1997). Sin embargo, también se describió que, cuando un transportador de fosfato se sobreexpresaba en un organismo vegetal de *Hordeum vulgare*, no se observaba aumento en la captación de fosfato. (Func. Plant Biol. 31, 141-148, 2004). Se considera que solamente el aumento en el número de transportadores de fosfato no conduce al aumento en la cantidad de captación de fosfato. Entre los 9 transportadores de fosfato de alta afinidad anteriores, 2 tipos se expresaban con fuerza en las raíces y se confirmó que los otros transportadores se expresaban en los órganos florales y similares. Por lo tanto, se consideró que los transportadores de fosfato actuaban para el transporte dentro de una planta (Plant Physiol. 130, 221-233, 2002). En una planta, el fosfato se transfiere desde una hoja vieja a una hoja nueva con el fin de una utilización eficaz. Se considera que los transportadores también están implicados en este fenómeno.

Se han identificado otros genes diversos relacionados con los transportadores de fosfato analizando mutantes usando *Arabidopsis* (Trends Plant Sci. 9,548-555, 2004). La mayoría de los fosfatos asimilados desde las raíces se transportan a la parte aérea mediante vasos para su utilización. Sin embargo, en el caso del mutante PHO1, el transporte a la parte aérea está inhibido. Esto indica que la proteína PHO1 actúa transportando a los vasos los fosfatos absorbidos desde las células de las raíces. En el caso del mutante pho2, el fosfato se acumula excesivamente en la parte aérea. Se considera que el gen PHO2 codifica la proteína que controla el transporte desde las raíces a la parte aérea. Por tanto, aunque se han aclarado algunos genes asociados con el transporte del fosfato en las plantas, aún hay muchos puntos dudosos en cuanto a detalles de nivel molecular de la captación del fosfato de las plantas.

Contra la falta de fosfato, las plantas intentan, en la medida de lo posible, asimilar el fosfato desde el exterior empleando diversas estrategias (Annals Botany, 94 323-332, 2004). Cuando las plantas perciben el estado de falta de fosfato, liberan ácido orgánico (por ejemplo, ácido cítrico) y fosfatasa ácida desde las raíces al suelo, convirtiendo el fosfato orgánico insoluble en fosfato inorgánico soluble y tratando de absorberlo. En el estado de falta de fosfato, la forma de las raíces cambia, es decir, la cantidad de raíces laterales aumenta, los pelos radiculares se extienden y como resultado, puede absorberse un amplio intervalo de concentración de fosfato. Además, se sabe que la falta de fosfato influye en el sistema metabólico en las plantas, y que como resultado, hay casos en los que la expresión de genes del sistema fotosintético está suprimida y la acumulación de antocianina está aumentada. La actividad nucleasa y fosfatasa en las células también está aumentada y el fósforo existente en las células se reutiliza.

Tal serie de reacciones de las plantas contra la falta de fosfato se produce cuando las plantas perciben el estado de falta de fosfato. La aclaración de factores controladores y mecanismos controladores de estas reacciones ha sido esperada, pero sus descubrimientos siguen siendo limitados. Aunque se han identificado muchos genes relacionados con el fosfato (Trends Plant Sci. 9,548-555, 2004), no hay ninguna publicación conocida que describa que la capacidad de absorber fosfato aumente introduciendo genes en las plantas.

Descripción de la invención

5 En las circunstancias descritas anteriormente, se desea un método de purificación económico y muy eficaz. En particular, se desea un método para aumentar la capacidad de las plantas para acumular fósforo para utilizarse en la purificación y una planta cuya capacidad de acumulación de fósforo esté aumentada.

10 A la vista de los problemas descritos anteriormente, los autores de la presente invención han realizado un estudio intenso. El gen del factor de transcripción PHR1 de tipo Myb derivado de *Arabidopsis* se conectó cadena abajo del promotor de expresión constitutivo, adicionalmente a ello se añadió un terminador y se pusieron en el mismo vector para preparar un vector de expresión recombinante. Introduciendo el vector preparado en *Petunia* y *Torenia*, plantas que acumulan fosfato en grandes cantidades, se prepararon plantas con éxito. La presente invención proporciona un método de purificación de agua como se define en las reivindicaciones.

15 Adicionalmente se describe:

(1) Un organismo vegetal que se transforma para expresar un gen que codifica un factor de transcripción de un gen implicado en la reacción de falta de fosfato.

20 (2) El organismo vegetal de acuerdo con el punto (1) anterior, en el que el factor de transcripción del gen implicado en la reacción de falta de fosfato es el factor de transcripción PHR1 de tipo Myb derivado de *Arabidopsis*

(3) El organismo vegetal de acuerdo con el punto (2) anterior, en el que el factor de transcripción PHR1 de tipo Myb es:

25 (a) una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 2; o

30 (b) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos en la que uno o más aminoácidos están sustituidos, suprimidos, insertados y/o añadidos en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 2 y que tiene la función de activar un gen de respuesta a la falta de fosfato.

(4) El organismo vegetal de acuerdo con el punto (1) anterior en el que el gen que codifica el factor de transcripción del gen implicado en la reacción de falta de fosfato es:

35 (c) un gen que comprende una fase de lectura abierta de la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEC ID N°: 1; o

40 (d) un gen que, en condiciones rigurosas, se hibrida con un polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEC ID N°: 1 o la secuencia de nucleótidos de la fase de lectura abierta de la misma y que codifica una proteína que tiene la función de activar un gen de respuesta a la falta de fosfato.

45 (5) El organismo vegetal de acuerdo con cualquiera de los puntos (1) a (4) anteriores, en el que el organismo vegetal es *Petunia*, *Torenia*, *Verbena*, *Nicotiana*, *Rosa*, *Impatiens*, *Begonia* o *Nierembergia*.

(6) Un método para producir un organismo vegetal que comprende transformar el organismo vegetal para expresar un gen que codifique un factor de transcripción de un gen implicado en la reacción de falta de fosfato.

50 (7) El método de acuerdo con el punto (6) anterior, en el que el organismo vegetal se transforma introduciendo, en el organismo vegetal, un vector de expresión recombinante que comprende el gen que codifica el factor de transcripción del gen implicado en la reacción de falta de fosfato..

(8) El método de acuerdo con los puntos (6) o (7) anteriores en el que el factor de transcripción implicado en la acumulación de fósforo es el factor de transcripción PHR1 de tipo Myb derivado de *Arabidopsis*.

55 (9) El método de acuerdo con el punto (8) anterior, en el que el factor de transcripción PHR1 de tipo Myb es:

(c) una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 2; o

60 (d) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos en la que uno o más aminoácidos están sustituidos, suprimidos, insertados y/o añadidos en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 2 y que tiene la función de activar un gen de respuesta a la falta de fosfato.

65 (10) El método de acuerdo con los puntos (6) o (7) anteriores, en el que el gen que codifica el factor de transcripción del gen implicado en la reacción de falta de fosfato es:

(a) un gen que comprende una fase de lectura abierta de la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEC ID N°: 1; o

5 (b) un gen que, en condiciones rigurosas, se hibrida con un polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria con la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEC ID N°: 1 o la secuencia de nucleótidos de la fase de lectura abierta de la misma y que codifica una proteína que tiene la función de activar un gen de respuesta a la falta de fosfato.

10 (11) El método de acuerdo con cualquiera de los puntos (6) a (10) anteriores en el que el organismo vegetal es *Petunia*.

(12) El método de acuerdo con cualquiera de los puntos (6) a (10) anteriores en el que el organismo vegetal es *Torenia*.

15 (13) Un organismo vegetal producido usando el método de acuerdo con cualquiera de los puntos (6) a (12) anteriores.

20 (14) Un vector de expresión recombinante que comprende un gen que codifica un factor de transcripción de un gen implicado en la reacción de falta de fosfato, que está constituido de manera que el vector puede expresar el gen que codifica el factor de transcripción cuando se introduce en una planta.

(15) El vector de acuerdo con el punto (14) anterior en el que el factor de transcripción del gen implicado en la reacción de falta de fosfato es el factor de transcripción PHR1 de tipo Myb derivado de *Arabidopsis*.

25 (16) El vector de acuerdo con el punto (15) anterior, en el que el factor de transcripción PHR1 de tipo Myb es:

(a) una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 2; o

30 (d) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos en la que uno o más aminoácidos están sustituidos, suprimidos, insertados y/o añadidos en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 2 y que tiene la función de activar un gen de respuesta a la falta de fosfato.

35 (17) El vector de acuerdo con el punto (14) anterior, en el que el gen que codifica el factor de transcripción del gen implicado en la reacción de falta de fosfato es:

(a) un gen que comprende una fase de lectura abierta de la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEC ID N°: 1; o

40 (b) un gen que, en condiciones rigurosas, se hibrida con un polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria con la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEC ID N°: 1 o la secuencia de nucleótidos de la fase de lectura abierta de la misma y que codifica una proteína que tiene la función de activar un gen de respuesta a la falta de fosfato.

45 (18) Un material reproductor para la planta de acuerdo con cualquiera de los puntos (1) a (5) anteriores o punto (13) anterior.

(19) Un método de purificación de agua que comprende eliminar el exceso de fósforo en la hidrosfera usando la planta de acuerdo con cualquiera de los puntos (1) a (5) anteriores o punto (13) anterior.

50 (20) Una célula vegetal, que se transforma introduciendo el vector de acuerdo con cualquiera de los puntos (14) a (17) anteriores, y mediante el cual puede regenerarse una planta.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un método de purificación de agua económico y muy eficaz como se define en las reivindicaciones.

55 De acuerdo con el método, tal y como se describe en el presente documento, la cantidad de acumulación de fósforo en las plantas puede aumentarse usando tecnología de recombinación genética. De acuerdo con la presente descripción se proporciona una planta para la purificación de agua, que es ventajosa para aplicación práctica, y un método para su preparación.

60 La mejora de la capacidad de purificación del agua y de la capacidad para reutilizar el fosfato pueden realizarse usando la planta, tal y como se describe en el presente documento, en la aumenta la cantidad de acumulación de fósforo.

65 Además, de acuerdo con el método tal y como se describe en el presente documento, la capacidad de acumulación de fosfato de las flores y de las plantas ornamentales para jardinería, puede aumentarse mediante la introducción de

genes y por lo tanto la purificación del agua también puede realizarse usando plantas que son hermosas y que tienen una alta capacidad de purificación.

5 Actualmente, el 80% o más de la cantidad de fósforo importado se usa como fertilizante. Es más razonable reducir el fósforo absorbido por las plantas para fertilizar. Cuando la cantidad de acumulación de fósforo por planta aumenta las propias plantas pueden utilizarse como fertilizante de fósforo. Por lo tanto, cuando el organismo vegetal se utiliza, como se describe en el presente documento, con una alta acumulación de fosfato, la biomasa recolectada puede convertirse en fertilizante y adicionalmente puede utilizarse eficazmente para la extracción de fósforo. Introduciendo genes en una planta existente que tenga una alta capacidad de acumulación de fosfato, usando el método para producir una planta que acumula gran cantidad de fosfato, también puede prepararse una planta que acumule más fosfato.

Breve descripción de los dibujos

15 La Figura 1 es un gráfico que muestra la cantidad de acumulación de fosfato en una hoja de *Torenia* de la presente invención transformada. El eje longitudinal del gráfico muestra la cantidad de fosfato (mg/gPF).

20 La Figura 2 es un gráfico que muestra la cantidad de acumulación de fosfato en una hoja de *Petunia* de la presente invención transformada. El eje longitudinal del gráfico muestra la cantidad de fosfato (mg/gPF).

La Figura 3 es un gráfico que muestra la cantidad de acumulación de fosfato en una hoja de *Torenia* de la presente invención transformada cultivada hidropónicamente. El eje longitudinal del gráfico muestra la cantidad de fosfato (mg/gPF).

25 La Figura 4 es un gráfico que muestra la cantidad de acumulación de fosfato por peso seco de la parte aérea en *Torenia* de la presente invención transformada cultivada hidropónicamente. El eje longitudinal del gráfico muestra la cantidad de fosfato (mg/gPS).

30 La Figura 5 es un gráfico que muestra cambios diarios de la concentración de fosfato en una solución hidropónica en la que se cultiva la *Torenia* de la presente invención transformada. El eje longitudinal del gráfico muestra la concentración de fosfato (mg/l) y el eje horizontal muestra el número de días después del cambio de la solución hidropónica.

35 La Figura 6 es un gráfico que muestra la cantidad de acumulación de fosfato en una hoja de *Torenia* de la presente invención transformada cultivada hidropónicamente. El eje longitudinal del gráfico muestra la cantidad de fosfato (mg/gPF).

40 La Figura 7 es un gráfico que muestra el peso fresco de la parte aérea de la *Torenia* de la presente invención transformada cultivada hidropónicamente. El eje longitudinal del gráfico muestra el peso (g).

La Figura 8 es un gráfico que muestra la cantidad de acumulación de fosfato en una hoja de *Nicotiana* de la presente invención transformada. El eje longitudinal del gráfico muestra la cantidad de fosfato (mg/gPF).

45 La Figura 9 es un gráfico que muestra la cantidad de acumulación de fosfato en una hoja de *Verbena* de la presente invención transformada. El eje longitudinal del gráfico muestra la cantidad de fosfato (mg/gPF).

Mejores modos para realizar la invención

50 A continuación, se describe con detalle la presente invención.

Uno de los factores de control conocidos que actúan cuando las plantas se encuentran en el estado de falta de fosfato es el gen PHR1 de *Arabidopsis*. El gen PHR1 codifica un factor de transcripción, que se considera que activa la transcripción de genes relacionados con fosfato en respuesta al estado de falta de fosfato (Gene Dev. 15, 2122-2133, 2001). En el caso del mutante *phr1*, no se observa la reacción de falta de fosfato, tal como acumulación de antocianina, y se reduce la transcripción de una pluralidad de genes relacionados con el fosfato. Por lo tanto, se considera que el gen PHR1 se localiza cadena arriba de la reacción de falta de fosfato y aumenta la actividad de transcripción de algunos genes para aumentar la capacidad de las plantas para asimilar el fosfato. Los autores de la presente invención piensan que, si el estado de falta de fosfato de una planta puede mantenerse introduciendo tal factor de control de reacción de falta de fosfato en la planta, puede prepararse una planta que absorba fosfato más eficazmente. De hecho, los autores de la presente invención introdujeron un factor de control en una planta, y como resultado, se confirmó una alta acumulación de fosfato consumando por tanto la presente invención.

65 Es decir, la presente descripción proporciona un organismo vegetal que acumula gran cantidad de fosfato, que se transforma de manera que expresa un gen que codifica un factor de transcripción de un gen implicado en la reacción de falta de fosfato.

La expresión “reacción de falta de fosfato”, como se usa en el presente documento, se refiere a una serie de reacciones de ajuste para obtener la cantidad de fosfato necesaria, que se observan en una planta cuando la planta se mantiene en el estado de falta de fosfato. Los ejemplos de reacciones de ajuste incluyen una reacción en la que una planta libera ácido orgánico (por ejemplo, ácido cítrico) y fosfatasa ácida de las raíces al suelo cuando percibe el estado de falta de fosfato, convierte el fosfato orgánico insoluble en fosfato inorgánico soluble y trata de absorberlo. En el estado de falta de fosfato, la forma de las raíces cambia, es decir, la cantidad de raíces laterales aumenta, los pelos radiculares se extienden y como resultado, puede absorberse un amplio intervalo de concentración de fosfato. Además, se sabe que la falta de fosfato influye en el sistema metabólico en las plantas, y que como resultado, hay casos en los que la expresión de genes del sistema fotosintético está suprimida y la acumulación de antocianina está aumentada. La actividad nucleasa y fosfatasa en las células también está aumentada y el fósforo existente en las células se reutiliza. La expresión “reacción de falta de fosfato” incluye tal serie de reacciones que se producen cuando una planta percibe el estado de falta de fosfato.

La expresión “gen implicado en la reacción de falta de fosfato”, como se usa en el presente documento, se refiere a un gen que codifica una proteína implicada en un mecanismo en el que una planta toma y acumula fosfato en el estado de falta de fosfato. Por ejemplo, un gen que codifica un transportador de fosfato, presente en la membrana celular de la planta, se incluye en la expresión “gen implicado en la reacción de falta de fosfato”. Ejemplos típicos de los mismos incluyen los 9 transportadores de alta afinidad (por ejemplo, PHT1) y 1 transportador localizado en los cloroplastos de *Arabidopsis*. Sin embargo, el “gen implicado en la reacción de falta de fosfato” no se limita a esto. En cuanto al aumento o disminución en la expresión de genes, se confirma que todos los genes en el estado de falta de fosfato se incluyen en la expresión “gen implicado en la reacción de falta de fosfato”. Obsérvese que la frase “gen de respuesta a la falta de fosfato”, como se usa en el presente documento, se considera sinónima a la frase “gen implicado en la reacción de falta de fosfato”.

La expresión “factor de transcripción de un gen implicado en la reacción de falta de fosfato”, como se usa en el presente documento, se refiere a un factor que controla la transcripción del gen implicado en la reacción de falta de fosfato descrito anteriormente dentro de organismos vegetales. El “factor que controla la transcripción” incluye factores que suprimen o activan la transcripción, pero en la presente invención, esto se refiere principalmente a factores que activan la transcripción. Sin embargo, cuando un factor que suprime la transcripción finalmente actúa promoviendo la reacción de falta de fosfato suprimiendo la transcripción de un gen implicado en la reacción de falta de fosfato, el factor se incluye en la expresión “factor de transcripción de un gen implicado en la reacción de falta de fosfato”, utilizada en la presente memoria descriptiva. En general, un “factor de transcripción” actúa con la formación de complejos de proteína, pero en la presente invención, esto se refiere principalmente a una proteína o péptido que es un componente de complejos de proteína. Los ejemplos típicos del “factor de transcripción de un gen implicado en la reacción de falta de fosfato” incluyen, pero sin limitación, el factor de transcripción PHR1 de tipo Myb derivado de *Arabidopsis* (SEC ID N°: 2). En la expresión “factor de transcripción de un gen implicado en la reacción de falta de fosfato”, utilizada en la presente memoria descriptiva, también se incluye una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos en la que uno o más aminoácidos (por ejemplo, de 1 a 20, de 1 a 10 o de 1 a varios (por ejemplo, 6)) están sustituidos, suprimidos, insertados y/o añadidos en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 2 y que tiene la función de activar o suprimir un gen de respuesta a la falta de fosfato.

La expresión “gen que codifica un factor de transcripción de un gen implicado en la reacción de falta de fosfato”, como se usa en el presente documento, se refiere a un gen que codifica el factor de transcripción, descrito anteriormente, de un gen implicado en la reacción de falta de fosfato. Los ejemplos típicos del “gen que codifica un factor de transcripción de un gen implicado en la reacción de falta de fosfato” incluyen, pero sin limitación, el gen del factor de transcripción PHR1 similar a Myb derivado de *Arabidopsis* (N° de Acceso en el Genbank AJ310799: SEC ID N°: 1). En la expresión “gen que codifica un factor de transcripción de un gen implicado en la reacción de falta de fosfato” también se incluye un derivado del gen PHR1, descrito anteriormente, por ejemplo, (a) un gen que comprende una fase de lectura abierta (o CDS) de la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEC ID N°: 1; o (b) un gen que, en condiciones rigurosas, se hibrida con un polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria con la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEC ID N°: 1 o la secuencia de nucleótidos de la fase de lectura abierta de la misma, y que codifica una proteína que tiene la función de activar o suprimir un gen de respuesta a la falta de fosfato.

La hibridación puede realizarse usando un método de conocimiento público o un método de acuerdo con ello, por ejemplo, un método descrito en Molecular Cloning, tercera edición, J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press. 2001. Cuando se usa una biblioteca comercialmente disponible, la hibridación puede realizarse de acuerdo con el método descrito en las instrucciones de uso adjuntas al mismo, La frase “en condiciones rigurosas” significa, por ejemplo, condiciones en las que la concentración de sodio es de aproximadamente 19 a 40 mM, preferentemente de aproximadamente 19 a 20 mM y la temperatura es de aproximadamente 50 a 70 °C, preferentemente de aproximadamente 60 a 65 °C. Específicamente, es más preferible el caso en el que la concentración de sodio es de aproximadamente 19 mM y la temperatura es de aproximadamente 65 °C.

La frase “transformado para expresar un gen”, como se usa en el presente documento, significa que la transformación se realiza de tal forma que un gen se exprese de manera transitoria o estable. Preferentemente, la frase significa que la transformación se realiza para asegurar una expresión estable.

La transformación de las plantas normalmente se realiza mediante modificación por ingeniería genética, introduciendo un vector de expresión que lleva un gen deseado en una planta. Adicionalmente, se proporciona un vector de expresión recombinante que comprende un gen que codifica un factor de transcripción de un gen implicado en la reacción de falta de fosfato.

Normalmente, el vector, como se describe en el presente documento, comprende una región adecuada del control de la expresión, un origen de replicación, etc., tal como un promotor, un terminador, etc. dependiendo del tipo de hospedador en el cual vaya a introducirse el vector. Por ejemplo, para expresar un gen en una célula vegetal, se prepara una molécula de ADN (casete de expresión), que tenga (1) un promotor que pueda actuar en una célula vegetal; (2) un gen; y (3) un terminador que pueda actuar en una célula vegetal en forma funcional y la molécula de ADN se introduce en la célula vegetal. Dicha molécula de ADN puede contener una secuencia de ADN para potenciar adicionalmente la transcripción, por ejemplo, una secuencia potenciadora, además de un promotor. Los ejemplos de promotores utilizados no están particularmente limitados, siempre que actúen en células vegetales, e incluyen, por ejemplo, el promotor 35S (Shcell, J. S., 1987, Science, 237: 1176-1183), Nos (Schell, J. S., 1987, Science, 237: 1176-1183), rbcS (Benefy, P. N. y N-H. Chua, 1989, Science, 244: 174-181), PR1a (Ohshima, M. et al., 1990, Plant Cell, 2: 95-106), ADH (Benefy, P. N. y N-H. Chua, 1989, Science, 244:174-181), patatina (Benefy, P. N. y N-H. Chua, 1989, Science, 244:174-181), Cab (Benefy, P. N. y N-H.Chua, 1989, Science, 244: 174-181) y PAL (Lian, X. et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 9284-9288), etc.

La construcción de los vectores descritos anteriormente puede realizarse de acuerdo con métodos habituales usando enzimas de restricción conocidas públicamente y similares. Por ejemplo, cuando se usa *Agrobacterium*, puede usarse un vector binario tal como pBI121, y cuando se usa un pistola de partículas, puede usarse un vector de *E. coli* tal como pUC19. Adicionalmente, por ejemplo, seleccionando una célula vegetal transformada con el vector usando un gen marcador, tal como un gen resistente a antibióticos, y rediferenciando la célula vegetal usando condiciones, tales como una hormona vegetal adecuada, puede obtenerse un organismo vegetal transformado con un gen diana. Obsérvese que el término "planta", como se usa en el presente documento, se considera como un sinónimo de la expresión "organismo vegetal".

La introducción de un vector en una célula vegetal puede realizarse usando distintos métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, pueden usarse métodos de introducción indirecta, utilizando *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium rhizogenes*, etc. (Heiei, Y et al., Plant J., 6, 271 -282, 1994; Takaiwa, F. et al., Plant Sci. 111, 39-49, 1995), y métodos de introducción directa tipificados por métodos de electroporación (Tada, Y et al., Theor. Appl. Genet, 80, 475, 1990), métodos con polietilenglicol (Datta, S. K. et al., Plant Mol Biol., 20, 619-629, 1992), métodos con pistolas de partículas (Christou, P. et al., Plant J. 2,275-281,1992; Fromm, M. E., Bio/Technology, 8, 833-839, 1990), etc. Los ejemplos de células vegetales en las que se aplica la introducción de genes no están particularmente limitados siempre y cuando un organismo vegetal pueda regenerarse a partir de ello e incluyen, por ejemplo, células cultivadas en suspensión, callos, protoplastos, células que constituyen un corte de una hoja y similares. Adicionalmente se proporciona una célula vegetal que se transforma de tal manera que exprese el gen que codifica un factor de transcripción de un gen implicado en la reacción de falta de fosfato y a partir del cual puede regenerarse un organismo vegetal.

Una célula vegetal transformada puede someterse a regeneración para producir un organismo vegetal. Una planta transgénica transformada puede prepararse por este medio. De la misma manera, puede prepararse un organismo vegetal que acumule gran cantidad de fosfato, que se transforme de tal manera que exprese el gen que codifica un factor de transcripción de un gen implicado en la reacción de falta de fosfato.

Adicionalmente se proporciona un método para producir un organismo vegetal que acumule gran cantidad de fosfato, que comprende transformar un organismo vegetal de tal manera que exprese un gen que codifica un factor de transcripción de un gen implicado en la reacción de falta de fosfato. Preferentemente, el organismo vegetal descrito anteriormente se transforma introduciendo, en el organismo vegetal, un vector de expresión recombinante, que comprende el gen que codifica un factor de transcripción, descrito anteriormente, de un gen implicado en la reacción de falta de fosfato.

Los ejemplos de especies de plantas preferibles para la transformación con el vector incluyen aquellas plantas cuyo transformante puede obtenerse. Específicamente, los ejemplos de tales especies de plantas incluyen, *Petunia*, *Torenia*, *Verbena*, *Nicotiana*, *Rosa*, *Impatiens*, *Begonia*, *Nierembergia*, *crisantemo*, *clavel*, *antirrino*, *ciclamen*, *orquídea*, *Eustoma russellianum*, *Freesia*, *Gerbera*, *gladiolo*, *Gypsophila*, *Kalanchoe*, *lirio*, *pelargonio*, *geranio*, *tulipán* y similares. Prefiriéndose, en particular, *Petunia*, *Torenia*, *Verbena*, *Nicotiana*, *Rosa*, *Impatiens*, *Begonia* y *Nierembergia*. Entre estas, se desean especies vegetales que tengan una alta tasa crecimiento y una alta concentración de fósforo en los organismos vegetales y cuyo crecimiento se adapte a un amplio intervalo de concentración de fosfato en agua.

Además de organismos vegetales, en los que el fosfato se acumula en gran cantidad, como resultado de introducir el vector de la presente invención en los organismos vegetales y expresar el vector en su interior, también se incluyen organismos vegetales obtenidos a partir de materiales reproductores de los mismos (por ejemplo semillas,

generaciones futuras, flores cortadas, raíces tuberosas, tubérculos de tallo, espigas, etc.).

Adicionalmente se proporciona un método de purificación de agua que comprende eliminar el exceso de fósforo en la hidrosfera usando la planta descrita anteriormente.

La frase "exceso de fósforo en la hidrosfera", como se usa en el presente documento, se refiere a concentraciones de fósforo mayores que la concentración a nivel, o por debajo, cuyo equilibrio entre los productores primarios y productores secundarios puede mantenerse. Específicamente, la frase se refiere a concentraciones de fósforo mayores que la concentración a nivel, o por debajo, cuya generación de algas cianofíceas-clorofíceas y organismos de marea roja se suprime. Por ejemplo, en el caso de patrones ambientales definidos por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE), los estados nutricionales de los lagos se clasifican dependiendo de las concentraciones totales de fósforo. Los lagos que tienen una concentración de fósforo total de 0,01 mg/l o menor se clasifican en lagos oligotróficos y los lagos que tienen una concentración de fósforo total de 0,035 mg/l o más se clasifican en lagos eutróficos. En las condiciones proporcionadas por los lagos eutróficos, las algas cianofíceas-clorofíceas y similares tienden a generarse, aunque no pueden describirse categóricamente ya que con la materia también se asocian otros factores distintos del fósforo. El término "hidrosfera", como se usa en el presente documento, se refiere a una zona de agua dulce. Ejemplos típicos de los mismos incluyen lagos, estanques, ríos, etc.

Preferentemente, el organismo vegetal, como se describe en el presente documento, se planta y crece en un lugar que requiere purificación de agua con eliminación de exceso de fósforo, tal como un tanque, un tanque de almacenamiento para agricultura, un estanque en un parque, etc., en el que se vierte agua contaminada y el exceso de fósforo contenido en el agua existente en el lugar se absorbe, eliminando de esta manera el fósforo del medio ambiente (por ejemplo hidrosfera, suelo, etc.). Después de esto, la biomasa de la planta que acumula gran cantidad de fósforo se recolecta y se usa preferentemente como fertilizante. Para usarla como fertilizante, la biomasa recolectada se somete preferentemente a tratamientos tales como espolvoreado mediante desecación/pulverización. Si una planta en sí misma muestra una alta acumulación de fosfato, esta puede enviarse al campo o la tierra agrícola sin procesar y puede usarse directamente como un fertilizante. Por tanto, de acuerdo con la biomasa del organismo vegetal después de recolectarse, que ha sido la cuestión principal de las plantas para la purificación del agua, puede reutilizarse eficazmente convirtiéndola en fertilizante o extrayendo fósforo de la biomasa para reutilización.

A partir de ahora la presente invención se describirá específicamente a modo de ejemplos ilustrativos.

Ejemplos

En los siguientes ejemplos,) a menos que se especifique otra cosa, se emplea la técnica de biología molecular de acuerdo con el método descrito en el documento WO96/25500 o Molecular Cloning (Sambrook et al. (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press).

Ejemplo 1: Construcción del Vector de Expresión PHR1

El gen PHR1 se subclonó en el vector pCR2.1 usando un kit de clonación TOPO-TA (Invitrogen) de acuerdo con el manual de instrucciones. Se subclonó un producto amplificado por reacción PCR usando los cebadores PHRdirecto (5'-ATGGAGGCTCGTCCAGTTCAT-3, (SEC ID N°: 3)) y PHRinverso (5'-TCAATTATCGATTTTGGGACGC-3' (SEC ID N°: 4)) para obtener pSPB1892. El vector binario pSPB176, que tenía un promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (El₂35S), en el que la secuencia potenciadora se repetía, y un terminador de nopalina sintasa (nos), se digirió con *Bam*HI y *Sall* para obtener pSPB176A. El vector pSPB1892 se digirió con *Bam*HI y *Xho*I y el fragmento génico PHR1 obtenido se insertó en pSPB176A para obtener pSPB1898.

El vector binario pSPB2311, que tenía un promotor en el que la secuencia potenciadora del promotor 35S estaba conectada al promotor de manopina sintasa (Mac) y a un terminador de manopina sintasa (mas), se digirió con *Sma*I para obtener pSPB2311 A. El vector pSPB1892 se digirió con *Eco*RI y el fragmento homogéneo se insertó en pSPB2311A para obtener pSPB2314.

Para potenciar la capacidad de activación de la transcripción de PHR1, también se preparó un vector para la expresión de una proteína quimérica, en la que la región de activación de la transcripción de la proteína VP16 del virus del herpes simple humano se conectó al gen PHR1. Se digirió un producto amplificado por reacción PCR usando los cebadores BamPHRdirecto (5'-AGCTGGATCCATGGAGGCTCGTCCAG-3' (SEC ID N°: 5)) y SpePHRinverso (5'-CAGTACTAGTATTATCGATTTTGGGA-3' (SEC ID N°: 6)) con *Bam*HI y *Spe*I para obtener el fragmento A de ADN. Se digirió un producto amplificado por reacción PCR usando los cebadores SpeVP16directo (5'-AGTACTAGTGGCCCCGGACCGATG-3' (SEC ID N°: 7)) y KpnVP16inverso (5'-CAGTGGTACCTTACCCACCG-TACTCG-3' (SEC ID N°: 8)) se digirió con *Spe*I y *Kpn*I para obtener el fragmento B de ADN. Se realizó un ligamiento de tres puntos usando pSPB2311 que se digirió con *Bam*HI y *Kpn*I, el fragmento A de ADN y el B fragmento de ADN para preparar el vector pSPB2377 para expresar una proteína quimérica, en la que un péptido que consistía en 79 restos aminoácidos derivados de VP16 se conectó al lado C-terminal de la proteína

PHR1. Los genes PHR1 en pSPB1898, pSPB2314 y pSPB2377 están bajo el control de un promotor constitutivo.

Ejemplo 2: Preparación de los Transformantes

5 Posteriormente, la cepa Ag10 de *Agrobacterium tumefaciens* se transformó usando pSPB1898 o pSPB2314 o pSPB2377 basándose en un método conocido públicamente (Plant J. 5, 81, 1994), y se infectaron plantas de *Petunia* (*Petunia híbrida*) y de *Torenia* (*Torenia híbrida*) con la *Agrobacterium* transformada que tenía pSPB1898 o pSPB2314 o pSPB2377. Los ARN se extrajeron de las hojas de las plantas recombinantes obtenidas usando el Kit RNeasy Plant Mini (Qiagen) y mediante RT-PCR, de acuerdo con el método habitual, se seleccionaron las cepas en las que se expresó el gen introducido..

Ejemplo 3: Cantidad de Acumulación de Fosfato de los Transformantes

(1) Método para Medir la Concentración de Fosfato

15 La concentración de fosfato se midió de acuerdo con el método de Ames (Methods Enzymol. 8, 115-118, 1966), modificado parcialmente. Las hojas se pesaron (aproximadamente 100 mg) y se sometieron a muestreo. La muestra se encapsuló en un tubo de 2 ml para su agitación/trituración junto con perlas de zirconio que tenían un diámetro de 4 mm y se congeló a -80 °C. La muestra congelada se llevó a temperatura ambiente, en el tubo se introdujeron 500 µl de ácido acético al 1% (v/v) y la mezcla se agitó y se trituró durante 6 minutos usando una agitadora/trituradora (Qiagen). Después de triturar, la mezcla se centrifugó a 15.000 rpm durante 5 minutos usando una centrífuga de mesa para obtener 500 µl de sobrenadante como un extracto de fosfato. Este extracto de fosfato se preparó usando agua destilada (dilución de 10 a 100 veces) de tal manera que la cantidad final se ajustó a 800 µl. A esta solución, se añadieron 160 µl de reactivo para medir el fosfato (su composición se describirá más adelante) y la mezcla se removió bien y se dejó durante 10 minutos. Usando un espectrofotómetro se midió la Abs800 y la concentración de fosfato se determinó por comparación con la curva patrón trazada usando la solución patrón. La cantidad de fosfato contenida en 1 g de hoja se calculó en base a la concentración de fosfato obtenida y el peso de la muestra.

(Composición de reactivo para medir el fosfato)

30	Ácido sulfúrico 2,5 M	10ml
	Ácido ascórbico 0,1 M	6ml
	Tartrato antimonil potásico 0,27 g/100 ml	3ml
	Molibdato amónico 8 g/100 ml	6ml

Los materiales descritos anteriormente se mezclaron entre sí para proporcionar 20 ml de solución. El ácido ascórbico se prepara según sea necesario.

(2) Cantidad de fosfato en *Torenia* y *Petunia* transformadas

Usando hojas de los transformantes obtenidos, la concentración de fosfato se midió de acuerdo con el método descrito anteriormente y se determinó el contenido de fosfato por peso fresco. Como se muestra en la Tabla 1 y en la Figura 1, en el caso de *Torenia* transformada, tanto pSPB1898, usando el promotor 35S, como pSPB2314, usando el promotor Mac, mostraron una cantidad de acumulación de fosfato aproximadamente 5 veces mayor que la del tipo silvestre.

Tabla 1

	Gen introducido	Cantidad de fosfato (mg/gPF)	Valor relativo (/Control)
<i>Torenia</i>	Control	0,17	1
	pSPB1898	0,81	4,76
	Control	0,32	1
	pSPB2314	1,84	5,75

45 Como en el caso de *Torenia*, en el caso del transformante de *Petunia*, la cepa en la que se introdujo el gen PHR1 mostró mayor acumulación de fosfato en comparación con el tipo silvestre (Tabla 2 y Figura 2). El transformante de *Petunia* en el que se introdujo pSPB2377 que expresaba PHR1 conectado al sitio de activación de transcripción de VP16, mostró la mayor acumulación de fosfato. Se consideró que el sitio de activación de transcripción de VP16 actuaba eficazmente en *Petunia*.

50

Tabla 2

	Gen introducido	Cantidad de fosfato (mg/gPF)	Valor relativo (/Control)
<i>Petunia</i>	Control	0,26	1
	PSPB1898	0,81	3,12
	Control	0,11	1
	pSPB2314	0,87	7,91
	Control	0,22	1
	pSPB2377	1,4	6,36

Ejemplo 4: cantidad de fosfato de transformantes en el caso de cultivo hidropónico5 (1) Cantidad de fosfato por peso fresco de *Torenia* cultivada hidropónicamente

Se realizó un cultivo hidropónico usando el transformante pSPB1898 de *Torenia* y se examinó si la capacidad de absorber fosfato también aumentaba o no en el caso de cultivo hidropónico. Se muestrearon hojas de *Torenia*, que se cultivaron hidropónicamente en una solución hidropónica que tenía la concentración de fosfato de 5 mg/ml durante aproximadamente un mes, y se midió la concentración de fosfato. Como se muestra en la Tabla 3 y en la Figura 3, el transformante mostró una cantidad de acumulación de fosfato aproximadamente 3 veces mayor que la del tipo silvestre. Por tanto, el aumento en la capacidad de absorción atribuida al gen PHR1 también se confirmó cuando se usaba en cultivo hidropónico.

15 Tabla 3

	Gen introducido	Cantidad de fosfato (mg/gPF)	Valor relativo (/Control)
Torenia cultivada hidropónicamente	Control	0,29	1
	SPB1898	0,95	3,28

No hubo diferencias de morfología entre el transformante pSPB1898 cultivado hidropónicamente y el tipo silvestre. Adicionalmente, no hubo diferencias de peso entre las plantas después del cultivo durante un determinado periodo de tiempo. Por tanto, se sugirió que el fosfato excesivamente absorbido no se usaba para el crecimiento de la planta sino que se acumulaba en el organismo vegetal tal cual. También se sugirió que la expresión constitutiva de PHR1 no afectaba al crecimiento de la planta.

20 (2) Cantidad de fosfato por peso seco de *Torenia* cultivada hidropónicamente

Para confirmar si la cantidad de acumulación de fosfato aumentaba o no en todo el organismo vegetal, se recolectó la parte aérea completa de pSPB1898 de *Torenia* que se había cultivado hidropónicamente con la concentración de fosfato de 5 mg/ml durante aproximadamente 2 meses y se secó a 80 °C durante aproximadamente 2 días y se midió la cantidad de acumulación de fosfato por peso seco (Tabla 4 y Figura 4). Se deshidrataron 3 individuos de tipo silvestre y 3 individuos transformantes y para calcular los valores promedio se midió su concentración de fosfato. Como resultado, en el caso de *Torenia* deshidratada, el transformante mostró una cantidad de acumulación de fosfato aproximadamente 2,5 veces mayor que la del tipo silvestre. Por lo tanto, esto confirmó que la cantidad de acumulación de fosfato aumentaba en todo el organismo vegetal.

Tabla 4

	Peso fresco (g)	Peso seco (g)	Cantidad de fosfato (mg/gPS)	Promedio
Control	28,78	2,67	2,08	2,07
	29,85	2,70	2,14	
	26,41	2,53	2,00	
pSPB1898	25,63	2,20	5,77	5,52
	35,40	3,16	4,77	
	36,05	3,20	6,02	

Por tanto, se aclaró que la capacidad de las plantas para acumular fosfato puede potenciarse introduciendo el gen PHR1 en las plantas para permitir que se sobre exprese.

Ejemplo 5: cantidad de fosfato absorbido a partir de una solución hidropónica

5 Para aclarar las diferencias de la cantidad de fosfato absorbido a partir de una solución hidropónica, se realizó el siguiente experimento comparativo. Se plantaron plantas de *Torenia* de tipo silvestre o de *Torenia* transformadas en las que se introdujo el gen PHR1 y crecieron sobre un soporte fabricado con poliestireno espumado que tenía orificios que flotaba sobre 5 l de solución hidropónica (agua desionizada en la que se disolvieron diversas sales) en un envase de plástico (23 x 23 x 11,5 cm). La concentración de fósforo en la solución hidropónica se estableció que era de 5 mg/ml. En cada envase se usaron 4 plantas. La solución hidropónica se muestreó a diario y la concentración de fosfato se midió de acuerdo con el método descrito anteriormente. Dado que el volumen fluido de la solución hidropónica disminuía debido a la transpiración en las hojas y a la evaporación del agua desde la superficie, el agua desionizada se rellenaba cada cuatro días.

(Preparación de solución hidropónica)

15 En 10 l (concentración de fósforo: 5 mg/l)

KNO ₃ 1 M	5 ml
MgSO ₄ 1 M	2 ml
Ca(NO ₃) ₂ 1 M	2 ml
Fe-EDTA 20 mM	2,5 ml
Micronutrientes	1 ml
Tampón KPO ₄ 1 M (pH 5,5)	1,61 ml

Composición líquida de micronutrientes (en 50 ml)

H ₃ BO ₃ 350 mM	10 ml
MnCl ₂ 140 mM	5 ml
CuSO ₄ 50 mM	500 µl
ZnSO ₄ 100 mM	500 µl
Na ₂ MoO ₄ 20 M	500 µl
NaCl 5 M	100 µl
CoCl ₂ 10 Mm	50 µl

20 Los resultados de las mediciones mostraron que los transformantes con el gen PHR1 tenían una capacidad superior para absorber el fósforo en comparación con el tipo silvestre (Tabla 5 y Figura 5). Los dos transformantes pSPB1898 y pSPB2314 absorbieron la mayor parte del fósforo en la solución 14 días después de comenzar el cultivo y mostraron una alta capacidad de absorción. Además, dado que se absorbió la mayor parte del fosfato, se consideró que el fosfato se absorbía activamente a niveles de baja concentración.

Tabla 5

	Número de días	0	1	2	3	4	7	8	9	10	11	14
Concentración de fosfato en solución hidropónica (mg/l)	Control	4,7	4,6	4,5	4,4	4,4	3,2	3,2	3,1	3,1	2,9	2,8
	pSPB1898	4,7	4,2	3,8	3,5	3,1	0,6	0,2	0	0	0	0
	pSPB2314	4,7	4,4	4,1	4	3,7	2,6	2,3	1,8	1,4	0,9	0,2

30 Se analizó la cantidad de fosfato en las hojas de las plantas cultivadas durante 4 semanas (el ensayo de 2 semanas se duplicó). Los resultados mostraron la misma tendencia que los de las plantas de *Torenia* y *Petunia* en los Ejemplos 3 y 4 y los transformantes acumularon gran cantidad de fosfato (Tabla 6 y Figura 6). La Figura 7 muestra resultados de comparación en los que se midió el peso fresco de la parte aérea de cada cepa de *Torenia* después de 4 semanas de cultivo hidropónico y se compararon sus valores promedio. Se entiende que los pesos de los transformantes son un poco más pequeños que los de los del tipo silvestre aunque no hay diferencias significativas.

35 A la vista de esto, se consideró que los transformantes no utilizaban el fosfato absorbido para su crecimiento sino que lo acumulaban y lo retenían.

Tabla 6

Gen introducido	Cantidad de fosfato (mg/gPF)	Valor relativo (/Control)
Control	0,67	1
pSPB1898	1,67	2,49
pSPB2314	1,42	2,12

Los resultados descritos anteriormente muestran que las plantas transformadas en las que se introdujo el gen PHR1 tienen una capacidad aumentada para absorber fosfato y tienen características obtenidas adecuadas para la purificación de agua usando plantas.

Ejemplo 6: introducción del gen PHR1 en otras plantas

Para confirmar si el aumento en cuanto a la capacidad de absorción de fosfato, atribuido al gen PHR1, se observaba en otras plantas o no, el gen PHR1 se introdujo en plantas de *Impatiens*, *Begonia*, *Nicotiana*, *Verbena*, *Nierembergia* y *Rosa*.

(Introducción del gen PHR1 en plantas de *Impatiens* y *Begonia*)

La transformación de *Impatiens* (*Impatiens walleriana*) se realizó usando tipos de cultivo Glitter Red (Sakata Seed Corporation) y Tempo Pink (Takii & Co., Ltd.) básicamente de acuerdo con la Patente de Estados Unidos N° 6.121.511. En un medio de precultivo líquido (1 mg/l de medio MS con TDZ añadido) se precultivaron ápice de brote, nodo, pecíolo y disco foliar cortados de plantas de semillero de *Impatiens* cultivadas *in vitro* durante 5 días y después se dejaron permanecer sobre un medio de precultivo sólido (medio MS al cual se añadieron 0,05 mg/l de NAA, 6 mg/l de Zeatina y goma gelano al 0,3%) durante 48 horas. Después de esto, las muestras se infectaron con *Agrobacterium* (*Agrobacterium tumefaciens* cepa Ag10) en la que se introdujo pSPB2314 y se cultivó sobre un medio selectivo (medio MS al cual se añadieron 0,05 mg/l de NAA, 6 mg/l de Zeatina, 100 mg/l de Kanamicina, 500mg/l de Carbenicilina, 100 mg/l de Cefotaxime y goma gelano al 0,3%) durante 4 a 8 semanas para obtener brotes (Tabla 7). En el caso de la muestra del disco foliar, la muestra se puso marrón fácilmente y no se obtuvieron brotes. En el caso de las muestras de ápice de brote y nodo se obtuvieron muchos brotes de un explante, pero se consideró que en su interior muchos de ellos eran positivos falsos. El aspecto de los brotes de los pecíolos requiere un tiempo considerable y son poco numerosos. Sin embargo parecen ser más certeros.

Tabla 7

Número de vástagos de <i>Impatiens</i>			
Tipo de cultivo	Origen de los explantes	Número de explantes infectados	Número de brotes obtenidos
Glitter Red	Hoja	30	0
	Ápice de brote	82	187
	Nodo	145	89
	Pecíolo	90	0
Tempo Pink	Hoja	35	0
	Ápice de brote	196	333
	Nodo	418	184
	Pecíolo	259	5

La transformación de plantas de *Begonia* (*Begonia semperflorens*) se realizó usando los tipos de cultivo Ambassador White y Ambassador Scarlet (Sakata Seed Corporation). Se cortaron discos foliares y pecíolos de plantas de semillero de *Begonia* cultivadas *in vitro*. Las muestras se infectaron con *Agrobacterium* (*Agrobacterium tumefaciens* cepa Ag10) en la que se introdujo pSPB2314 y se cultivaron en un medio de co-cultivo (medio MS al cual se añadieron 0,5 mg/l de 1AA, 0,1 mg/l de TDZ, PVP al 0,5%, 2 mg/l de AgNO₃, acetosiringona 200 µM y goma gelano al 0,3%) en la oscuridad durante 3 días. Después de esto, las muestras se cultivaron secuencialmente sobre un medio de preselección (medio MS al cual se añadieron 1 mg/l de BAP, 1 mg/l de Zeatina, 0,1 mg/l de IAA, 500 mg/l de Timentina, acetosiringona 50 µM y goma gelano al 0,25%) durante 3 a 5 días sobre medio selectivo 1 (medio MS al cual se añadieron 2 mg/l de TDZ, 0,1 mg/l de NAA, 100 mg/l de Kanamicina, 500 mg/l de Timentina, y agar al 0,4%) durante 2 semanas, en medio selectivo 2 (medio MS al cual se añadieron 0,2 mg/l de BAP, 0,1 mg/l de NAA, 100 mg/l de Kanamicina, 500 mg/l de Timentina y agar al 0,4%) durante 2 semanas y en medio selectivo 3 (medio MS al cual se añadieron 100 mg/l de Kanamicina, 500 mg/l de Timentina y agar 0,4%) durante 3 semanas. Cuando

se formó un brote, durante el cultivo y creció hasta tener un diámetro de 5 mm, su tejido circundante se raspó y se transfirió a un medio selectivo 4 (medio MS al cual se añadieron 150 mg/l de Kanamicina, 500 mg/ml de Timentina y agar al 0,4%) y se cultivó adicionalmente durante 2 a 3 semanas. Después de esto, el tejido se transfirió a un medio de enraizamiento (medio MS al cual se añadieron 100 mg/l de Kanamicina, 500mg/l de Timentina y agar al 0,4%) para obtener un brote con raíces (Tabla 8).

Tabla 8

Número de brotes de <i>Begonia</i>		
Tipo de cultivo	Número de explantes infectados	Número de brotes obtenidos
Ambassador White	940	13
Ambassador Scarlet	805	2

(Introducción del gen PHR1 en plantas de *Nicotiana*, *Verbena* y *Nierembergia*)

La transformación de plantas de *Nicotiana* (*Nicotiana tabacum*), *Verbena* (*Verbena* híbrida) y *Nierembergia* (*Nierembergia* sp.) respectivamente, se realizó basándose en métodos públicamente conocidos (Science 227,1229,1985; Plant Cell Rep. 21,459,2003; and Plant Biotech. 23,19,2006). La introducción de los genes de las plantas obtenidas se confirmó extrayendo ADN de hojas de cada organismo vegetal y usando PCR en la que se empleó el gen PHR1 como molde. Como plantas transformadas con PHR1 se obtuvieron 11 individuos de *Nicotiana*, 16 individuos de *Verbena* y 1 individuo de *Nierembergia*.

(Introducción del gen PHR1 en *Rosa*)

Durante 5 minutos se sumergieron callos de *Rosa* (*Rosa* híbrida), inducidos a partir de hojas de plantas de semilla asépticas, en una solución de bacterias de *Agrobacterium* transformada que tenía pSPB2314. Después de secar el exceso de solución de bacteria usando papel de filtro estéril, los callos se trasplantaron a un medio de subcultivo y se co-cultivaron en la oscuridad durante 2 días. Después de esto, los callos se lavaron con medio líquido MS al cual se añadieron 400 mg de carbenicilina y se trasplantaron a un medio para la selección/eliminación de bacterias en el que se añadieron 50 mg/l de Kanamicina y 200 mg/l de carbenicilina al medio de subcultivo. Las partes que proliferaron normalmente sin inhibición de crecimiento en el medio de selección se trasplantaron repetidamente y se cultivaron para seleccionar callos resistentes a Kanamicina. Cultivando callos transformados que mostraron resistencia a Kanamicina en un medio de referenciación en el cual se añadieron 50 mg/l de Kanamicina y 200 mg/l de carbenicilina, se obtuvieron rudimentos de brotes resistentes a Kanamicina. Por lo tanto, existe una alta probabilidad de que, en el caso de las rosas, también puedan obtenerse plantas transformadas con PHR1.

(Ensayo de absorción de fosfato para plantas de *Nicotiana* y de *Verbena* transformadas)

Se muestrearon hojas de plantas de semillas asépticas de *Nicotiana* transformadas con PHR1 que crecían en medio MS y el nivel de expresión de PHR1 se confirmó mediante RT-PCR. La cepa que mostró un nivel expresión alto se definió como cepa seleccionada. Después, plantas de semillas asépticas de la cepa se cultivaron en medio MS, una parte de las hojas se muestreó y la concentración de fosfato en las hojas se midió de acuerdo con el método mencionado anteriormente. Adicionalmente, se muestrearon hojas de individuos de *Verbena* transformados con PHR1 plantados en macetas, como en el caso de *Nicotiana* y el nivel de expresión de PHR1 se confirmó mediante RT-PCR. La cepa que mostró un nivel expresión alto se definió como la cepa seleccionada. Después de muestrear hojas de la cepa, la concentración de fosfato en las hojas se midió de acuerdo con el método mencionado anteriormente.

De acuerdo con los resultados, tanto las plantas de *Nicotiana* transformadas como las de *Verbena* transformadas mostraron una acumulación de fosfato aproximadamente 1,5 veces mayor que las del tipo silvestre (Figuras 8 y 9).

Por tanto, de acuerdo con los resultados descritos anteriormente, a partir de 8 especies de plantas se obtuvieron con éxito plantas transformadas en las que se introdujo el gen PHR1 y la capacidad de acumulación de fosfato estaba mejorada en plantas de 4 especies vegetales en las que se introdujo el gen PHR1. Estos resultados indican que es posible obtener plantas transformadas con PHR1 a partir de diferentes especies vegetales y que, independientemente de la especie vegetal, el gen PHR1 puede contribuir a la acumulación de fosfato.

Aplicabilidad industrial

Por tanto, utilizando la planta transformada, como se describe en el presente documento, a la cual se confiere la capacidad de acumular gran cantidad de fosfato para la purificación de agua, la recolección de biomasa, que ha sido la cuestión principal para plantas para la purificación del agua, puede convertirse en un fertilizante y adicionalmente puede reutilizarse eficazmente en forma de fósforo extraído. Adicionalmente, introduciendo genes en una planta existente que tiene capacidad de acumular gran cantidad de fosfato de acuerdo con esta técnica, también puede

prepararse una planta que pueda acumular más fosfato. Por lo tanto, con respecto a la cuestión de la purificación del agua, puede proporcionarse una técnica eficaz con escasa contaminación secundaria. Adicionalmente, utilizando flores y plantas ornamentales para jardinería, como huéspedes para recombinación genética, también pueden proporcionarse ventajas desde el punto de vista de fines estéticos, que otras técnicas de purificación de agua no tienen.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5
 - 10
 - 15
 - 20
 - 25
 - 30
- <110> Suntory Limited
- <120> Planta capaz de acumular fosfato inorgánico a alto nivel y uso de la planta
- <130> G08-0009
- <140> PCT/JP2006/322038
<141> 27-10-2006
- <150> IP 2005-313225
<151> 27-10-2005
- <160>8
- <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
<211>1529
<212> ADN
<213> *Arabidopsis thaliana*
- <220>
<221> CDS
<222> (99).. (1328)
- <400> 1

```

ciccgattat ccccaagagg agaatectca taatcatttt ciccgatctg attegicttc      60

cttgggtccig gattgcttca tgaatttcta ggacaaca atg gag gct cgl cca gtt      116
                               Met Glu Ala Arg Pro Val
                               1           5

cal aga tca ggt tcg aga gac ctc aca cgc act tet tca atc cca tet      164
His Arg Ser Gly Ser Arg Asp Leu Thr Arg Thr Ser Ser Ile Pro Ser
                10                15                20

aca caa aaa cct tca cca gta gaa gat agt ttc atg aga tca gat aac      212
Thr Glu Lys Pro Ser Pro Val Glu Asp Ser Phe Met Arg Ser Asp Asn
                25                30                35

aac agt cag tta atg tet aga cca tta gga caa acc tac cat tta ctt      260
Asn Ser Gln Leu Met Ser Arg Pro Leu Gly Gln Thr Tyr His Leu Leu
                40                45                50

```

30

ES 2 390 681 T3

tca tct agt aac ggt gga gct gtt gga cat ala tgt tct tct tca tca	308
Ser Ser Ser Asn Gly Gly Ala Val Gly His Ile Cys Ser Ser Ser Ser	
55 60 65 70	
tct ggt ttt gca acc aat ctc cat tac tca act atg gta tct cat gag	356
Ser Gly Phe Ala Thr Asn Leu His Tyr Ser Thr Met Val Ser His Glu	
75 80 85	
aaa caa caa cac tac aca gga agc agc agt aat aat gct gig cag aca	404
Lys Gln Gln His Tyr Thr Gly Ser Ser Ser Asn Asn Ala Val Gln Thr	
90 95 100	
cca agc aac aac gat agt gct tgg tgt cat gat tca ttg cca gga ggg	452
Pro Ser Asn Asn Asp Ser Ala Trp Cys His Asp Ser Leu Pro Gly Gly	
105 110 115	
ttt ctt gac ttc cat gaa acc aac ccg gcg att caa aac aac tgi cag	500
Phe Leu Asp Phe His Glu Thr Asn Pro Ala Ile Gln Asn Asn Cys Gln	
120 125 130	
att gag gat ggt ggc att gcg gct gct ttt gat gac att caa aaa cga	548
Ile Glu Asp Gly Gly Ile Ala Ala Ala Phe Asp Asp Ile Gln Lys Arg	
135 140 145 150	
agt gat tgg cat gaa tgg gct gac cat ttg atc act gat gat gat cct	596
Ser Asp Trp His Glu Trp Ala Asp His Leu Ile Thr Asp Asp Asp Pro	
155 160 165	
ttg atg tct act aac tgg aat gat ctc ttg ctt gaa aca aat tcc aat	644
Leu Met Ser Thr Asn Trp Asn Asp Leu Leu Leu Glu Thr Asn Ser Asn	
170 175 180	
tca gat tca aag gac cag aag aca ctg caa att ccg caa cct cag att	692
Ser Asp Ser Lys Asp Gln Lys Thr Leu Gln Ile Pro Gln Pro Gln Ile	
185 190 195	
gtt cag cag caa cct tct ccg tct gig gaa ttg cga cct gtt agc aca	740
Val Gln Gln Gln Pro Ser Pro Ser Val Glu Leu Arg Pro Val Ser Thr	
200 205 210	
aca tct tca aac agc aat aac gga acg ggc aag gca cga atg cgt tgg	788
Thr Ser Ser Asn Ser Asn Asn Gly Thr Gly Lys Ala Arg Met Arg Trp	
215 220 225 230	
acg cca gag ctt cac gag gct ttt gtt gag gct gtc aac agt ctt ggc	836
Thr Pro Glu Leu His Glu Ala Phe Val Glu Ala Val Asn Ser Leu Gly	

ES 2 390 681 T3

	235		240		245		
ggt agl gaa aga gct act cct aaa ggg gta ctg aag att atg aaa gtt							884
Gly Ser Glu Arg Ala Thr Pro Lys Gly Val Leu Lys Ile Met Lys Val							
	250		255		260		
gaa ggc ttg act ata tat cat gtt aaa agc cal tta cag aaa tat agg							932
Glu Gly Leu Thr Ile Tyr His Val Lys Ser His Leu Gln Lys Tyr Arg							
	265		270		275		
aca gct aga tat cgg cca gaa cca tca gaa act ggt tcc cca gaa agg							980
Thr Ala Arg Tyr Arg Pro Glu Pro Ser Glu Thr Gly Ser Pro Glu Arg							
	280		285		290		
aag ttg aca ccg ctt gaa cat ata aca tct ctt gat ttg aaa ggt ggg							1028
Lys Leu Thr Pro Leu Glu His Ile Thr Ser Leu Asp Leu Lys Gly Gly							
	295		300		305		310
ata ggt att aca gag gct cta cga ctt cag atg gaa gta cag aag caa							1076
Ile Gly Ile Thr Glu Ala Leu Arg Leu Gln Met Glu Val Gln Lys Gln							
	315		320		325		
ctc cal gag cag ctc gag att caa aga aac ctg caa ctc cga ata gaa							1124
Leu His Glu Gln Leu Glu Ile Gln Arg Asn Leu Gln Leu Arg Ile Glu							
	330		335		340		
gaa caa ggc aag tac ctg caa atg atg ttc gag aag caa aac tct ggt							1172
Glu Gln Gly Lys Tyr Leu Gln Met Met Phe Glu Lys Gln Asn Ser Gly							
	345		350		355		
cti acc aaa ggg aca gcc tca aca tca gat tcc gca gcc aaa tct gaa							1220
Leu Thr Lys Gly Thr Ala Ser Thr Ser Asp Ser Ala Ala Lys Ser Glu							
	360		365		370		
caa gaa gac aag aag act gct gat tcc aag gag gtt cca gaa gaa gaa							1268
Gln Glu Asp Lys Lys Thr Ala Asp Ser Lys Glu Val Pro Glu Glu Glu							
	375		380		385		390
acc agg aaa tgt gag gaa cta gaa tct cca cag cca aag cgt ccc aaa							1316
Thr Arg Lys Cys Glu Glu Leu Glu Ser Pro Gln Pro Lys Arg Pro Lys							
	395		400		405		
atc gat aat tga aagtatggg cttttgctgg ataattctcgg agtttcagag							1368
Ile Asp Asn							
ttaacagtga tagagagaac gagctcttat ctigaggttc ttcaggactt ctctctttac							1428

ES 2 390 681 T3

tglttaacta lllttctgat ggaagactct caactcaget gigttagacaa acaacagatc 1488

cccaaggaag aaacaaaaca aaaataaaaa gitagtttgg g 1529

<210> 2

<211> 409

<212> PRT

5 <213> *Arabidopsis thaliana*

<400>2

Met Glu Ala Arg Pro Val His Arg Ser Gly Ser Arg Asp Leu Thr Arg
 1 5 10 15

Thr Ser Ser Ile Pro Ser Thr Gln Lys Pro Ser Pro Val Glu Asp Ser
 20 25 30

Phe Met Arg Ser Asp Asn Asn Ser Gln Leu Met Ser Arg Pro Leu Gly
 35 40 45

Gln Thr Tyr His Leu Leu Ser Ser Ser Asn Gly Gly Ala Val Gly His
 50 55 60

Ile Cys Ser Ser Ser Ser Ser Gly Phe Ala Thr Asn Leu His Tyr Ser
 65 70 75 80

Thr Met Val Ser His Glu Lys Gln Gln His Tyr Thr Gly Ser Ser Ser
 85 90 95

Asn Asn Ala Val Gln Thr Pro Ser Asn Asn Asp Ser Ala Trp Cys His
 100 105 110

Asp Ser Leu Pro Gly Gly Phe Leu Asp Phe His Glu Thr Asn Pro Ala
 115 120 125

Ile Gln Asn Asn Cys Gln Ile Glu Asp Gly Gly Ile Ala Ala Ala Phe
 130 135 140

ES 2 390 681 T3

Asp Asp Ile Gln Lys Arg Ser Asp Trp His Glu Trp Ala Asp His Leu
 145 150 155 160

Ile Thr Asp Asp Asp Pro Leu Met Ser Thr Asn Trp Asn Asp Leu Leu
 165 170 175

Leu Glu Thr Asn Ser Asn Ser Asp Ser Lys Asp Gln Lys Thr Leu Gln
 180 185 190

Ile Pro Gln Pro Gln Ile Val Gln Gln Gln Pro Ser Pro Ser Val Glu
 195 200 205

Leu Arg Pro Val Ser Thr Thr Ser Ser Asn Ser Asn Asn Gly Thr Gly
 210 215 220

Lys Ala Arg Met Arg Trp Thr Pro Glu Leu His Glu Ala Phe Val Glu
 225 230 235 240

Ala Val Asn Ser Leu Gly Gly Ser Glu Arg Ala Thr Pro Lys Gly Val
 245 250 255

Leu Lys Ile Met Lys Val Glu Gly Leu Thr Ile Tyr His Val Lys Ser
 260 265 270

His Leu Gln Lys Tyr Arg Thr Ala Arg Tyr Arg Pro Glu Pro Ser Glu
 275 280 285

Thr Gly Ser Pro Glu Arg Lys Leu Thr Pro Leu Glu His Ile Thr Ser
 290 295 300

Leu Asp Leu Lys Gly Gly Ile Gly Ile Thr Glu Ala Leu Arg Leu Gln
 305 310 315 320

Met Glu Val Gln Lys Gln Leu His Glu Gln Leu Glu Ile Gln Arg Asn

	325		330		335											
	Leu	Gln	Leu	Arg	Ile	Glu	Glu	Gln	Gly	Lys	Tyr	Leu	Gln	Met	Met	Phe
			340					345					350			
	Glu	Lys	Gln	Asn	Ser	Gly	Leu	Thr	Lys	Gly	Thr	Ala	Ser	Thr	Ser	Asp
		355					360					365				
	Ser	Ala	Ala	Lys	Ser	Glu	Gln	Glu	Asp	Lys	Lys	Thr	Ala	Asp	Ser	Lys
	370					375						380				
	Glu	Val	Pro	Glu	Glu	Glu	Thr	Arg	Lys	Cys	Glu	Glu	Leu	Glu	Ser	Pro
	385				390						395				400	
	Gln	Pro	Lys	Arg	Pro	Lys	Ile	Asp	Asn							
					405											

- <210> 3
- <211> 21
- <212> ADN
- 5 <213> Artificial
- <220>
- <223> cebador directo de PHR
- 10 <400>3
- atggaggctc gtccagttca t 21
- <210> 4
- 15 <211> 22
- <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- 20 <223> cebador inverso de PHR
- <400> 4
- tcaattatcg attttgigac gc 22
- <210> 5
- 25 <211> 26
- <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- 30 <223> cebador directo de BamPHR
- <400>5
- 35 agctggatcc algaggctc gtccag 26
- <210> 6

ES 2 390 681 T3

<211> 26
<212> ADN
<213> Artificial

5 <220>
<223> cebador inverso de SpePHR

<400>6
cagtactagt attatcgatt ttggga 26

10 <210> 7
<211> 26
<212> ADN
<213> Artificial

15 <220>
<223> cebador directo de SpeVP16

<400>7
20 agctactagt gccccccga ccgatg 26

<210>8
<211> 26
25 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador inverso de KpnVP16

30 <400>8
cagtgtacc ttaccaccg tactcg 26

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método de purificación de agua que comprende la eliminación de fósforo en exceso en la hidrosfera usando un organismo vegetal que se transforma introduciendo un vector de expresión recombinante que comprende un gen que codifica el factor de transcripción PHR1 de tipo Myb derivado de *Arabidopsis*, de manera que exprese dicho gen que codifica dicho factor de transcripción, en el que el factor de transcripción es:
- 10 (a) una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 2 o
- (b) una proteína, que consiste en una secuencia de aminoácidos en la que de uno o 20 aminoácidos están sustituidos, suprimidos, insertados y/o añadidos en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 2 y que tiene la función de activar un gen de respuesta a la falta de fosfato
- 15 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el gen que codifica el factor de transcripción PHR1 de tipo Myb es:
- 20 (c) un gen que comprende una fase de lectura abierta de la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEC ID N°: 1; o
- (d) un gen que, en condiciones rigurosas, se hibrida con un polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEC ID N°: 1 o la secuencia de nucleótidos de la fase de lectura abierta de la misma y que codifica una proteína que tiene la función de activar un gen de respuesta a la falta de fosfato.
- 25 3. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en la que el organismo vegetal es Petunia, Torenia, Verbena, Nicotiana, Rosa, Impatiens, Begonia o Nierembergia.
- 30 4. El uso de un organismo vegetal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para eliminar el fósforo en exceso en la hidrosfera.

Fig. 1

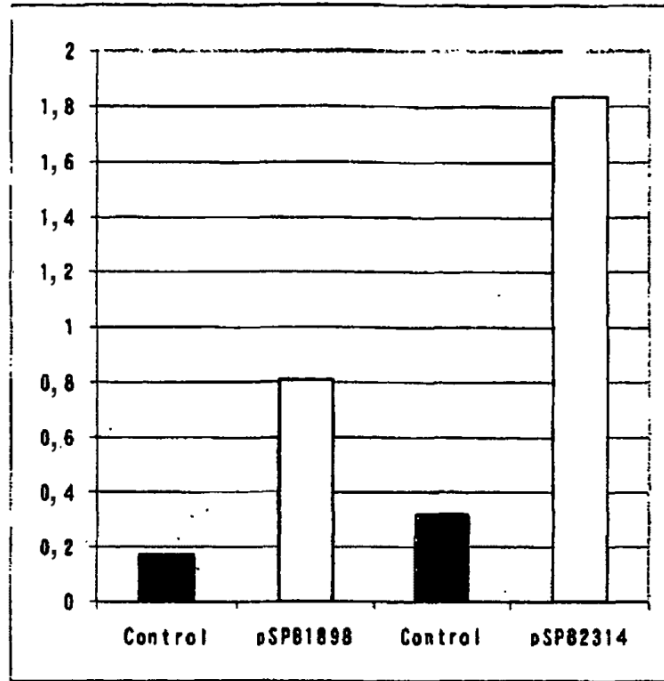


Fig. 2

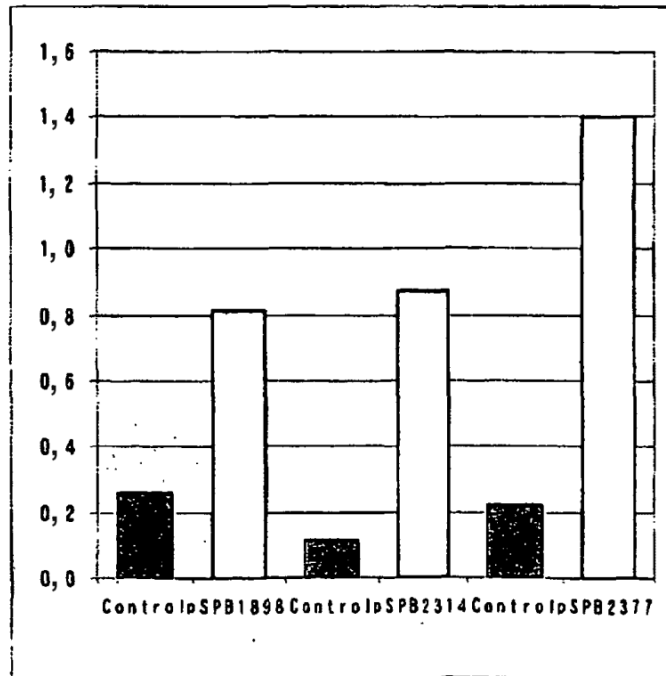


Fig. 3

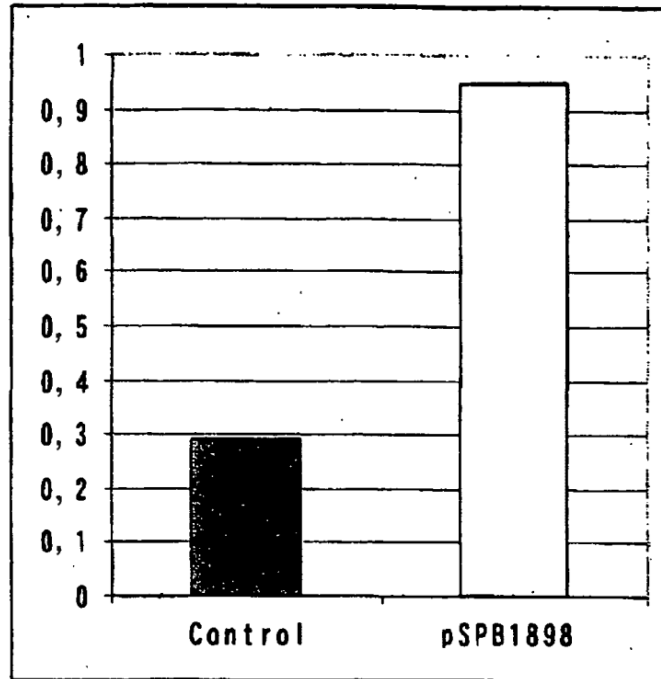


Fig. 4

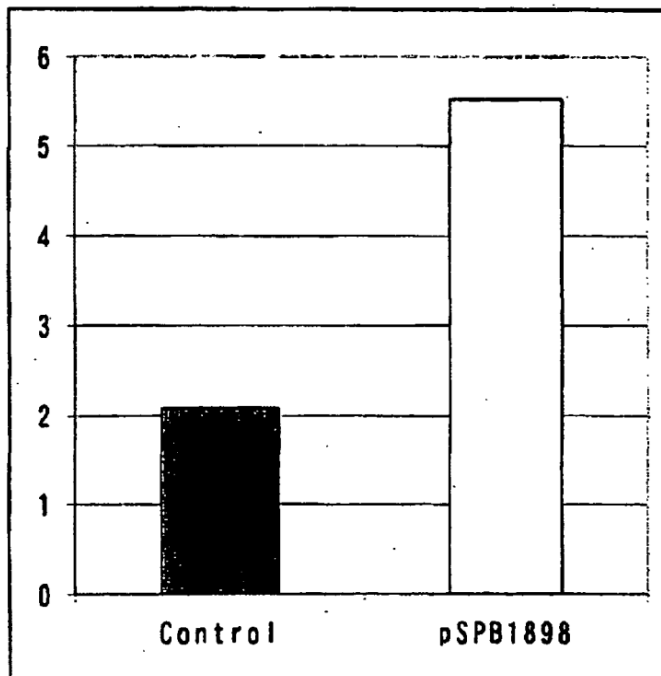


Fig. 5

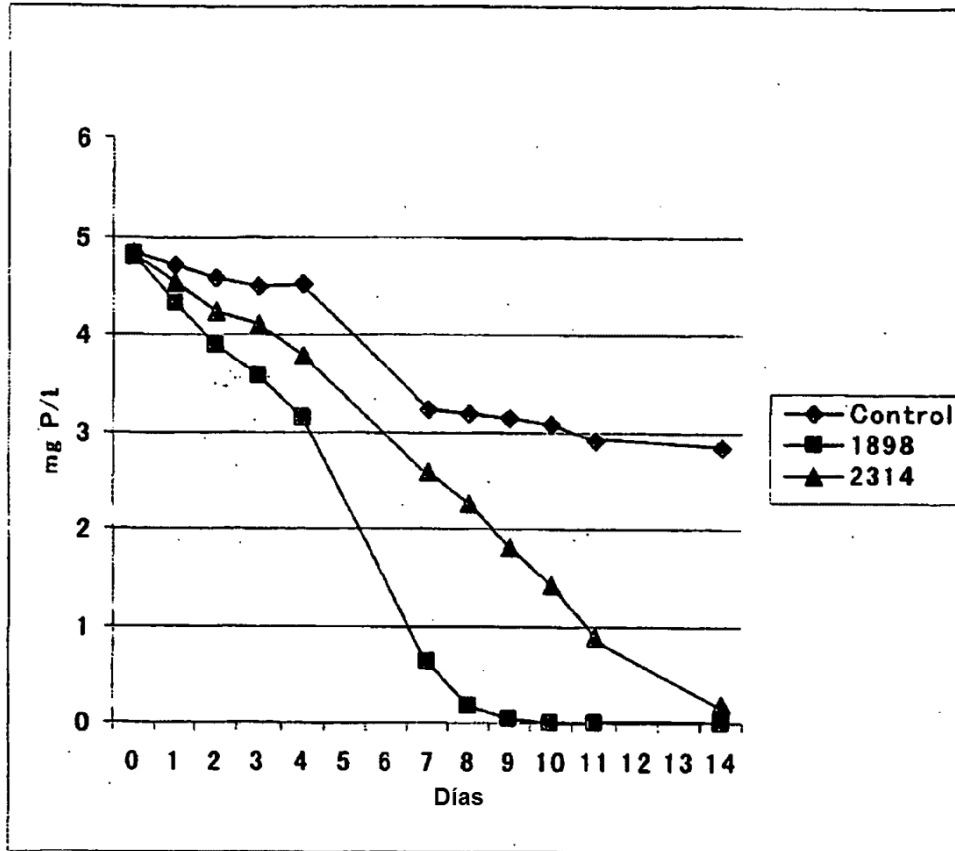


Fig. 6

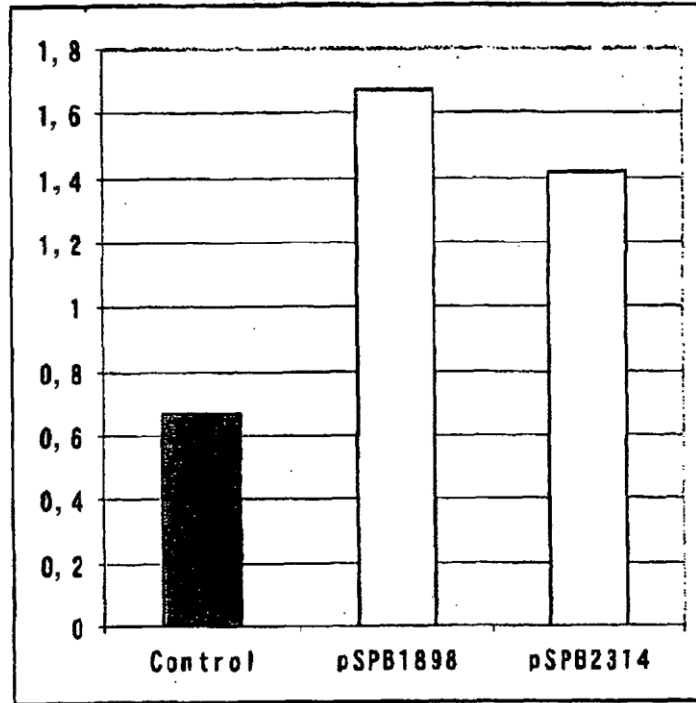


Fig. 7

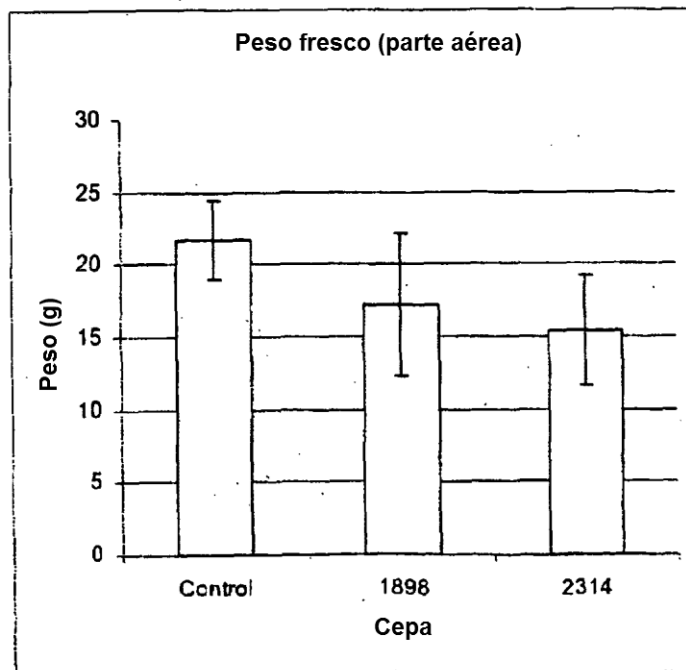


Fig. 8

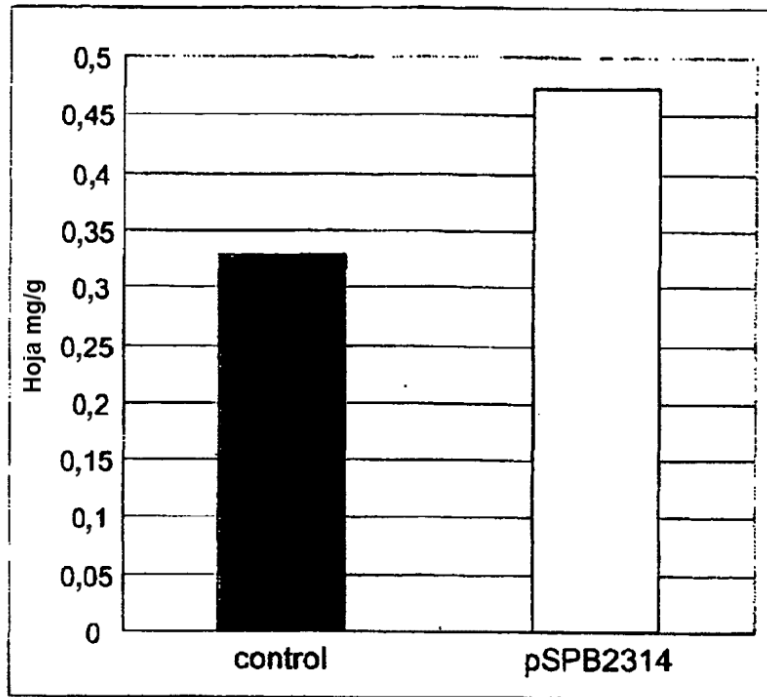


Fig. 9

