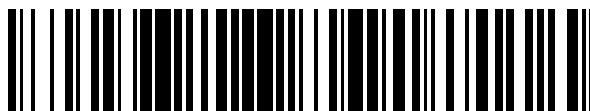


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 351**

21 Número de solicitud: 201190037

51 Int. Cl.:

C12N 15/80 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **19.11.2009**

30 Prioridad:
19.11.2008 US 61/199,784

43 Fecha de publicación de la solicitud: **23.11.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
23.11.2012

71 Solicitante/s:
**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL (CINVESTAV) (100.0%)
Av. Instituto Politécnico Nacional No. 2508 -
Col. San Pedro Zacatenco
07360 Mexico, MX**

72 Inventor/es:
**HERRERA-ESTRELLA, Luis Rafael;
LÓPEZ-ARREDONDO, Damar Lizbeth y
HERRERA-ESTRELLA, Alfredo Heriberto**

74 Agente/Representante:
ILLESCAS TABOADA, Manuel

54 Título: **PLANTAS Y HONGOS TRANSGÉNICOS CAPACES DE METABOLIZAR FOSFITO COMO
FUENTE DE FÓSFORO.**

57 Resumen:
Plantas y hongos transgénicos capaces de
metabolizar fosfito como fuente de fósforo.
Sistema, incluyendo métodos y composiciones, para
preparar y utilizar plantas transgénicas y/u hongos
transgénicos que metabolizan fosfito como fuente de
fósforo para favorecer el crecimiento.

DESCRIPCIÓN

**PLANTAS Y HONGOS TRANSGÉNICOS CAPACES DE METABOLIZAR FOSFITO
COMO FUENTE DE FÓSFORO**

5

Estado de la Técnica

El fósforo es un elemento esencial para el crecimiento vegetal y fúngico. Este elemento, en forma oxidada, es incorporado en muchas de las biomoléculas en una célula vegetal o fúngica, proporcionando para proporcionar material genético, membranas, y mensajeros moleculares, entre otros.

El fosfato inorgánico (Pi) es la fuente primaria de fósforo para las plantas. Por consiguiente, los fertilizantes a base de fosfato ofrecen un enfoque económico y ampliamente utilizado para mejorar el crecimiento vegetal. Sin embargo, los fertilizantes a base de fosfato proceden de recursos no renovables que se ha previsto que se agotarán en los próximos setenta a cien años, o incluso antes si su tasa de utilización aumenta más rápido de lo esperado.

Los fertilizantes a base de fosfato, comúnmente utilizados en la agricultura moderna generalmente no pueden ser utilizados eficientemente por las plantas cultivadas, debido a varios factores importantes. En primer lugar, el fosfato es altamente reactivo y puede formar complejos insolubles con muchos componentes del suelo, lo cual reduce la cantidad de fósforo disponible. En segundo lugar, los microorganismos del suelo pueden convertir rápidamente el fosfato en moléculas orgánicas que generalmente no pueden ser metabolizadas eficientemente por las plantas, lo cual reduce adicionalmente la cantidad de fósforo disponible. En tercer lugar, el crecimiento de malas hierbas puede ser estimulado por los fertilizantes a base de fosfato, lo cual no solo reduce la cantidad de fósforo disponible aún más, sino que también puede fomentar que las malas hierbas compitan con las plantas cultivadas por el espacio y por los nutrientes. Las pérdidas debidas a la conversión del fosfato en formas inorgánicas y orgánicas que no están rápidamente disponibles para la captura y utilización por parte de la planta, y la competencia por parte de las malas hierbas, implica el uso de excesivas cantidades de fertilizante a base de fosfato, lo cual no sólo incrementa los costos de producción sino que también ocasiona severos problemas ecológicos. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de reducir la cantidad de fertilizante a base de fosfato utilizados en la agricultura.

Una forma reducida de fosfato, el fosfito (Phi), también se utiliza en el cultivo de plantas. Se ha demostrado que el tratamiento con fosfito puede incrementar la producción vegetal (medida como tamaño del druto y biomasa) en aguacate y frutas cítricas. El fosfito

puede ser transportado dentro de las plantas utilizando el mismo sistema de transporte que el fosfato y puede acumularse en tejidos vegetales durante largos períodos de tiempo. Sin embargo, aparentemente no hay evidencias de la existencia de ninguna enzima en plantas que pueda metabolizar el fosfito en fosfato, la fuente primaria de fósforo en plantas. Más aún, incluso durante la ausencia de fosfato, el fosfito no puede aparentemente satisfacer los requerimientos nutricionales de fósforo de la planta. En consecuencia, a pesar de las similitudes con el fosfato, el fosfito es una forma de fósforo que generalmente no puede ser metabolizada directamente por las plantas, y por lo tanto no es un nutriente vegetal. No obstante, los “fertilizantes” de fosfito se venden comercialmente, a pesar de que no parece haber ninguna prueba, ni siquiera una indicación en la literatura científica de que las plantas puedan asimilar el fosfito.

El fosfito puede promover el crecimiento vegetal indirectamente. Por ejemplo, el fosfito es utilizado como un agente anti-fúngico (un fungicida) sobre plantas cultivadas. Se piensa que el fosfito evita enfermedades causadas por oomycetes (mohos de agua) en plantas tan diversas como patata, tabaco, aguacate, y papaya, entre otras. El fosfito por lo tanto, puede promover el crecimiento vegetal, no directamente como un nutriente vegetal, sino protegiendo a las plantas de los patógenos fúngicos que podrían de otro modo afectar el crecimiento vegetal. No obstante, los fungicidas a base de fosfito son a menudo etiquetados como fertilizantes. Este etiquetado erróneo puede estar fomentado por regulaciones gubernamentales que hacen el proceso de aprobación más corto y menos complejo si los fabricantes caracterizan los fungicidas como fertilizantes.

Los mecanismos propuestos para que el fosfito actúe como un fungicida son múltiples. Por ejemplo, el fosfito puede actuar sobre los hongos inhibiendo las reacciones de fosforilación a través de un incremento en la acumulación de pirofosfato inorgánico (PPi), el cual a su vez puede interrumpir las rutas de fosfato que son metabólicamente críticas. Alternativamente, o adicionalmente, el fosfito puede inducir una respuesta natural de defensa en plantas. En cualquier caso, la eficacia del fosfito como fungicida puede estar influenciada por varios factores, que incluyen el medioambiente, tipo de patógeno, tipo de planta y la concentración.

La concentración de fosfito en contacto con las plantas puede ser un factor crítico para la eficacia del fosfito ya que demasiado fosfito puede ser tóxico para las plantas. En particular, el fosfito puede competir con el fosfato por la entrada en las células vegetales, dado que el fosfito puede ser transportado dentro de las plantas mediante el sistema de transporte del fosfato. La toxicidad del fosfito puede deberse por lo tanto, a (1) asimilación reducida del fosfato por las plantas, en combinación con (2) una incapacidad de utilizar el fosfito como fuente de fósforo mediante oxidación a fosfato, lo cual ocasiona la acumulación

de fosfito en las plantas. Además, el fosfito puede detectarse en las plantas como fosfato, lo cual evita que las plantas induzcan una ruta de recuperación de fósforo que promueve la supervivencia de la planta bajo condiciones de fosfato bajo. La toxicidad del fosfito afecta plantas tan diversas como *Brassica nigra*, *Allium cepa* (cebolla), *Zea mays* L. (maíz), y

5 *Arabidopsis thaliana*. Por consiguiente, la exposición de las plantas al fosfito necesita ser controlada muy cuidadosamente. Por lo tanto, se necesita un sistema mejor para explotar los beneficios del fosfito en las plantas al tiempo que se reduzcan sus inconvenientes.

La generación de plantas transgénicas ha sido un instrumento en la creación de sistemas mejorados para la agricultura. Al menos cuatro sistemas de selección se han establecido para identificar plantas transgénicas mediante crecimiento selectivo. Cada sistema de selección está basado en la resistencia a un antibiótico (kanamicina o higromicina) o un herbicida (glifosato o fosfinotricina). Sin embargo, cada sistema de selección tiene desventajas. Por ejemplo, cada sistema de selección puede tener problemas con la toxicidad. Además, la selección con antibióticos puede ser ineficaz dado que las plantas pueden tener

10 mecanismos de resistencia alternativos. Por otra parte, a excepción del sistema de selección que utiliza fosfinotricina, ninguno de los sistemas de selección proporciona un marcador de selección "universal" de selección para la mayoría o todas las plantas. Por lo tanto, se necesita un nuevo marcador de selección para uso en la generación de plantas transgénicas.

Breve descripción de la invención

La presente descripción proporciona un sistema, incluyendo métodos y composiciones, para preparar y utilizar plantas transgénicas y/u hongos transgénicos que metabolizan fosfito como fuente de fósforo para favorecer al crecimiento.

Descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra un diagrama de flujo esquemático de un ejemplo del método para (i) preparar una planta transgénica (u hongo) que es capaz de metabolizar una forma reducida de fósforo, tal como fosfito, como fuente de fósforo para favorecer el crecimiento,

30 y/o (ii) utilizar, como un marcador de selección, un ácido nucleico que confiere capacidad para metabolizar una forma reducida de fósforo, tal como fosfito, como fuente de fósforo para favorecer el crecimiento, de acuerdo con aspectos descritos en la presente descripción.

La Figura 2 muestra una representación esquemática de un ejemplo de un ácido nucleico para su uso en el método de la Fig. 1, de acuerdo con los aspectos descritos en la

35 presente descripción.

La Figura 3 muestra un mecanismo propuesto para la oxidación de hipofosfito a

fosfato en bacterias utilizando enzimas expresadas a partir de los genes *ptxD* y *htxA* de *Pseudomonas stutzeri*, de acuerdo con los aspectos descritos en la presente descripción.

La Figura 4 muestra una representación esquemática de un ejemplo de un gen quimérico construido para uso en la generación de una planta transgénica que metaboliza fosfito a fosfato, de acuerdo con los aspectos descritos en la presente descripción.

La Figura 5 muestra un diagrama esquemático de una porción de una estrategia seguida para crear el gen quimérico de la Fig. 4, de acuerdo con los aspectos descritos en la presente descripción.

La Figura 6 muestra un par de fotografías que muestran ejemplos de los datos obtenidos con el gen quimérico de la Fig. 4 utilizado como marcador de selección mediante la selección de plantas transgénicas, por su capacidad para crecer sobre un medio que contiene fosfito en ausencia de fosfato, de acuerdo con los aspectos descritos en la presente descripción.

La Figura 7 muestra una serie de fotografías de datos obtenidos a partir de ensayos de crecimiento de líneas control y transgénicas de (*ptxD*) *Arabidopsis* germinadas y cultivadas en un medio de crecimiento líquido, con o sin fosfito (Φ) o fosfato (Pi) como fuente de fósforo, de acuerdo con los aspectos descritos en la presente descripción.

La Figura 8 muestra un gráfico de barras con los datos obtenidos a partir de ensayos realizados para medir la capacidad de las líneas de *Arabidopsis* de la Fig. 7 para extraer fósforo a partir de su medio de crecimiento, con las plantas cultivadas durante 45 días en medio de crecimiento que contiene diferentes concentraciones de fosfito (Φ) como fuente de fósforo, de acuerdo con los aspectos descritos en la presente descripción.

La Figura 9 muestra una representación esquemática de la distribución de plantas control (WT) y plantas *ptxD* transgénicas (PTXD) de *Arabidopsis* a través de un sustrato de crecimiento, tal como se utilizó para los experimentos de las Figs. 10 y 11, de acuerdo con los aspectos descritos en la presente descripción.

La Figura 10 muestra una fotografía de las plantas parentales y transgénicas *ptxD* distribuidas de acuerdo con la Fig. 9 y analizando su crecimiento sobre un sustrato que contiene fosfato (Pi) como fuente de fósforo, de acuerdo con los aspectos descritos en la presente descripción.

La Figura 11 muestra una fotografía de las plantas parentales y transgénicas *ptxD* distribuidas de acuerdo con la Fig. 9 y analizando su crecimiento sobre un sustrato que contiene fosfito (Φ) como fuente de fósforo, de acuerdo con los aspectos descritos en la presente descripción.

La Figura 12 muestra un gráfico de barras con los datos obtenidos a partir de ensayos sobre la capacidad de las líneas de *Arabidopsis* de la Fig. 7 para incrementar su peso cuando

son cultivadas en ausencia o presencia de fosfato y/o fosfito como fuente de fósforo, de acuerdo con los aspectos descritos en la presente descripción.

La Figura 13 muestra un conjunto de fotografías de las plantas de líneas control (WT) y plantas ptxD transgénica de *Nicotiana tabacum* (tabaco), 25 días después de la germinación en presencia de fosfato o fosfito como fuente de fósforo, de acuerdo con los aspectos descritos en la presente descripción.

La Figura 14 muestra un conjunto de fotografías de otro experimento de crecimiento llevado a cabo con las plantas de líneas de tabaco control y plantas transgénica de la Fig. 13, de acuerdo con los aspectos descritos en la presente descripción.

Descripción detallada de la invención

La presente descripción proporciona un sistema, que incluye métodos y composiciones, para preparar y utilizar plantas transgénicas y/u hongos transgénicos que metabolizan fosfito como fuente de fósforo para favorecer el crecimiento. Las plantas y/u hongos opcionalmente también pueden metabolizar hipofosfito como fuente de fósforo. El sistema descrito en la presente invención puede cambiar sustancialmente el modo a una forma más reducida de fósforo (relativa a fosfato), tal como fosfito, utilizándose como un fertilizante y/o fungicida. El sistema también puede proporcionar un nuevo marcador de selección para su uso en la generación de plantas y/u hongos transgénicos. El sistema, adicionalmente, puede cambiar sustancialmente el modo en que al menos una forma reducida de fósforo es eliminada del agua de desecho o residual, tales como los efluentes industriales/municipales.

Se proporciona un ácido nucleico. El ácido nucleico puede utilizarse para generar una planta y/u hongo transgénico. El ácido nucleico, puede denominarse un constructo, puede comprender al menos un gen quimérico que confiere a una célula vegetal y/o a una célula fúngica, capacidad para metabolizar al menos una forma reducida de fósforo a fosfato. En algunas realizaciones, el ácido nucleico puede comprender un gen que expresa una enzima fosfito deshidrogenasa, un gen que expresa una enzima hipofosfito deshidrogenasa, o ambos.

El ácido nucleico puede comprender un gen quimérico que incluye una región codificante y un promotor de la transcripción. La región codificante puede codificar para una enzima fosfito deshidrogenasa, tal como PtxD de *Pseudomonas stutzeri*, un homólogo de PtxD de la misma o de otra especie bacteriana, o un derivado de alguno de estos, entre otros. En algunos ejemplos, la región codificante puede ser al menos 80%, 90%, o 95% (o completamente) idéntica a la secuencia codificante de ptxD de *Pseudomonas stutzeri*. El promotor puede ser funcional en plantas, hongos, o ambos y puede estar unido operativamente a la región codificante. El promotor puede ser heterólogo con respecto a la

región codificante. El gen quimérico puede ser capaz de inducir la suficiente expresión de la enzima, en una célula vegetal o fúngica que contiene el ácido nucleico, para conferir la habilidad a la célula para metabolizar fosfito (Phi) como fuente de fósforo para favorecer el crecimiento, permitiendo así el crecimiento de la célula sin una fuente externa de fosfato (Pi).

- 5 El promotor puede (o no) ser un promotor vegetal o un promotor viral de un virus vegetal y puede ser capaz de promover la suficiente expresión de la enzima en una célula vegetal. Por ejemplo, el promotor, tal como un promotor obtenido a partir del gen PLDZ2 de *Arabidopsis thaliana*, puede ser inducible mediante baja disponibilidad de fosfato. Alternativamente, o adicionalmente, el promotor puede ser un promotor específico de raíz. En otros casos, el
- 10 promotor puede ser constitutivo y puede corresponder al promotor 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor. En algunas realizaciones, el ácido nucleico puede incluir un terminador de la transcripción que es funcional en la célula vegetal y/o en la célula fúngica y que está unido operativamente al promotor y a la región codificante. En algunas realizaciones, el promotor puede ser un promotor fúngico capaz de promover la suficiente expresión de la enzima en una
- 15 célula fúngica.

- El ácido nucleico puede proporcionar expresión de uno o más polipéptidos que metabolizan al menos una forma reducida de fósforo a fosfato, para permitir que una planta (u hongo) transgénica/o utilice una forma reducida de fósforo como nutriente. La expresión de uno o más polipéptidos puede ser hereditaria. Por ejemplo, el ácido nucleico puede estar
- 20 integrado dentro del genoma de la planta (u hongo). Más aún, la expresión de al menos uno de los polipéptidos puede estar bajo el control de un promotor constitutivo o de un promotor inducible (p.ej., inducible mediante baja concentración de fosfato, como por ejemplo, mediante el uso de un promotor de un gen PLDZ2 de *Arabidopsis* o un gen AtPT1 vegetal para un transportador de fosfato de elevada afinidad), bajo control de un promotor específico de tejido (p.ej., específico de hoja o específico de raíz), o una combinación de los mismos, entre otros.
- 25

- Se proporciona una célula vegetal o una célula fúngica que expresa una enzima fosfito deshidrogenasa a partir de un gen quimérico. La célula puede aislarse a partir de otras células o puede estar asociada con otras células en una estructura multi-celular (p.ej., una
- 30 planta o un micelio). La célula puede (o no) expresar también una enzima hipofosfito deshidrogenasa a partir de un gen quimérico. En consecuencia, la célula puede metabolizar fosfito, hipofosfito, o ambos, como fuente de fósforo para favorecer el crecimiento. En algunas realizaciones, la célula puede ser una célula vegetal y la expresión de la enzima fosfito deshidrogenasa, de la enzima hipofosfito deshidrogenasa (si está presente), o ambas,
- 35 pueden estar controlada por un promotor específico de raíz. La célula vegetal puede ser de cualquier especie adecuada. Por ejemplo, la célula vegetal puede ser una célula eucariótica de

alga, como una célula de *Chlamydomonas*. En otros casos, la célula vegetal puede ser de una especie de planta vascular. En algunas realizaciones, la célula puede ser una célula fúngica que pertenece a una especie de *Trichoderma* o que pertenece a una especie de hongo micorrizal capaz de formar una relación simbiótica con una planta.

5 Se proporciona una planta transgénica (o parte de planta) que expresa una enzima fosfito deshidrogenasa, y, opcionalmente, una enzima hipofosfito deshidrogenasa a partir de uno o más genes quiméricos. La planta puede, a través de la expresión de la/s enzima/s, metabolizar fosfito y/o hipofosfito como fuente de fósforo para favorecer el crecimiento. La planta puede ser una planta vascular, tal como una planta de cultivo, por ejemplo, una especie
10 de planta de cultivo seleccionada a partir del grupo que consiste en: maíz, soja, arroz, patata, tomate, caña de azúcar y trigo. También se proporciona una semilla que germina para producir la planta transgénica.

Se proporciona un método para reducir infecciones fúngicas en plantas. Una pluralidad de células fúngicas puede aplicarse a una forma de semilla de plantas, las plantas
15 propiamente dichas, el suelo en el cual las plantas están o serán dispuestas, o una combinación de los mismos. Las células fúngicas pueden expresar una enzima fosfito deshidrogenasa a partir de un gen quimérico y pueden pertenecer a una especie de *Trichoderma*.

Se proporciona una planta asociada con una pluralidad de células fúngicas para
20 formar micorrizas. Las células fúngicas pueden expresar una enzima fosfito deshidrogenasa a partir de un gen quimérico. Las células fúngicas pueden dar lugar a una planta capaz de crecer sobre fosfito (y/o hipofosfito) como fuente de fósforo mediante la oxidación de fosfito a fosfato.

Se proporciona un método para fertilizar una planta de cultivo utilizando hipofosfito
25 y/o fosfito como fuente de fósforo para favorecer el crecimiento. La planta de cultivo puede expresar una enzima fosfito deshidrogenasa, una enzima hipofosfito deshidrogenasa, o ambas. Alternativamente, o adicionalmente, la planta de cultivo puede formar micorrizas con una pluralidad de células fúngicas que expresan una enzima fosfito deshidrogenasa, una enzima hipofosfito deshidrogenasa, o ambas. Al menos una forma reducida de fósforo, tal
30 como fosfito y/o hipofosfito, puede aplicarse a la planta y/o al suelo adyacente a la planta, de modo que la forma reducida sea metabolizada a fosfato por parte de la planta y/o las micorrizas para favorecer el crecimiento y la productividad de la planta.

Se proporciona un método para tratar líquido de desecho o residuos líquidos (p.ej., un efluente) para disminuir su contenido en fósforo reducido. Se pone en contacto (i) agua que
35 contiene hipofosfito y/o fosfito como contaminante y (ii) una pluralidad de células vegetales y/o células fúngicas que expresan una enzima fosfito deshidrogenasa, una enzima hipofosfito

deshidrogenasa, o ambas, de modo que al menos una porción del hipofosfito y/o fosfito es oxidada a fosfito y/o fosfato. En algunos casos, se puede poner en contacto el agua con una pluralidad de plantas vasculares que expresan una o ambas enzimas. El método puede proporcionar un sistema de biorremediación para ríos, embalses, suelos, tanques de
 5 contención, depósitos y similares, que están contaminados debido a fabricación industrial. Por ejemplo, el fosfito es un agente contaminante común en ríos y lagos cercanos a las zonas industriales, tales como fabricas de discos ópticos (p.ej., DVDs y CDs) que utilizan hipofosfito para reducir los iones metálicos en procesos de recubrimientos químicos. Las plantas y/u hongos transgénicos descritos en la presente invención pueden por lo tanto ayudar
 10 a eliminar hipofosfito y/o fosfito de agua contaminada, tomando y convirtiendo el hipofosfito y/o fosfito en fosfato. El uso de plantas y/u hongos puede ser más eficaz que utilizar un sistema a base de bacterias.

Se proporciona un método para utilizar una secuencia que codifica para una enzima fosfito deshidrogenasa como un marcador de selección para la producción de una planta
 15 transgénica. El método puede ser utilizado para obtener una planta transformada con un ácido nucleico que codifica para una enzima fosfito deshidrogenasa que se expresa a partir del ácido nucleico como marcador de selección. Las células vegetales y una composición que incluye el ácido nucleico pueden ser puestas en contacto bajo condiciones que promueven la introducción del ácido nucleico en las células vegetales. Las células vegetales pueden ser
 20 cultivadas en un medio que contiene fosfito como fuente primaria o exclusiva de fósforo para el crecimiento de las células vegetales. La selección puede ser llevada a cabo sobre células vegetales transformadas producidas mediante las etapas de puesta en contacto y cultivo, y que expresan la enzima fosfito deshidrogenasa como se evidencia mediante el crecimiento en el medio. Al menos una porción de las células vegetales transformadas pueden ser regeneradas
 25 en una planta transgénica.

Las plantas transgénicas descriptas en la presente invención pueden proporcionar beneficios sustanciales. Por ejemplo, en algunos casos, las plantas pueden metabolizar fosfito utilizando NAD⁺ como aceptor de electrones, para generar NADH y fosfato, que son moléculas útiles para la planta. Las plantas transgénicas también o, alternativamente, pueden
 30 proporcionar el desarrollo de un nuevo sistema agronómico basado en fosfito. El fosfito puede ser menos reactivo en el suelo que el fosfato y por lo tanto, puede crear menor cantidad de compuestos insolubles que la planta no puede utilizar. Asimismo, dado que la mayoría de los microorganismos del suelo son incapaces de metabolizar fosfito, menos del fosfito (relativo al fosfato) es convertido en formas inorgánicas que las plantas no pueden utilizar.
 35 Más aún, el fosfito puede tener menos impacto sobre el ecosistema bacteriano alrededor de las plantas en relación al fosfato. La competencia de las malas hierbas también puede ser

reducida sustancialmente, dado que las malas hierbas no deberían ser capaces de utilizar fosfito. El uso de fosfito por lo tanto debería disminuir los costes de los fertilizantes y reducir el impacto negativo de los fertilizantes sobre el medioambiente.

Las plantas transgénicas descritas en la presente invención también pueden ofrecer
 5 efectividad aumentada del fosfito como fungicida, al tiempo que actúa como fertilizante sobre las plantas transgénicas. Cuando es utilizado como fungicida sobre plantas no transgénicas, es necesario ser muy cuidadoso con el fosfito, para evitar toxicidad vegetal. Sin embargo, en las plantas transgénicas descritas en la presente invención, el fosfito puede ser metabolizado por la planta para volverse no tóxico.

10 El sistema descrito en la presente invención puede proporcionar ventajas sustanciales para generar plantas transgénicas. Un marcador de selección del sistema puede funcionar, al menos sustancialmente, universalmente en plantas. Más aún, el agente selectivo (p.ej., hipofosfito o fosfito) puede ser no tóxico para plantas transgénicas, dado que los productos de reacción pueden ser inocuos (p.ej., NADH y fosfato), y también puede ser menos costoso que
 15 otros marcadores de selección.

Aspectos adicionales de la presente descripción se proporcionan en las siguientes secciones: (I) definiciones, (II) generación de plantas y hongos transgénicos, (III) uso de plantas y hongos transgénicos, y (IV) ejemplos.

20 I. Definiciones

Los diversos términos utilizados en la presente descripción generalmente tienen cada uno un significado reconocido por aquellos expertos en el arte, en consonancia con el contexto en el cual cada término es utilizado. Sin embargo, los siguientes términos pueden tener significados adicionales y/o alternativos, como se describe a continuación.

25 Planta – un miembro del reino Plantae de organismos eucarióticos, que puede ser descrita como un árbol, arbusto, pasto, mata, hierba, enredadera, helecho, musgo, un alga eucariótica, o una combinación de los mismos, entre otros. Una planta típicamente posee paredes celulares de celulosa y es capaz de llevar a cabo fotosíntesis. La planta puede ser una planta vascular. En algunas realizaciones, la planta puede ser anual o perenne. La planta
 30 puede ser una planta que florece, tal como una monocotiledónea o una dicotiledónea. En algunas realizaciones, la planta puede producir un grano, tubérculo, vegetal, nuez, semilla, fibra o una combinación de los mismos, entre otros. Más aún, la planta puede ser una planta de cultivo, la cual puede ser cultivada en un campo. Ejemplos de plantas de cultivo que pueden ser adecuadas para la generación de plantas transgénicas de acuerdo con la presente
 35 descripción incluyen: tabaco (p.ej., *N. tabacum*), patata, maíz, arroz, trigo, alfalfa, soja, tomate, caña de azúcar, y similares.

Parte de la planta – cualquier porción de una planta que es menos que una planta entera y que incluye al menos una célula vegetal. Una parte de planta por lo tanto puede ser un tejido vegetal, tal como tejido de hoja, tejido de raíz, tejido de tallo, tejido de brote, tejido de callo, tejido de flor, o cualquier combinación de los mismos, entre otros. Una parte de planta puede ser una célula vegetal aislada o una colonia o conjunto de células vegetales. Una célula vegetal puede ser un protoplasto o puede incluir una pared celular, entre otros.

Transgénico - que comprende un constructo de ácido nucleico. El constructo puede estar integrado dentro del genoma de un organismo (y/o de una célula) (p.ej., genoma nuclear o de plástido), en cualquier subconjunto o al menos sustancialmente de todas las células del organismo. Por ejemplo, el constructo puede estar presente en una línea germinal de planta. En consecuencia, el constructo puede ser hereditario, esto es, heredado por al menos uno o más miembros, o al menos sustancialmente por todos los miembros, de una generación subsiguiente del organismo, o en los descendientes de una célula. Una planta u hongo (una parte de planta u hongo (p.ej., una célula)) que es “transformada” con un constructo ha sido modificada para contener el constructo en la generación actual o en cualquier generación(es) precedente(s) de la planta u hongo (o una parte de planta u hongo). Una planta transgénica puede ser obtenida mediante una semilla que germina para formar la planta transgénica. Asimismo, una planta transgénica puede producir una o más semillas que germinan para producir plantas de progenie transgénica.

Ácido nucleico - un compuesto que comprende una cadena de nucleótidos. La cadena puede estar compuesta de cualquier número adecuado de nucleótidos, tales como al menos aproximadamente 10, 100, o 1000, entre otros. Un ácido nucleico puede denominarse polinucleótido, y puede, por ejemplo, ser de cadena simple, de cadena doble, o una combinación de los mismos.

Gen - un ácido nucleico o segmento del mismo que proporciona una unidad expresable para la expresión de un polipéptido y/o un ARN funcional (p.ej., a ARN mensajero, un ARN de interferencia, o un ARN enzimático, entre otros). Un gen puede por lo tanto, incluir (a) una región codificante (también denominada una secuencia codificante, la cual puede ser continua o interrumpida (por ejemplo por uno o más intrones)) para definir la secuencia del polipéptido y/o ARN funcional, (b) al menos un promotor de la transcripción (también denominada una secuencia promotora) y, (c) opcionalmente, al menos un terminador de la transcripción (también denominado secuencia de terminación), con el promotor de la transcripción y el terminador de la transcripción unido operativamente a la región codificante. Un gen opcionalmente puede incluir una o más regiones de control y/o regiones no traducibles, como por ejemplo, al menos una región 5' no traducible, una región 3' no traducible, un intrón, o cualquier combinación de los mismos, entre otros.

Promotor – una región de ácido nucleico que controla (es decir, promueve, regula y/o dirige) la transcripción de un gen para producir un transcrito primario y/o un ARN mensajero. Un promotor puede operar, por ejemplo, determinando, al menos en parte, la tasa de iniciación de la transcripción de un gen por parte de la ARN polimerasa. El promotor también
 5 o alternativamente puede determinar la tasa de elongación de la transcripción una vez que la transcripción está iniciada. El promotor puede ser funcional en plantas y/u hongos y por lo tanto, puede ser un promotor vegetal y/o un promotor fúngico.

Gen quimérico – un gen con elementos de secuencia, tal como un promotor de la transcripción y una región codificante, que son heterólogos con respecto uno a otro. El
 10 término “heterólogo” significa que los elementos de secuencia (p.ej., el promotor y la región codificante) se originan y/o provienen de fuentes respectivas distintas, tales como especies distintas de organismos. Un gen quimérico también puede comprender un terminador de la transcripción, el cual puede originarse a partir de una fuente distinta de la región codificante, y a partir de la misma fuente que, o una fuente distinta de, el promotor. Los terminadores de
 15 ejemplo que pueden ser utilizados en los genes quiméricos incluyen el terminador 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor, el terminador de la nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*, o similares.

Constructo - un ácido nucleico creado, al menos en parte, utilizando técnicas de ingeniería genética. Un constructo por lo tanto puede denominarse constructo de ácido
 20 nucleico.

Expresión – un proceso mediante el cual un producto, a saber, un ARN y/o un polipéptido, es formado a partir de información proporcionada por un ácido nucleico y/o gen, generalmente en forma de ADN. Por lo tanto, el ácido nucleico/gen puede ser expresado para formar un ARN y/o polipéptido, lo cual significa que el ARN y/o polipéptido se expresa a
 25 partir del ácido nucleico/gen.

Formas reducidas de fósforo – cualquier compuesto que contenga fósforo y/o iones en los cuales el fósforo presente un estado de oxidación menor que +5, como por ejemplo +3 o +1. Por lo tanto, las formas reducidas de fósforo pueden, por ejemplo, incluir fosfito e hipofosfito, entre otros. Una forma reducida de fósforo puede ser abreviada “RP.”

Fosfato – ácido fosfórico (H_3PO_4), su forma dibásica ($\text{H}_2\text{PO}_4^{1-}$), su forma monobásica (HPO_4^{2-}), su forma triplemente ionizada (PO_4^{3-}), o cualquier combinación de las mismas. El fosfato puede estar provisto como cualquier compuesto de fosfato adecuado o combinación de compuestos de fosfato. Ejemplos de formas de fosfato incluyen: sales de fosfato de sodio, de potasio, de litio, de rubidio, de cesio, de amonio, de calcio o de magnesio, o cualquier
 30 combinación de las mismas, entre otras. En el fosfato, cuatro oxígenos están directamente unidos a un átomo de fósforo. El fosfato también o alternativamente puede ser denominado

“ortofosfato” y/o “fosfato inorgánico” y puede ser abreviado como “Pi.” El fosfato es distinto del “organofosfato,” el cual es una versión orgánica de fosfato en la cual uno o más de los oxígenos de fosfato están unidos a estructuras orgánicas, generalmente para formar un éster fosfato.

5 Fosfito – ácido fosforoso (H_3PO_3), su base en forma conjugada /simplemente ionizada ($\text{H}_2\text{PO}_3^{1-}$), o su forma doblemente ionizada (HPO_3^{2-}), o cualquier combinación de las mismas. En el fosfito, tres oxígenos y un hidrógeno están unidos directamente a un átomo de fósforo. El fosfito puede estar provisto como cualquier compuesto adecuado de fosfito o combinación de compuestos de fosfito. Ejemplos de formas de fosfito incluyen: sales de
10 fosfito de sodio, de potasio, de litio, de rubidio, de cesio, de amonio, de calcio o de magnesio, o cualquier combinación de las mismas, entre otras. El fosfito puede ser oxidado a fosfato. El fosfito también o alternativamente puede ser denominado “fosfito inorgánico” y puede ser abreviado como “Phi.” El fosfito es distinto del “organofosfito,” el cual es una versión orgánica de fosfito en la cual uno o más de los oxígenos del fosfito están unidos a estructuras
15 orgánicas, generalmente para formar un éster fosfito.

Hipofosfito – ácido hipofosforoso (H_3PO_2) y/o su base conjugada (H_2PO_2^-), el cual puede ser provisto como cualquier compuesto de hipofosfito adecuado o combinación de compuestos de hipofosfito. En el hipofosfito, dos oxígenos y dos hidrógenos están unidos directamente a un átomo de fósforo. Ejemplos de formas de hipofosfito incluyen: sales de
20 sodio, potasio, litio, rubidio, cesio, amonio de hipofosfito o una combinación de las mismas, entre otras. El hipofosfito puede ser oxidado a fosfito y/o a fosfato. El hipofosfito también o alternativamente puede ser denominado “hipofosfito inorgánico” y puede ser abreviado como “Hphi.”

Nutriente – cualquier sustancia que es metabolizada para promover el crecimiento y
25 reproducción, y/o es requerida para la supervivencia.

Fertilizante - cualquier composición que incluye uno o más nutrientes para plantas (y/u hongos asociados con las plantas).

Fuente externa – un suministro que está por fuera de una planta y es accesible para la planta, generalmente por contacto con la planta. Ejemplos de fuentes externas que pueden ser
30 adecuadas para las plantas transgénicas descritas en la presente invención pueden incluir: una fuente externa de fósforo, una fuente externa de fosfato, o una fuente externa de fósforo reducido, entre otras.

Marcador de selección - un constructo o segmento del mismo y/o un gen que confiere una ventaja de crecimiento sobre una planta o parte de la planta (y/o un hongo o célula
35 fúngica) que contiene el constructo/gen, cuando el crecimiento de la planta o parte de la planta (y/u hongo o célula fúngica) es ensayado mediante contacto con un medio de cultivo

adecuado.

Efluente – agua que lleva y/o está mezclada con material de desecho o residuos. Un efluente puede o no estar fluyendo. Ejemplos de efluente pueden ser, por ejemplo, residuos y/o aguas industriales, las cuales pueden estar combinadas con un cuerpo de agua mayor, tal como un arroyo, río, estanque, lago, ciénaga, laguna, pantano, o similares.

Remediación – cualquier proceso que modifica el agua (p.ej., agua residual y/o un efluente) hasta una composición más deseada, de modo de hacer al agua menos tóxica, más respetuosa con el medioambiente, en mayor conformidad con los estándares gubernamentales, etc.

Enzima que oxide una forma reducida de fósforo – una enzima que cataliza o promueve la oxidación de una forma reducida de fósforo (p.ej., con un estado de oxidación de +1 o +3) hasta un estado más oxidado (p.ej., +1 a +3, +1 a +5, y/o +3 a +5). Por ejemplo, la enzima puede oxidar hipofosfito a fosfito, fosfito a fosfato, y/o hipofosfito a fosfato, entre otros. Por conveniencia, la enzima puede ser denominada una “oxidasa,” dado que cataliza/promueve una reacción de oxidación, o puede ser denominada una “oxidorreductasa de fósforo” o “enzima de metabolismo de fósforo reducido,” y puede ser abreviada, para mayor comodidad en la presente invención, como “RP-OxRe.” Ejemplos de enzimas que oxidan una forma reducida de fósforo pueden incluir: una enzima fosfito deshidrogenasa (la cual puede, por ejemplo, ser denominada NAD:fosfito oxidorreductasa, fosfonato deshidrogenasa, fosfito deshidrogenasa NAD-dependiente, o similares), una hipofosfito deshidrogenasa (p.ej., hipofosfito:2-oxoglutarato oxidorreductasa), o similares. La enzima puede oxidar una forma reducida de fósforo utilizando cualquier cofactor(es), coenzima(s), y/o sustrato(s) adecuados presentes en y/o cerca de una célula. Más aún, la enzima puede originarse y/o estar derivada de bacterias, hongos, plantas, o animales.

Enzima fosfito deshidrogenasa – una enzima que cataliza la oxidación de fosfito a fosfato. La enzima generalmente cataliza la oxidación con la eficacia suficiente para permitir el crecimiento de una célula vegetal y/o célula fúngica en presencia de fosfito como fuente de fósforo para favorecer el crecimiento. La enzima puede ser de origen bacteriano. La enzima puede ser un polipéptido PtxD (es decir, PtxD o tipo PtxD), el cual es cualquier polipéptido capaz de catalizar la oxidación de fosfito a fosfato y que es (a) al menos 90%, 95%, o completamente idéntico a PtxD (SEQ ID NO:1; GenBank: AAC71709.1) de *Pseudomonas stutzeri* WM 88, (b) un derivado de PtxD de SEQ ID NO:1, (c) un homólogo (es decir, un parálogo u ortólogo) de PtxD (SEQ ID NO:1) de la misma especie o de una diferente, o (d) un derivado de (c). Los homólogos de PtxD (SEQ ID NO:1) tienen similitud sustancial con PtxD de *Pseudomonas stutzeri*, la cual puede, por ejemplo, estar determinada mediante el algoritmo blastp (p.ej., programa BLASTP 2.2.18+), como se describe en las siguientes dos

referencias, las cuales están incorporadas en el presente documento como referencias: Stephen F. Altschul, et al. (1997), "Gapped BLAST y PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs," *Constructs Res.* 25:3389-3402; y Stephen F. Altschul et al. (2005) "Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices," FEBS J. 272:5101-5109. Ejemplos de similitud sustancial incluyen al menos 50%, 60%, 70%, u 80% de identidad de secuencia, una puntuación de similitud de al menos 200 o 250, y/o un valor-E de menos de 1e-40, 1e-60, o 1e-80, entre otros, utilizando el algoritmo blastp, con alineamiento óptimo y, si es necesario, introducción de gaps.

Ejemplos de homólogos de PtxD de *Pseudomonas stutzeri* pueden ser provistos por *Acinetobacter radioresistens* SK82 (SEQ ID NO:2; GenBank EET83888.1); *Alcaligenes faecalis* (SEQ ID NO:3; GenBank AAT12779.1); *Cyanothece sp. CCY0110* (SEQ ID NO:4; GenBank EAZ89932.1); *Gallionella ferruginea* (SEQ ID NO:5; GenBank EES62080.1); *Janthinobacterium sp. Marseille* (SEQ ID NO:6; GenBank ABR91484.1); *Klebsiella pneumoniae* (SEQ ID NO:7; Genbank ABR80271.1); *Marinobacter algicola* (SEQ ID NO:8; GenBank EDM49754.1); *Methylobacterium extorquens* (SEQ ID NO:9; NCBI YP_003066079.1); *Nostoc sp. PCC 7120* (SEQ ID NO:10; GenBank BAB77417.1); *Oxalobacter formigenes* (SEQ ID NO:11; NCBI ZP_04579760.1); *Streptomyces sviveus* (SEQ ID NO:12; GenBank EDY59675.1); *Thioalkalivibrio sp. HL-EbGR7* (SEQ ID NO:13; GenBank ACL72000.1); y *Xanthobacter flavus* (SEQ ID NO:14; GenBank ABG73582.1), entre otros. Aspectos adicionales de homólogos de PtxD se describen en la Publicación de la Solicitud de Patente U.S. No. 2004/0091985 ("la publicación '985") de Metcalf et al., la cual está incorporada en el presente documento como referencia. La fosfita deshidrogenasa puede tener una secuencia de aminoácidos con al menos 50%, 60%, 80%, 90% o 95% o 100% de identidad de secuencia con una o más de las SEQ ID NOS:1-14.

Ejemplos de derivados de PtxD de *Pseudomonas stutzeri* que pueden ser adecuados se describen en la publicación '985 y en la Patente U.S. No. 7402419 de Zhao et al., la cual está incorporada en el presente documento como referencia. Los derivados pueden proporcionar, por ejemplo, afinidad/especificidad a cofactor alterada y/o termoestabilidad alterada.

La enzima fosfita deshidrogenasa puede contener una región de secuencia con similitud o identidad de secuencia con cualquiera o cualquier combinación de los siguientes motivos consenso: un motivo que se une a NAD que tiene una secuencia consenso de VGILGMGAIG (SEQ ID NO:15); una secuencia distintiva conservada para la familia de 2-hidroxiácido específica de D-isómeros con una secuencia consenso de XPGALLVNPCRGSVVD (SEQ ID NO:16), donde X es K o R, o una secuencia consenso más corta dentro de la SEQ ID NO:16 de RGSVVD (SEQ ID NO:17); y/o un motivo que

puede permitir a las hidrogenasas utilizar fosfito como un sustrato, con un consenso general de GWQPQFYGTGL (SEQ ID NO:18), pero puede ser mejor definida como GWX₁PX₂X₃YX₄X₅GL (SEQ ID NO:19), donde X₁ es R, Q, T, o K, X₂ es A, V, Q, R, K, H, o E, X₃ es L o F, X₄ es G, F, o S, y X₅ es T, R, M, L, A, o S. Aspectos adicionales de

5 secuencias consenso encontradas mediante comparación de homólogos de PtxD y PtxD se describen en la Publicación de la Solicitud de Patente U.S. No. 2004/0091985 de Metcalf et al., la cual está incorporada en el presente documento como referencia.

Una enzima fosfito deshidrogenasa puede (o no) ser una enzima NAD-dependiente con elevada especificidad por el fosfito como sustrato (p.ej., Km ~50 µM) y/o con un peso

10 molecular de aproximadamente 36 kilodaltons. La enzima deshidrogenasa puede, pero no se requiere que, actúe como un homodímero, y/o tenga una actividad óptima a 35 °C y/o un pH de aproximadamente 7,25-7,75.

Hipofosfito deshidrogenasa – una enzima que cataliza la oxidación de hipofosfito a fosfito. La enzima puede, por ejemplo, ser una enzima bacteriana, tal como HtxA de

15 *Pseudomonas stutzeri* WM 88 (SEQ ID NO:20; GenBank AAC71711.1) o *Alcaligenes faecalis* (GenBank AAT12775.1).

Un polipéptido HtxA puede, pero no se requiere que, sea una enzima Fe-dependiente con elevada especificidad por hipofosfito como sustrato (p.ej., Km ~0.54-0.62 mM) y/o con un peso molecular de aproximadamente 32 kilodaltons. El polipéptido HtxA puede, pero no

20 se requiere que, actúe como un homodímero, y/o tenga una actividad óptima a 27 °C y/o un pH de aproximadamente 7,0.

Región codificante de ptxD o htxA– una secuencia que codifica para un polipéptido PtxD (es decir, una enzima fosfito deshidrogenasa) o un polipéptido HtxA (es decir, una enzima hipofosfito deshidrogenasa), respectivamente. Ejemplos de una región codificante de

25 ptxD proporcionada por ptxD de *Pseudomonas stutzeri* (SEQ ID NO:21; GenBank AF061070.1). En otros ejemplos, una región codificante de tipo ptxD con al menos un 80% o 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:21 puede utilizarse. En otros ejemplos, una región codificante que codifica para un polipéptido con al menos 50%, 60%, 80%, 90%, 95% o completa identidad con uno o más de los polipéptidos de las SEQ ID NOS:1-14 puede

30 utilizarse.

II. Generación de plantas y hongos transgénicos

La presente descripción proporciona métodos para preparar plantas transgénicas y hongos transgénicos que tienen un metabolismo de fósforo modificado. Los métodos pueden

35 utilizarse para crear, como objetivo principal, plantas y/u hongos transgénicos (o al menos una célula vegetal o fúngica) que llevan un constructo de ácido nucleico que codifica para

una enzima de oxidación de fósforo, como por ejemplo, para un mejor crecimiento sobre un fertilizante de fosfito y/o hipofosfito en agricultura. Alternativamente, o adicionalmente, los métodos pueden ser utilizados para crear, como objetivo principal, plantas y/u hongos transgénicos que llevan un constructo que incluye otro gen de interés, incluyendo también el

5 constructo un gen que codifica para una enzima de oxidación de fósforo que actúa como un marcador de selección para facilitar la identificación y/o aislamiento de las plantas u hongos transgénicos. Las etapas del método descrito en esta sección y a lo largo de la presente descripción pueden ser llevadas a cabo mediante cualquier combinación adecuada, en cualquier orden adecuado y repetidas cualquier número de veces que sea apropiado.

10 La Figura 1 muestra un diagrama de flujo, esquemático, de un ejemplo de un método 20 para (i) preparar una planta transgénica (y/u hongo) que metaboliza al menos una forma reducida de fósforo ("RP") a fosfato y/o (ii) que utiliza, como un marcador de selección, un ácido nucleico que confiere una capacidad para metabolizar una forma reducida de fósforo a fosfato.

15 Al menos un constructo (o ácido nucleico) puede ser obtenido, como se indica en 22. Al menos el constructo 23 puede incluir al menos un primer gen 24, el cual puede ser al menos un gen quimérico que codifica para al menos una enzima ("RP-OxRe"), como por ejemplo, una fosfito deshidrogenasa, que cataliza la oxidación de una forma reducida de fósforo, como por ejemplo, la oxidación de fosfito a fosfato. El constructo 23 también puede

20 incluir al menos un segundo gen 26 ("Gen2"), el cual puede también (o no) ser un gen quimérico. En algunas realizaciones, al menos el primer gen puede ser un par de genes que codifican al menos dos polipéptidos distintos que catalizan cada uno la oxidación de al menos una forma reducida de fósforo. Al menos los dos polipéptidos pueden actuar para oxidar sustratos de fósforo en series (p.ej., catalizar la oxidación de hipofosfito a fosfito con un

25 primer polipéptido y luego catalizar la oxidación de fosfito a fosfato con un segundo polipéptido). En algunos ejemplos, al menos un segundo gen puede incluir un marcador de selección para su uso en plantas y/u hongos y/o puede incluir un gen(es) de interés primario, entre otros. El primer gen 24 y el segundo gen 26 pueden estar unidos, como por ejemplo, estando presentes en el mismo polinucleótido, o pueden estar presentes en los respectivos

30 polinucleótidos individuales. Cada gen puede ser construido, al menos en parte, fuera de las plantas, como por ejemplo, *in vitro* y/o en un microorganismo (p.ej., bacterias, levaduras, etc.). Además, cada gen puede ser capaz de expresarse en plantas, hongos, o en ambos que contengan el gen.

Al menos uno de los genes (24 y/o 26) puede ser introducido en al menos una planta

35 receptora 28 (u hongo), tejido vegetal o fúngico, y/o célula vegetal o célula fúngica, como se indica en 30. Al menos una planta, tejido, o célula, antes de la introducción de al menos un

gen, puede, al menos sustancialmente, requerir fosfato como fuente externa de fósforo para el crecimiento. En otras palabras, la planta, tejido, o célula puede ser al menos sustancialmente incapaz de metabolizar directamente una forma reducida de fósforo (como fosfito) como nutriente.

5 La introducción del al menos un gen puede ser llevada a cabo poniendo en contacto (a) al menos una planta/hongo, tejido, y/o célula y (b) una composición (un agente modificante) que incluye un ácido nucleico que comprende al menos un gen, bajo condiciones que favorecen la introducción del ácido nucleico dentro de la planta, tejido, y/o célula. La etapa de poner en contacto puede ser llevada a cabo mediante cualquier mecanismo
10 que genere contacto entre al menos una planta/hongo, tejido, y/o célula y la composición. La composición puede, por ejemplo, incluir uno o más polinucleótidos que contienen al menos un gen, con los polinucleótidos en y/o sobre un portador. Ejemplos de portadores que pueden ser adecuados incluyen: células biológicas (p.ej., células bacterianas), virus de plantas, partículas inertes, lípidos (en micelas y/o liposomas), y/o similares. Ejemplos del contacto
15 creado con una composición que incluye el gen puede incluir: poner en contacto una planta, tejido vegetal, o células vegetales con una bacteria (p.ej., una especie de *Agrobacterium*, tal como *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes*) que lleva al menos un gen, o con uno o más proyectiles que llevan al menos un gen (p.ej., partículas recubiertas con un polinucleótido que incluye al menos un gen y disparado a la planta, tejido o célula desde una
20 pistola de genes). De una manera más general, introducir al menos un gen puede ser llevado a cabo sobre una planta/hongo, tejido vegetal o fúngico, y/o planta o células fúngicas puede realizarse mediante infección, inyección, bombardeo de partículas, electroporación, fusión celular, lipofección, transfección mediada por calcio-fosfato, cualquier combinación de los mismos, o similares.

25 Los candidatos transgénicos 34 (también denominados candidatos de transformación) pueden ser generados, indicados en 36, mediante y/o después de poner en contacto la planta, tejido, y/o células y la composición. Los candidatos transgénicos pueden ser la planta/hongo, tejido, y/o células utilizadas para poner en contacto, o pueden ser derivados de cualquier otra generación (es decir, productos de progenie o división) de la planta/hongo, tejido, y/o células.
30 En cualquier caso, los candidatos transgénicos pueden ser semillas, plantas, tejidos, explantes, células aisladas, colonias celulares/agregados, y/o similares.

Puede llevarse a cabo la selección por crecimiento (es decir, una ventaja de crecimiento) de los candidatos transgénicos 34 en un medio selectivo 37, indicado en 38. Los candidatos 34 que poseen una ventaja de crecimiento sobre el medio selectivo, tal como las
35 plantas transgénicas 40, generalmente son sustancialmente más grandes que los otros candidatos. En otros ejemplos, la selección puede ser llevada a cabo con células vegetales (o

fúngicas) transformadas y puede incluir cultivar las células vegetales (o fúngicas) en un medio selectivo. En estos casos, cultivar las células puede permitir la selección y/o aislamiento de una o más colonias de células formadas mediante la etapa de cultivo. Las colonias pueden estar expresando una enzima, tal como una fosfito deshidrogenasa, que oxida una forma reducida de fósforo, evidenciado mediante la formación de la colonia en el medio.

Cualquier medio selectivo adecuado 37 puede ser utilizado de acuerdo con un marcador de selección provisto por al menos un primer gen y/o un marcador de selección (segundo) del gen que fue introducido. Por ejemplo, el medio selectivo puede incluir una forma reducida de fósforo, como hipofosfito y/o fosfito. La forma reducida de fósforo puede ser una fuente externa primaria de fósforo y/o puede ser al menos sustancialmente el único fósforo presente en el medio, lo cual significa que el medio está al menos sustancialmente sin fosfato (es decir, un medio bajo en fosfato o sin fosfato). Alternativamente, o adicionalmente, el medio selectivo puede incluir otro agente selectivo, como higromicina o fosfinotricina, si la selección por crecimiento está basada en el segundo gen 26 (p.ej., hph o bar) introducido dentro de la planta/hongo, tejido, y/o célula. Si la selección está basada en el segundo gen 26, pueden llevarse a cabo ensayos adicionales (p.ej., crecimiento en medio que contiene fosfito, PCR, Southern blot, etc.) para analizar la introducción de al menos un primer gen que codifica para al menos una RP-oxidoreductasa. En cualquier caso, el medio puede incluir o ser predominantemente líquido y puede (o no) incluir una matriz o sustrato, como un gel (p.ej., agar, agarosa, gelatina, etc.) o suelo, entre otros.

La selección para crecimiento puede ser llevada a cabo en cualquier recipiente adecuado 42 (y/o contenedor) o puede ser llevada a cabo sin un recipiente o contenedor, tal como en un campo. Ejemplos de los recipientes que pueden ser adecuados incluyen recipientes cubiertos o no e incluyen placas o discos de único o múltiples pocillos (p.ej., discos de Petri), tarros, bandejas, cajas, etc.

La planta transgénica 40 puede ser aislada, como se indica en 44. La planta 40 puede tener una ventaja de crecimiento conferida mediante el ácido nucleico 23 para el crecimiento sobre una forma reducida de fósforo, en relación a una variedad no transgénica de la planta (p.ej., planta 28) a partir de la cual se derivan las plantas transgénicas 40. Enunciado diferentemente, el ácido nucleico 23 confiere una capacidad para metabolizar la forma reducida de fósforo como nutriente. En algunas realizaciones, la planta transgénica 40 puede ser regenerada a partir de células o tejido vegetal transformado. Por ejemplo, al menos una porción de una colonia de células producidas cultivando las células vegetales en un medio selectivo (p.ej., fosfito) puede ser utilizada para regenerar la planta transgénica. Aspectos adicionales para la generalización de plantas y hongos transgénicos se describen en la presente descripción, así como en los Ejemplos de la Sección IV.

La Figura 2 muestra una representación esquemática de un ácido nucleico 23 para su uso en el método 20 (Fig. 1). El gen 24 puede denominarse un gen RP-OxRe 46 que se expresa como se indica en 48, una oxidoreductasa de fósforo reducido 50 (p.ej., una fosfito deshidrogenasa). El gen 24 incluye una región codificante 52 que codifica para una oxidoreductasa. El gen 24 también puede incluir un promotor de la transcripción 54 unido operativamente a la región codificante 52, y un terminador de la transcripción 56 unido operativamente a la región codificante 52.

El promotor 54 y el terminador 56 pueden ser funcionales en plantas y/u hongos. Por lo tanto, el promotor y/o el terminador pueden originarse a partir de una planta u hongo, o de un virus o una bacteria que infecta plantas u hongos, entre otros. Ejemplos de promotores que pueden ser adecuados para el uso en plantas incluyen: el promotor 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor. Otros promotores que pueden ser adecuados para el uso en plantas incluyen un promotor PLDZ2 a partir del gen de la Fosfolipasa DZ2 (PLDZ2) (Modelo de gen AT3G05630.1; TAIR accession Gene:2078036) de *Arabidopsis thaliana*, el cual es inducible en condiciones de baja disponibilidad de fosfato para la planta (Cruz-Ramírez et al., PNAS 2006, 103:6765-6770, cuya descripción está incorporada en el presente documento como referencia). Alternativamente, o adicionalmente, el promotor puede ser un promotor específico de raíz, tal como el Pht1 de *Arabidopsis*; el gen transportador de 2 fosfato (NCBI NM_123703.1; GeneID:834355) o el promotor del gen MtPT1 o del gen MtPT2 (GenBank: AF000354.1 y AF000355.1) de *Medicago truncatula* (Xiao, et al, Plant Biology, 2006, 8:439-449, cuya descripción está incorporada en el presente documento como referencia).

Además, el primer gen 24 puede incluir regiones transcritas pero no traducidas, tales como la secuencia líder 5' y/o la región 5' no traducida 58, una región 3' no traducida 60, y/o uno o más intrones 62. El primer gen 24 puede ser proporcionado por un ácido nucleico 23 que incluye otras secuencias adecuadas, tales como al menos un segundo gen 26, secuencias de control de la replicación para la replicación en bacterias u otras especies no vegetales, un marcador de selección para otras especies (p.ej., bacterias), o cualquier combinación de los mismos, entre otros. En algunas realizaciones, el ácido nucleico 23 puede ser cualquier combinación de ADN o ARN lineal o circular (es decir, un bucle cerrado), al menos mayoritariamente de doble cadena o al menos mayoritariamente de cadena simple.

La Figura 3 muestra un mecanismo propuesto 70 para la oxidación de hipofosfito a fosfato en bacterias, catalizada mediante enzimas expresadas a partir de genes ptxD y htxA. El mecanismo propuesto presentado aquí es únicamente para fines ilustrativos, y no pretende limitar la definición de cualquiera de los componentes mostrados, tales como los genes ptxD o htxA o los polipéptidos PtxD o HtxA, ni limitar el alcance de la invención.

El mecanismo 70 muestra que un ion hipofosfito 72 que puede ser oxidado a un ion

fosfito 74 mediante la acción de un polipéptido HtxA 76 (hipofosfito:2-oxoglutarato dioxigenasa) codificada por un gen htxA. El polipéptido HtxA 76 puede utilizar Fe^{2+} 78 como un cofactor y 2-oxoglutarato 80 como un donador de electrones. Adicionalmente, la enzima 76 puede convertir el 2-oxoglutarato 80 en succinato 82, y el oxígeno molecular 84 en dióxido de carbono 86.

El ion fosfito 74, a su vez, puede ser oxidado a un ion fosfato 88 mediante la acción de un polipéptido PtxD 90. El polipéptido 90 puede utilizar NAD^+ 92 como un aceptor de electrones que es reducido a NADH 94.

10 **III. Uso de plantas y hongos transgénicos**

Las plantas transgénicas descritas en la presente invención pueden ser utilizadas para cualquier propósito adecuado. Ejemplos de propósitos incluyen: la producción de un producto comercial (p.ej., alimentos, madera, productos farmacéuticos, tinturas, colorantes, aceites, lubricantes, tintas, goma, algodón, fibras, biocombustibles, etc.), y/o remediación de agua. La remediación de agua, como se utiliza en la presente invención, incluye cualquier eliminación de contaminación o al menos un contaminante desde una masa de agua y/o desde un suelo que ha entrado en contacto con agua contaminada.

Se proporciona un método de remediación de agua. Cualquier planta transgénica, hongos o ambos descritos en la presente pueden ser utilizados en el método. Las etapas del método descrito en la presente sección y a lo largo de la presente descripción pueden ser llevadas a cabo en cualquier orden adecuado, en cualquier combinación adecuada, con cada etapa llevada a cabo cualquier número de veces adecuado.

Pueden obtenerse una o más plantas transgénicas. Las plantas transgénicas pueden haber sido transformadas, en la generación actual o en una generación siguiente, con un constructo que confiere una capacidad de oxidar al menos una forma reducida de fósforo.

Obtener una o más plantas transgénicas puede incluir cualquier procedimiento adecuado. Por ejemplo, la etapa de obtener puede incluir introducir en la generación actual o, más típicamente, en una generación anterior de las plantas transgénicas, uno o más constructos que codifican para uno o más polipéptidos que oxidan una forma reducida de fósforo a fosfato.

La(s) planta(s) transgénica(s) puede(n) ponerse en contacto con agua para su remediación. Poner en contacto las plantas con agua puede incluir cualquier combinación de traer el agua hacia las plantas, traer las plantas hacia el agua y germinar semillas para las plantas en contacto con el agua. El agua puede ser sustancialmente estacionaria o puede estar fluyendo con respecto a las plantas. En algunas realizaciones, la etapa de poner en contacto puede incluir poner en contacto las plantas con un efluente industrial y/o municipal.

IV. Ejemplos

Los siguientes ejemplos describen aspectos y realizaciones seleccionados de la presente descripción, como ejemplos de métodos para preparar plantas transgénicas (incluyendo algas) y hongos transgénicos que metabolizan fosfito como fuente de fósforo, ejemplos de plantas transgénicas y hongos transgénicos, y ejemplos de métodos para utilizar un gen que codifica para una enzima fosfito deshidrogenasa como un marcador de selección para la selección de plantas transgénicas y hongos transgénicos. Los ejemplos se presentan para ilustración de la invención y no pretenden definir o limitar el alcance de la presente descripción.

Ejemplo 1. Generación de Plantas transgénicas que expresan una Enzima fosfito deshidrogenasa Bacteriana

Este ejemplo describe un ejemplo de un método para generar plantas transgénicas con metabolismo de fósforo modificado; ver Figs. 4-6.

La Figura 4 muestra un ejemplo del ácido nucleico, un gen quimérico 100, construido para su uso en la generación de una planta transgénica que metaboliza fosfito a fosfato, para permitir el crecimiento sobre fosfito en ausencia de fosfato. El gen fue construido utilizando el sistema Gateway® (Gateway® Technology, 2003, Invitrogen) como se describe en los siguientes párrafos.

El gen 100 incluye una secuencia promotora 35S 102 del Virus del Mosaico de la Coliflor (CaMV) unida operativamente a una secuencia codificante 104 (SEQ ID NO:21) de ptxD de *Pseudomonas stutzeri* WM88. La expresión del gen 100, indicado en 106, para producir el polipéptido PtxD (una enzima fosfito deshidrogenasa) está por lo tanto controlada/dirigida por el promotor 35S 102. El gen 100 opcionalmente puede incluir una secuencia de terminación 107, tal como un terminador 35S de CaMV, dispuesto corriente debajo de y unido operativamente a la secuencia codificante (y secuencia promotora). El gen puede adicionalmente incluir una secuencia 5' no traducida dispuesta entre la secuencia promotora y la secuencia codificante ptxD, y/o una secuencia 3' no traducida dispuesta entre la secuencia codificante ptxD y la secuencia de terminación. Además, el gen puede incluir un intrón que es transcrito junto con la secuencia codificante ptxD y que es eliminado del transcrito mediante splicing post-transcripcional.

La Figura 5 muestra un diagrama esquemático de parte de una estrategia utilizada para crear el gen 100 de la Fig. 4. Se sintetizaron un cebador directo 108 (SEQ ID NO:22) y un cebador reverso 110 (SEQ ID NO:23). Cada cebador tiene una región de hibridización 112, 114 que hibrida como se indica en 116, 118 en la parte inferior de la figura, ya sea en orientación directa o reversa a los extremos de la región codificante de ptxD 104. Cada

cebador tiene un sitio attB 120, 122 (attB1 o attB2) ubicado en la región 5' previa a la región de hibridización 112 o 114. Los cebadores fueron utilizados para amplificar la secuencia codificante 104 a partir de un plásmido (pWM302) utilizando la reacción en cadena de la polimerasa, para crear un producto amplificado de ptxD. Se generó un constructo del tamaño
 5 esperado, de aproximadamente 1000 pares de bases, detectado mediante electroforesis en gel y tinción del producto amplificado. Los cebadores alternativamente pueden ser diseñados para amplificar secuencias no traducidas adicionales desde corriente arriba y/o corriente abajo de la secuencia codificante de ptxD.

El producto amplificado de ptxD fue luego incorporado dentro de un vector
 10 plasmídico utilizando la recombinación sitio-específica provista por el sistema Gateway®. El producto amplificado fue recombinado con el plásmido pDONR221, vía los sitios attP1 y attP2 de pDONR 221 y los sitios attB1 y attB2 del producto amplificado, para crear un derivado ptxD de pDONR221, "clon inicial" pDONR221. El clon inicial tiene la secuencia codificante de ptxD de longitud completa flanqueada en lados opuestos por los sitios attL1 y
 15 attL2.

La secuencia ptxD del clon inicial fue luego mudada dentro de un vector aceptor mediante recombinación sitio-específica adicional para producir un constructo de expresión, pB7WG2D-ptxD. El vector aceptor fue pB7WG2D.1, el cual incluye, en orden alrededor del vector, (1) un promotor 35S, (2) sitios attR1 y attR2 dispuestos corriente abajo del promotor
 20 35S, (3) un terminador 35S, (4) un gen "bar" (confiere resistencia a fosfinotricina) como un marcador de selección en plantas, (5) un gen, SmSp^R, como un marcador de selección en bacterias, particularmente *Agrobacterium* (confiere resistencia a espectinomicina (Sp) y estreptomicina (Sm)), y (6) un gen EgfpER. La recombinación directa del sistema Gateway® formó el clon de expresión (pB7WG2D-ptxD) que incluye el gen 100 (ver Fig. 4), bar,
 25 SmSp^R, y EgfpER.

El constructo de expresión fue utilizado para transformar *Agrobacterium tumefaciens* electrocompetente mediante electroporación. Un clon de *Agrobacterium* transformado que llevaba el constructo de expresión fue seleccionado para sub-cultivo.

El clon de *Agrobacterium* transformado fue utilizado para transformar plantas de
 30 *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Col-0) (generalmente descrito en la presente invención como "tipo salvaje" (WT, *del inglés wild type*)) utilizando un método modificado de inmersión floral. Las progenies T0 transformadas fueron seleccionadas utilizando la resistencia a fosfinotricina. En particular, la selección fue llevado a cabo con medio MS 0.1X conteniendo fosfinotricina (20 mg/L). Veintiocho líneas resistentes fueron identificadas a través de
 35 amplificación por PCR del gen ptxD. Cada línea resistente fue analizada vía la progenie T1 utilizando medio MS 0.1X conteniendo fosfinotricina (20 mg/L) para ver la segregación 3:1

(resistente:sensible) de la progenie T1, para identificar plantas que mostraban transmisión Mendeliana del gen *ptxD*. Diez plantas transgénicas *ptxD* homocigotas fueron establecidas a partir de la progenie T2 de la progenie T1 exhibiendo la transmisión 3:1.

Las plantas transgénicas *ptxD* fueron evaluadas en cuanto a su capacidad para crecer en medio conteniendo solamente fosfito (p.ej., aproximadamente 0,1 a 5 mM) como fuente externa de fósforo. Las plantas control no mostraron crecimiento sustancial en este medio (es decir, mostraron crecimiento limitado a las reservas de fósforo internas acumuladas en la semilla), mientras que las plantas transgénicas crecieron eficientemente, demostrando así que las plantas transgénicas son capaces de metabolizar una forma reducida de fósforo (fosfito) como fuente de fósforo.

El constructo de expresión *ptxD* también fue utilizado para proporcionar un marcador de selección para la selección de las plantas transgénicas con metabolismo de fósforo modificado. Las plantas de tipo salvaje Col-0 fueron transformadas utilizando *Agrobacterium* que contenía el constructo de expresión *ptxD*. La progenie T0 (semillas) fueron sembradas sobre un medio con fosfito (5 mM) como la fuente de fósforo. La Figura 6 muestra datos de crecimiento de la progenie T0, en relación a las plantas de tipo salvaje, sobre el medio de fosfito. Las plantas transgénicas 130 (con un círculo en el panel de la derecha) tienen una ventaja de crecimiento sustancial en relación a las plantas de tipo salvaje 132 (panel de la izquierda) y en relación a otras progenies T0 134 que aparentemente no fueron transformadas con el constructo de expresión y/o que no expresaron eficientemente el polipéptido PtxD a partir del constructo introducido.

Aspectos adicionales para generar plantas transgénicas con metabolismo de fósforo modificado se describen en la Solicitud de Patente Provisional U.S. No. de serie 61/199,784, presentada el 19 de Noviembre de 2008, la cual está incorporada en el presente documento como referencia.

Ejemplo 2. Caracterización de plantas de *Arabidopsis* que expresan *PtxD*

Este ejemplo presenta una investigación de las características de crecimiento de la línea parental de *Arabidopsis* ("tipo salvaje" (WT) o control), Col-0, y dos de las líneas de *Arabidopsis* transgénicas descritas en el Ejemplo 1 y que comprenden el constructo de expresión *ptxD* del Ejemplo 1; ver Figs. 7-12.

Dos líneas de *Arabidopsis* transgénicas, denominadas PTXD-3 y PTXD-5, fueron preparadas y aisladas como se describe en el Ejemplo 1. Cada línea es homocigota para el constructo de expresión *ptxD* del Ejemplo 1.

La línea parental y las líneas transgénicas PTXD-3 y PTXD-5 fueron evaluadas en cuanto a la capacidad para crecer sobre un medio líquido, con o sin fosfato inorgánico (Pi)

como fuente de fósforo. Semillas de las líneas parental y transgénica fueron germinadas en medio líquido y evaluadas en cuanto a crecimiento. En ausencia de fosfato (y fosfito), ni la línea parental ni las líneas transgénicas mostraron crecimiento significativo más allá de la germinación. (Cada línea exhibía pobre crecimiento durante un corto tiempo, lo cual
 5 aparentemente era permitido por los depósitos de fosfato en las semillas, los cuales eran rápidamente agotados a partir de las semillas.). Por el contrario, tanto la línea parental (WT) como las líneas transgénicas crecieron eficientemente en presencia de 50, 100, y 1000 μM de fosfato.

La Figura 7 muestra fotografías de datos obtenidos a partir de ensayos del
 10 crecimiento de la línea parental (WT) y las líneas transgénicas PTXD-3 y PTXD-5 sobre un medio líquido para crecimiento, con o sin fosfito (Phi) o fosfato (Pi) como la fuente de fósforo. En la Fig. 7, la ausencia o presencia de crecimiento vegetal sostenido (más allá de la etapa de germinación) es identificada con un signo menos (-) o más (+), respectivamente. Tanto la línea parental como las líneas transgénicas crecieron eficientemente en presencia de
 15 fosfato inorgánico 50 μM (fila inferior). Asimismo, ni la línea parental ni las líneas transgénicas mostraron crecimiento detectable en ausencia de tanto fosfato como fosfito. Sin embargo, ambas líneas transgénicas, pero no la línea parental, crecieron eficientemente en presencia de 50, 100, y 1000 μM de fosfito inorgánico como fuente de fósforo. Por lo tanto, las líneas transgénicas adquirieron la capacidad de metabolizar fosfito como fuente de fósforo
 20 para favorecer el crecimiento vegetal.

La Figura 8 muestra un gráfico de barras con datos obtenidos a partir de ensayos de la capacidad de las líneas de tipo salvaje y de *Arabidopsis* transgénicas de la Fig. 7 para reducir la cantidad de fósforo total en un medio de crecimiento conteniendo diferentes concentraciones de fosfito (50, 100, y 1000 μM) como fuente de fósforo.

Las líneas tipo salvaje y las dos transgénicas de *Arabidopsis*, PTXD-3 y PTXD-5, fueron germinadas y cultivadas en contenedores plásticos de un litro con medio líquido Murashige y Skoog 0.1X carente de fosfato y suplementado con 50, 100 o 1000 micromolar de ácido fosforoso (H_3PO_3). Se dejaron crecer cien plantas por contenedor plástico durante 45 días en una cámara de crecimiento con un ciclo 16:8 de luz:oscuridad para cada período de
 30 24-horas. Las plantas fueron cubiertas para evitar la pérdida de humedad. Una doble capa de malla plástica se ubicó donde las semillas fueron sembradas para que germinaran por encima del medio líquido en cada contenedor plástico.

Después de la retirada de las plantas, utilizando un método de vanadio-molibdato, transcurridos los 45 días de crecimiento, el contenido de fósforo total fue determinado en el
 35 medio líquido. Brevemente, se digirieron 5 mL de medio líquido de cada muestra con ácido nítrico:ácido perclórico ($\text{HNO}_3\text{:HClO}_4$; 5:1). A continuación, el contenido de fósforo fue

determinado con un método colorimétrico basado en la adición de una solución de molibdato de amonio (20 mM) y metavanadato de amonio (10 mM) en ácido perclórico 70%. Después de una incubación de 20 minutos a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 400 nm con un espectrofotómetro.

5 En la Fig. 8, las primeras tres barras etiquetadas como “inicial” representan la concentración inicial de fósforo total en el medio sin plantas. Los conjuntos de barras etiquetadas como WT (Col-0), PTXD-3, y PTXD-5 representan el contenido de fósforo total en el medio (inicialmente 50 μ M, 100 μ M, o 1000 μ M de fosfito) después de 45 días de incubación en presencia de las correspondientes líneas de *Arabidopsis*. Las plantas transgénicas (PTXD-3 y PTXD-5), pero no las plantas de tipo salvaje, disminuyeron el
10 contenido de fósforo en el medio por más del 50%. La disminución en el contenido de fósforo, que representa una eliminación de fosfito del medio, se debe a la toma de fosfito por parte de las plantas. Las líneas transgénicas tienen una elevada capacidad de eliminar fosfito del medio porque son capaces de convertirlo en fosfato, lo cual sostiene el crecimiento
15 vegetal. Esta capacidad de eliminar fosfito desde un medio acuoso puede ser explotada para eliminar fosfito de agua de desecho (residual), tal como efluentes producidos por las fábricas de CD/DVD.

La Figura 9 muestra una representación esquemática de la distribución de plantas parentales (WT) y transgénicas ptxD (PTXD) de *Arabidopsis* utilizadas para los experimentos
20 de las Figs. 10 y 11.

Las Figuras 10 y 11 muestran fotografías de plantas parentales y ptxD transgénicas distribuidas de acuerdo con la Fig. 9 y evaluado su crecimiento sobre un sustrato que contiene fosfato agregado (Pi) (Fig. 10) o fosfito (Phi) (Fig. 11) como fuente de fósforo. La presencia o ausencia de crecimiento sostenido (más allá de la etapa de germinación) se indica mediante
25 un símbolo más (+) o menos (-), respectivamente. La Figura 10 muestra crecimiento similar de las plantas de tipo salvaje y las plantas transgénicas sobre fosfato. Por el contrario, la Fig. 11 muestra que solamente las plantas transgénicas fueron capaces de mostrar crecimiento sostenido sobre fosfito. Las plantas aquí descritas y las de la Fig. 11 fueron crecidas en una mezcla de arena:vermiculita (1:1) y recibieron agua y soluciones de nutrientes (carente de
30 cualquier otra fuente de fósforo excepto como se indicó previamente) periódicamente.

La Figura 12 muestra un gráfico de barras de datos obtenidos a partir de ensayos sobre la capacidad de las líneas vegetales de *Arabidopsis* de la Fig. 7 para aumentar de peso cuando son cultivadas en presencia de diversas fuentes de fósforo. El peso seco de las tres plantas cultivadas en arena:vermiculita (1:1) como sustrato fue graficado en la figura con
35 respecto a cada línea vegetal particular y la(s) fuente(s) de fósforo. Las plantas de tipo salvaje no crecieron sustancialmente con fosfito como fuente de fósforo, mientras que las líneas

transgénicas crecieron similarmente o mejor sobre fosfito (Phi) en relación a fosfato (Pi).

Ejemplo 3. Plantas transgénicas de Tabaco que expresan PtxD

Este ejemplo describe la creación y caracterización de *Nicotiana tabacum* (tabaco) transgénico que comprende el constructo de expresión ptxD del Ejemplo 1; ver Fig. 13.

Nicotiana tabacum fue transformada con el constructo de expresión descrito en el Ejemplo 1. En particular, explantes de hojas de tabaco fueron co-cultivadas con una cepa de *Agrobacterium* que llevaba un constructo 35S::PtxD (Ejemplo 1) dentro de su T-DNA. Se permitió que discos de hoja se regeneraran en medio MS conteniendo fosfito 1 mM como la única fuente de fósforo. Las plantas regeneradas a partir de estos discos de hoja sobre medio que contenía fosfito fueron transferidas a suelo y se las dejó establecer semilla bajo condiciones de invernadero.

La Figura 13 muestra fotografías de semillas transgénicas T2 de tabaco, homocigotas para el gen 35S::PtxD, y plantines control de tabaco tomados 25 días luego de la germinación en medio MS conteniendo ya sea fosfato (1 mM Pi) o fosfito (1 mM Phi) como la única fuente de fósforo. La presencia o ausencia de crecimiento (luego del agotamiento del fósforo brindado por la semilla) se indica mediante un símbolo más (+) o menos (-), respectivamente. Se puede observar que los plantines control germinaron pero fueron incapaces de sostener crecimiento normal en medio conteniendo fosfito, comparado con cuando el fosfato es suministrado como fuente de fósforo. En contraste, las plantas de tabaco de cada línea transgénica mostraron crecimiento sostenido en presencia de fosfito o fosfato como la fuente de fósforo. Estos experimentos demuestran la capacidad de modificar el metabolismo de fósforo en tabaco.

La Figura 14 muestra fotografías de experimentos de crecimiento adicionales llevados a cabo con las líneas control y transgénicas de tabaco de la Fig. 13. Los plantines fueron germinados y mantenidos en medio MS suplementado con fosfito 1 mM como la única fuente de fósforo durante 25 días. Los plantines fueron luego transferidos a recipientes para cultivo de tejido conteniendo MS con fosfito 1 mM como la única fuente de fósforo y se los dejó crecer durante 25 días adicionales en una cámara de crecimiento vegetal a 23 °C, con un fotoperíodo de 18 h de luz, seguido de 6 h de oscuridad para cada período de 24 horas. Se puede observar que las plantas transgénicas PtxD son capaces de sostener crecimiento rápido en medio conteniendo fosfito como la única fuente de fósforo, mientras que la planta control es incapaz de utilizar fosfito para su crecimiento y desarrollo.

Ejemplo 4. Algas transgénicas con metabolismo de fósforo modificado

Este ejemplo describe un método para crear una línea transgénica de algas que

expresa una enzima fosfito deshidrogenasa que permite el crecimiento de las algas sobre fosfito como fuente de fósforo.

Las algas fotosintéticas han sido adaptadas transgénicamente para muchas aplicaciones, tales como producción de biocombustibles, agentes farmacéuticos, antígenos, y
 5 similares. Las algas pueden ser cultivadas en grandes tanques de fermentación que incorporan un sistema de iluminación para favorecer la fotosíntesis y promover el crecimiento. Generalmente, los tanques de fermentación deben estar protegidos contra la contaminación con algas no deseadas (u otros organismos). Con este fin, las algas se hacen crecer bajo luz artificial en lugar de luz solar, para reducir el riesgo de contaminación. En este sentido, el
 10 crecimiento de las algas con exposición a luz solar en tanques abiertos o campos (p.ej., en estanques), lo cual sería mucho más económico, no es factible actualmente debido al alto riesgo de contaminación.

La presente descripción permite el uso de luz solar y campos abiertos para el crecimiento de las algas diana, mediante la modificación de las algas diana para el
 15 crecimiento sobre fosfito como fuente de fósforo. Las algas diana modificadas serían capaces de sobrevivir en un medio conteniendo fosfito y carente de fosfato, que no asistiría al crecimiento de algas no deseadas (contaminantes) debido a que ellas requerirían fosfato. De la misma manera, la contaminación por algas no deseadas sería reducida o eliminada, permitiendo que el alga diana sea cultivada a un bajo coste en un tanque abierto o en el
 20 campo con la fotosíntesis dirigida por luz solar.

Se genera un constructo de expresión para la transformación de una especie de algas, como *Chlamydomonas reinhardtii*. El constructo puede expresar cualquier fosfito deshidrogenasa adecuada (y, opcionalmente, una hipofosfito deshidrogenasa, también). En la presente ilustración, el constructo expresa PtxD a partir de la secuencia codificante de ptxD.
 25 El constructo utiliza una secuencia promotora híbrida para dirigir la expresión al tiempo que evita el silenciamiento del gen: el promotor HSP70A está fusionado corriente arriba del promotor RBCS2 (cada promotor es provisto por *C. reinhardtii*)(Schroda et al, 2000, Plant J. 21: 121-131). La secuencia promotora híbrida dirige la expresión del primer intrón de RBS2 de *C. reinhardtii*, el cual está fusionado a la secuencia codificante del gen ptxD
 30 (*Pseudomonas stutzeri*), el cual, a su vez, está fusionado a la secuencia de terminación de la transcripción del gen RBS2. Para mejorar la expresión del polipéptido PtxD a partir del constructo, la secuencia codificante ptxD puede ser modificada para tener una G o una C en la tercera posición de codones que permiten este cambio (vía degeneración del código genético), para optimizar la utilización del codón para la traducción en *C. reinhardtii*.

35 El constructo de expresión ptxD puede presentarse como un plásmido que contiene un origen de replicación funcional en *E. coli*, un marcador de selección para *E. coli* (p.ej., un

gen de resistencia a ampicilina), y un marcador de selección funcional en *C. reinhardtii*, entre otros. Un marcador de selección de ejemplo para *C. reinhardtii* codifica una proteína de unión a zeomicina que confiere resistencia a zeomicina y fleomicina (Lumbreras et al., 1998, Plant J. 14: 441-447).

5 El constructo de expresión ptxD es introducido dentro de *C. reinhardtii* mediante cualquier mecanismo adecuado, tal como bombardeo de partículas (Debuchy et al., 1989, EMBO J. 8: 2803-2809) o con la ayuda de perlas de vidrio (Kindle et al., 1991, PNAS 88: 1721-1725), entre otros.

La transformación de *C. reinhardtii* con perlas de vidrio puede ser llevada a cabo
 10 como se describe en Kindle (1990, PNAS 87: 1228-1232). Las paredes celulares son eliminadas de las células de *C. reinhardtii* incubándolas en autolisina no diluida durante 30-60 min a temperatura ambiente. La efectividad del tratamiento es controlada mediante la sensibilidad frente a detergente Nonidet P-40 0,004% (Sigma). Las células son cosechadas de la autolisina mediante centrifugación, resuspendidas en medio líquido y transformadas
 15 inmediatamente para evitar la regeneración de la pared celular. Las perlas de vidrio (0,45-0,52 mm) se lavan con ácido sulfúrico concentrado, posteriormente se enjuagan profundamente con agua destilada, se secan, y se esterilizan mediante horneado a 250 °C durante 2-3 h. Las perlas de vidrio (300 mg) se agregan a 0,4 mL de células, se agregan 2 microgramos de ADN de plásmido, y las células son agitadas a máxima velocidad en un
 20 mezclador Fisher Vortex Genie II en tubos cónicos de centrifuga descartables de polipropileno de 15-mL. Se deja que las perlas decanten, y las células se dispersan sobre placas de agar selectivo con un anza de vidrio. Para la selección directa de transformantes resistentes a zeomicina, las células son agitadas con perlas de vidrio y ADN, diluidas en 20 mL de medio líquido TAP y se dejan para que expresen el gen ble incubando a 25 °C en la
 25 luz ($80 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante 15-18 h con agitación suave. Las células son posteriormente agrupadas mediante centrifugación, resuspendidas en 5 mL de TAP conteniendo agar fundido 0,5%, y son volcadas sobre la superficie de una placa de TAP/ agar 2% conteniendo zeomicina a 20 mg/mL.

Las colonias resistentes a Zeomicina son luego dispersadas en medio TAP carente de
 30 cualquier fuente de fosfato, pero suplementado con fosfito 1 mM como fuente de fósforo. Las placas son incubadas durante 18 a 24 h a 25 °C a la luz y las colonias que crecen son capaces de utilizar fosfito como fuente de fósforo.

Ejemplo 5. *Trichoderma* transgénico que expresa una fosfito deshidrogenasa

35 Este ejemplo describe un método para crear un hongo del género *Trichoderma* modificado para expresar una enzima fosfito deshidrogenasa, para rendir el hongo capaz de

crecer sobre fosfito como fuente de fósforo.

A. Introducción

Las especies de *Trichoderma* son hongos de vida libre que son comunes en ecosistemas de suelo y raíz. Descubrimientos recientes muestran que se han comportado
 5 como simbioses vegetales no virulentos, así como también son parásitos de hongos fitopatogénicos. Algunas cepas establecen una colonización robusta y duradera de las superficies de la raíz y penetran dentro de la epidermis. Como habitantes permanentes del suelo y hongos competentes con la rizosfera, las especies de *Trichoderma* han sido utilizadas exitosamente como agentes de control biológico para el manejo de patógenos vegetales.
 10 Varios mecanismos de biocontrol han sido propuestos para *Trichoderma*, incluyendo competencia, micoparasitismo y la inducción de respuestas de defensa en la planta debido a la colonización de los espacios intercelulares de la raíz vegetal (Howell, 2003; Yedidia et al., 1999). La colonización de la raíz por especies de *Trichoderma* también mejora frecuentemente el crecimiento y desarrollo de la raíz, la productividad del cultivo, la
 15 resistencia a estrés abióticos, y la toma y utilización de nutrientes.

Las especies de *Trichoderma* pueden ser modificadas para expresar PtxD o un ortólogo o derivado del mismo, para dar lugar a *Trichoderma* capaz de crecer sobre fosfito. Opcionalmente, *Trichoderma* también puede ser modificada para expresar una hipofosfito deshidrogenasa (p.ej., HtxA). En cualquier caso, estas *Trichoderma* transgénicas pueden
 20 producirse para diversos usos. Por ejemplo, pueden ser utilizadas para fines de biorremediación, tales como para eliminar fosfito (y/o hipofosfito) de agua de desecho de la industria de CD y DVD. Las *Trichoderma* transgénicas pueden ser utilizadas para biorremediación solas o en combinación con una planta transgénica (p.ej., Ejemplo 1). El uso de un sistema combinado de planta transgénica/hongo para la eliminación de fosfito (y/o
 25 hipofosfito) puede ser más eficiente que el uso de alguno de estos sólo. Alternativamente, la *Trichoderma* transgénica puede estar asociada con plantas para protegerlas de hongos patógenos. En este caso, las plantas puede ser no transgénicas de modo que requieran fosfato como fuente de fósforo, o pueden ser plantas transgénicas que puedan crecer sobre fosfito como fuente de fósforo (p.ej., Ejemplo 1). En cualquier caso, la *Trichoderma* transgénica
 30 puede funcionar como un poderoso fungicida, dado que tanto la *Trichoderma* en sí misma como su utilización del fosfito puede proteger las plantas.

B. Protocolo

La transformación de protoplastos de *Trichoderma atroviride* (IMI 206040) es llevada a cabo utilizando métodos conocidos en el arte, tales como el método PEG-CaCl₂
 35 (Herrera-Estrella et al., 1990; Baek & Kenerley, 1998), biolística (Lorito et al., 1993), o electroporación (Goldman et al., 1990), entre otros. El ADN transformante es un plásmido o

un producto de PCR que lleva un gen que codifica una enzima fosfito deshidrogenasa (p.ej., PtxD) bajo el control del promotor pki de *Trichoderma reesei* o el promotor trpC de *Aspergillus nidulans*, y el terminador blu17 de *T. atroviride* o el trpC de *A. nidulans*. Los plásmidos son purificados utilizando el kit Qiagen Plasmid Midi Kit o gradientes de cloruro de cesio. Para la selección, se plaquean alícuotas de 100, 200, y 500 µL utilizando una capa de agar que contiene sorbitol 1,2 M y H₃PO₃ 200 mM como única fuente de fósforo, inmediatamente después del tratamiento o a continuación de un período de incubación de 2-4 horas de los protoplastos en sorbitol 1,2 M. Después de tres o cuatro días de incubación a 28 °C, las colonias capaces de crecer sobre fosfito como fuente de fósforo deberían aparecer sobre las placas. Las transformantes deberían aparecer solamente cuando son transformadas con constructos que llevan las secuencias codificantes *ptxD*. Las transformantes son sometidas a tres rondas de cultivo monoespórico para obtener homocariones. Alternativamente, las transformantes de *Trichoderma* pueden ser obtenidas mediante co-transformación utilizando un marcador de resistencia a antibiótico para selección (tal como hph, el cual confiere resistencia a higromicina), en combinación con un constructo que lleva el gen *ptxD*. Esta última estrategia, las transformantes resistentes a higromicina que llevan el gen *ptxD* son seleccionadas primero, y las cepas capaces de utilizar fosfito como fuente de fósforo pueden ser seleccionadas en una etapa posterior como se mencionó anteriormente, o son identificadas en un ensayo de expresión del gen *ptxD*.

Se producen conidios de transformantes que llevan un cassette de utilización de fosfito mediante procesos sólidos o de fermentación sumergida, conocidos en el arte (Cavalcante et al., 2008). Los conidios pueden ser aplicados a plantas, semillas de las mismas, o a suelo, entre otros. Por ejemplo, los conidios pueden ser aplicados a semillas (p.ej., con una tira de látex, tal como Rhoplex B-15J), directamente a raíces de plantas como una suspensión de esporas (p.ej., con una tira), o a suelo en agua como una suspensión de esporas o en una mezcla de preparación de salvado de trigo/turba (0,5%, p/p), entre otros.

Ejemplo 6. Micorrizas formadas con un hongo que expresa una Enzima fosfito deshidrogenasa bacteriana

Este ejemplo describe un método para crear un hongo de tipo micorrizal modificado transgénicamente para expresar una enzima fosfito deshidrogenasa (y/o una enzima hipofosfito deshidrogenasa bacteriana), la cual proporciona al hongo transgénico la capacidad de crecer sobre fosfito (y/o hipofosfito) como fuente de fósforo. También se describe un método para formar micorrizas mediante asociación del hongo transgénico con una planta. Las micorrizas formadas con estos hongos transgénicos y la planta pueden suministrar a la planta fosfato para crecimiento. En este caso particular, la planta en sí misma no necesitaría

ser transgénica, dado que las micorrizas harían todo el trabajo de convertir fosfito (y/o hipofosfito) en fosfato.

A. Introducción

El fósforo (P) es un nutriente esencial que puede limitar la productividad vegetal en
 5 ecosistemas naturales y agronómicos. Una planta puede formar una relación simbiótica
 natural con un hongo micorrizal, el cual actúa como una extensión del sistema radicular de la
 planta para proporcionar a la planta con los nutrientes minerales, particularmente fosfato, a
 cambio de moléculas que contienen carbono derivadas de la actividad fotosintética de la
 planta (Smith and Read, 1997). Los hongos micorrizales penetran en las células de la raíz de
 10 la planta, estableciendo las membranas plasmáticas del hongo y la planta una asociación
 cercana para formar las así denominadas estructuras arbusculares. Los nutrientes minerales,
 particularmente fosfato, pueden ser transferidos desde células fúngicas a células vegetales en
 las estructuras arbusculares. Adicionalmente a los nutrientes minerales, las micorrizas
 también pueden mejorar la capacidad de la planta de tomar agua y pueden protegerla de
 15 metales pesados (Khan, A.G., 2006; Forbes et al., 1998).

Las micorrizas tienen que competir con otros microorganismos por la disponibilidad
 de fosfato. Por lo tanto, las cepas micorrizales transgénicas que expresan un gen que codifica
 una enzima fosfito deshidrogenasa capaz de convertir fosfito en fosfato pueden ser utilizadas
 para suministrar a las plantas fosfato. En este caso, el hongo micorrizal convertirá fosfito en
 20 fosfato, el cual luego puede ser transferido a las raíces de plantas no transgénicas incapaces
 de metabolizar fosfito. Alternativamente, para hacer el sistema más eficiente, puede utilizarse
 una asociación de hongos micorrizales transgénicos y plantas transgénicas ambos expresando
 un gen que codifica fosfito deshidrogenasa. La asociación de hongos micorrizales
 transgénicos con plantas no transgénicas o transgénicas puede ser utilizada para mejorar la
 25 productividad de la planta utilizando fertilizantes en los cuales el fosfato ha sido reemplazado
 por fosfito, o para biorremediar efluentes de fábricas productoras de CD o DVD o suelos en
 los cuales el fosfito ha sido utilizado como fungicida (Ohtake, H., 1995)

B. Protocolo

Este ejemplo utiliza la secuencia codificante de ptxD de *Pseudomonas stutzeri*. Sin
 30 embargo, puede explotarse cualquier secuencia codificante adecuada para una fosfito
 deshidrogenasa.

Se crea un constructo de gen ubicando la secuencia codificante de ptxD bajo el
 control del promotor de la gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa (gpd) de *Aspergillus*
nidulans y la región terminadora de la transcripción del gen de la triptófano sintetasa (*trpC*)
 35 de *A. nidulans*. También se incluye un marcador de selección tal como el gen aph de *E. coli*,
 el cual confiere resistencia a higromicina, o el gen ble, el cual confiere resistencia a la

fleomicina, en la molécula transformante (Barrett et al., 1990).

Para la transformación, se obtienen protoplastos de un hongo micorrizal (p.ej., *Laccaria bicolor*, *Cenococcum geophilum*, *Hebeloma cylindrosporum*, *Paxillus involutus*, *Gigaspora rosea*, *Glomus mosseae*, *Glomus aggregatum*, *Glomus intraradices*, *Pisolithus tinctorius*, etc.) de acuerdo con el protocolo de Barrett et al. (1990). Para aislar protoplastos, los micelios son recolectados y lavados varias veces con agua estéril y luego son tratados con enzimas hidrolíticas (una mezcla de celulasa, quitinasa, y proteasas, con 5 a 10 mg/mL de cada enzima) en una solución osmótica (PDB; papa-dextrosa-caldo con manitol 0,8 M o sacarosa 0,6 M) para degradar las paredes celulares. Los micelios son incubados con las enzimas durante 1 a 3 horas a 32 °C con agitación constante (100 rpm). La suspensión de protoplastos es filtrada y lavada con la solución osmótica. Los protoplastos se recuperan mediante centrifugación durante 10 min a 800 rpm y el pellet de protoplastos es resuspendido en buffer PDB y se determina el número de protoplastos mediante conteo bajo un microscopio.

Los protoplastos ($1-3 \times 10^7$ en 250 μ L) son mezclados con 5 a 20 microgramos del constructo de gen y son incubados en solución de PEG para transformación (25-60% polietilenglicol 4000, CaCl_2 10-25 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7,5) durante 45 minutos a 4 °C. Un mL adicional de solución de PEG para transformación es agregado y se continúa la incubación a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se deja que los protoplastos regeneren las paredes celulares en medio líquido y se seleccionan los transformantes en medio sólido. El medio sólido (patata dextrosa agar) contiene 100 μ g/mL de higromicina o 100 μ g/mL de fleomicina, dependiendo del marcador de selección utilizado para la transformación. Las colonias que crecen son transferidas a medio sólido tres veces para aislar micelios establemente transformados. La presencia del marcador de selección así como también del gen ptxD es confirmada mediante PCR. Una vez que los transformantes estables son aislados, se transfiere una porción de 2 mm de micelio a medio PDA carente de fosfato y suplementado con fosfito 1 mM para identificar colonias que expresan el constructo de gen ptxD. Se utiliza análisis de Southern blot para confirmar la presencia de los genes correspondientes.

Para confirmar que el hongo transgénico puede proporcionar fosfato a las plantas, se inocula el suelo con micelios del hongo transformado con ptxD, y se germinan semillas de tabaco en el suelo. El suelo es fertilizado con una concentración normal de nitrógeno y potasio, con fosfito como la fuente de fósforo. Se compara el crecimiento de las plantas de tabaco a partir de la semilla en suelo inoculado con el hongo transgénico ptxD, con el crecimiento en suelo control que no ha sido inoculado.

Ejemplo 7. Realizaciones seleccionadas I

Este ejemplo describe realizaciones seleccionadas de la invención, presentadas como una serie de párrafos indexados.

A. Una planta transgénica capaz de utilizar al menos una forma reducida de fósforo como un fertilizante de fósforo. La planta transgénica descrita aquí puede ser
 5 adicionalmente caracterizada como sigue: (A1) en donde la planta expresa una secuencia codificante bacteriana que codifica una enzima capaz de oxidar fosfito a fosfato, permitiendo así el uso de fosfito como un fertilizante de fósforo (y una fuente de fósforo); (A2) en donde la secuencia codificante bacteriana de A1 es ptxD de *Pseudomonas stutzeri*, *Alcaligenes faecalis*, o *Xanthobacter flavus*; (A3) en donde la planta transgénica de A1 o A2 expresa
 10 secuencias codificantes htxA y ptxD, permitiendo así el uso de hipofosfito y/o fosfito como un fertilizante de fósforo; (A4) en donde cada una o ambas de las secuencias codificantes bacterianas de A3 es de *Pseudomonas stutzeri*, *Alcaligenes faecalis*, o *Xanthobacter flavus*; (A5) en donde al menos una de la(s) secuencia(s) codificante(s) bacteriana(s) de cualquiera
 15 de A1 a A4 está bajo el control de un promotor constitutivo, un promotor específico de hoja, un promotor específico de tejido, un promotor específico de raíz, un promotor inducible en condiciones de baja concentración de fosfato, o el promotor 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor; o (A6) cualquier combinación de A1 a A5.

B. El uso de una planta transgénica capaz de oxidar hipofosfito a fosfato, y/o
 20 fosfito a fosfato, para eliminar hipofosfito y/o fosfito de un efluente industrial o municipal.

C. El uso de una o más secuencias codificantes bacterianas que oxidan hipofosfito a fosfato, y/o fosfito a fosfato, como un marcador de selección para la producción de plantas transgénicas.

D. El uso de moléculas de ADN recombinante compuestas de una o más
 25 secuencias codificantes bacterianas que codifican enzimas que oxidan hipofosfito a fosfato, y/o fosfito a fosfato, y de una secuencia promotora funcional en plantas como un marcador de selección para la producción de plantas transgénicas.

E. Un gen quimérico funcional en una célula vegetal, cuyo gen quimérico comprende: (1) una secuencia promotora capaz de expresarse en plantas; (2) una secuencia
 30 señal de terminación; y (3) una región codificante de un gen bacteriano que oxida fosfito a fosfato, cuya región codificante: codifica una enzima NAD:fosfito oxidorreductasa funcional, y está ubicada entre dicha secuencia promotora que se expresa en plantas y dicha secuencia señal de terminación, donde la expresión de dicha región codificante en una célula vegetal confiere la capacidad de utilizar fosfito como fuente de fósforo sobre dicha célula vegetal y
 35 en donde dicha capacidad para utilizar fosfito como fuente de fósforo es capaz de proporcionar una base para la selección de dicha célula vegetal. El gen quimérico de este

párrafo puede ser adicionalmente caracterizado como sigue: (E1) en donde la región codificante es del gen *ptxD* de *Pseudomonas stutzeri*, *Alcaligenes faecalis*, o *Xanthobacter flavus*; (E2) en donde la secuencia promotora es un promotor constitutivo; (E3) en donde la secuencia promotora es el promotor 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor; (E4) en donde la secuencia señal de terminación es una secuencia señal de terminación de nopalina sintetasa; (E5) en donde la secuencia señal de terminación es una secuencia señal de terminación del Virus del Mosaico de la Coliflor; o (E6) cualquier combinación de E1 a E5.

F. Una planta transgénica que expresa al menos una enzima foránea en un nivel que permite a la planta metabolizar una forma reducida de fósforo como un fertilizante de fósforo.

Ejemplo 8. Realizaciones seleccionadas II

Este ejemplo describe realizaciones seleccionadas de la invención, presentadas como una serie de párrafos indexados.

A. Una planta transgénica que comprende un constructo que confiere (1) una ventaja de crecimiento sobre la planta para el crecimiento utilizando una forma reducida de fósforo como nutriente y/o (2) una capacidad para metabolizar al menos una forma reducida de fósforo. La planta transgénica descrita aquí puede ser adicionalmente descrita como sigue: (A1) en donde el constructo confiere una ventaja de crecimiento sobre la planta si fosfito es una fuente externa de fósforo al menos sustancialmente exclusiva para la planta; (A2) en donde el constructo confiere una ventaja de crecimiento sobre la planta si hipofosfito es una fuente externa de fósforo al menos sustancialmente exclusiva para la planta; (A3) en donde el constructo confiere una ventaja de crecimiento sobre la planta si el fosfito es una fuente externa de fósforo al menos sustancialmente exclusiva para la planta y si hipofosfito es una fuente externa de fósforo al menos sustancialmente exclusiva para la planta; (A4) en donde la planta transgénica es capaz de crecer sin fosfato como una fuente externa de fósforo, y en donde una variedad no transgénica de la planta transgénica que carece del constructo es al menos sustancialmente incapaz de crecer sin fosfato como una fuente externa de fósforo; (A5) en donde la planta transgénica fue transformada inicialmente con el constructo en un progenitor de la planta transgénica; (A6) en donde el constructo codifica la expresión de uno o más polipéptidos que confieren a la planta una capacidad para metabolizar al menos una forma reducida de fósforo a fosfato, y, opcionalmente, en donde al menos uno de los polipéptidos oxida fosfito a fosfato, y, opcionalmente, en donde al menos uno de los polipéptidos es capaz de utilizar nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) y/o nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP⁺) como un aceptor de electrones, y, opcionalmente, en donde uno o más polipéptidos incluye un polipéptido PtxD, el cual, opcionalmente, está

codificado mediante una región codificante que se origina al menos sustancialmente a partir de *Pseudomonas stutzeri*, *Alcaligenes faecalis*, o *Xanthobacter flavus*; (A7) en donde uno o más polipéptidos de A6 incluye un polipéptido HtxA; (A8) en donde la expresión de al menos uno de los polipéptidos de A6 o A7 es inducible; (A9) en donde la expresión de al menos uno de los polipéptidos seleccionados de entre cualquiera de A6 a A8 es inducible mediante bajo fosfato; (A10) en donde la expresión de al menos uno de los polipéptidos seleccionados de entre cualquiera de A6 a A9 está bajo el control de un promotor constitutivo; (A11) en donde la expresión de al menos uno de los polipéptidos seleccionados de entre cualquiera de A6 a A10 está bajo el control de un promotor específico de hoja; (A12) en donde la expresión de al menos uno de los polipéptidos seleccionados de entre cualquiera de A6 a A11 está bajo el control de un promotor específico de raíz; (A13) en donde la expresión de al menos uno de los polipéptidos seleccionados de entre cualquiera de A6 a A12 está bajo el control de un promotor que no es específico de tejido; o (A14) cualquier combinación de A1 a A13.

B. Una planta transgénica que comprende un constructo que codifica un polipéptido bacteriano que confiere a la planta la capacidad para metabolizar fosfito en fosfato.

C. Una semilla que germina para producir, o cualquier parte de planta utilizada para producir o reproducirse vegetativamente, la planta transgénica del párrafo A o B.

D. Un ácido nucleico para la generación de una planta transgénica, que comprende: un gen quimérico capaz de conferir sobre una planta (1) una ventaja de crecimiento para crecer utilizando una forma reducida de fósforo como nutriente y/o (2) una capacidad para metabolizar al menos una forma reducida de fósforo. El ácido nucleico descrito aquí puede ser adicionalmente descrito como sigue: (D1) en donde el gen quimérico incluye un promotor unido operativamente a una región codificante, y en donde el promotor es capaz de controlar la expresión de la región codificante en una planta, y, opcionalmente, en donde la región codificante codifica uno o más polipéptidos que oxidan fosfito a fosfato, y, opcionalmente, en donde la región codificante está provista al menos sustancialmente mediante un gen *ptxD*; (D2) en donde el gen quimérico incluye un promotor unido operativamente a una región codificante, y en donde el promotor se originó al menos sustancialmente en una planta y/o un virus vegetal, y, opcionalmente, en donde el promotor incluye un promotor 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor; (D3) que adicionalmente comprende un terminador de la transcripción que es funcional en una planta y está unido operativamente al promotor y la región codificante de D1 o D2; (D4) en donde la región codificante de cualquiera de D1 a D3 codifica un polipéptido que oxida fosfito a fosfato; (D5) en donde el ácido nucleico está dispuesto en un microorganismo; (D6) en donde el ácido nucleico es aislado a partir de células; (D7) en donde el ácido nucleico está dispuesto en una

planta transgénica; o (D8) cualquier combinación de D1 a D7.

E. Un método para generar una planta transgénica, que comprende: seleccionar por transformación de una planta o parte de planta utilizando, como un marcador de selección, un ácido nucleico que confiere una capacidad para metabolizar una forma reducida de fósforo. El método descrito aquí puede ser adicionalmente descrito como sigue: (E1) en donde la etapa de seleccionar por transformación incluye una etapa de seleccionar por una ventaja de crecimiento de la planta o parte de planta, en relación a otras plantas o partes de plantas, con una o más formas reducidas de fósforo como una fuente externa de fósforo para las plantas o partes de plantas; (E2) en donde la etapa de seleccionar por una ventaja de crecimiento en E1 es llevada a cabo con las plantas o partes de plantas en contacto con un medio que contiene fosfito, hipofosfito, o ambos; (E3) en donde la etapa de seleccionar por una ventaja de crecimiento de E1 o E2 es llevada a cabo con el medio que no contiene fosfato al menos sustancialmente; (E4), que adicionalmente comprende una etapa de poner en contacto la planta o parte de planta, un progenitor de la misma, o ambos, con un agente modificante que incluye un constructo que proporciona el marcador de selección; (E5) en donde el agente modificante de E4 incluye células de *Agrobacterium* que contienen el constructo; (E6) en donde el constructo de E4 o E5 codifica un polipéptido que oxida fosfito a fosfato; (E7) en donde el constructo de cualquiera de E4 a E6 codifica un polipéptido que oxida hipofosfito a fosfato; (E8) en donde la etapa de poner en contacto de cualquiera de E4 a E7 incluye una etapa de disparar proyectiles a la planta o parte de planta, un progenitor de la misma, o ambos; (E9) en donde la etapa de seleccionar por transformación es llevada a cabo con una parte de planta, y en donde la parte de planta es un explante de tejido o una célula vegetal aislada; o (E10) cualquier combinación de E1 a E9.

F. Un método para fertilizar la planta transgénica del párrafo A o B, en donde una forma reducida de fósforo es utilizada como fertilizante foliar o es agregada para corregir la composición del suelo para proporcionar una fuente de fosfato para favorecer el crecimiento y reproducción vegetal.

G. Un método para remediación de agua, que comprende: poner en contacto (i) un efluente que incluye fosfito y (ii) una planta transgénica que comprende un constructo que confiere una capacidad para metabolizar fosfito en fosfato, reduciendo así el nivel de fosfito en el efluente.

Ejemplo 9. Realizaciones seleccionadas III

Este ejemplo describe realizaciones seleccionadas de la invención, presentadas como una serie de párrafos indexados.

A. Un ácido nucleico, que comprende: un gen quimérico que incluye (a) una

región codificante que codifica para una enzima fosfito deshidrogenasa y (b) un promotor de la transcripción unido operativamente a la región codificante, en donde el promotor es heterólogo con respecto a la región codificante y es funcional en plantas, hongos, o ambos, y en donde el gen quimérico proporciona suficiente expresión de la enzima, en una célula

5 vegetal o fúngica que contiene el gen quimérico, para conferir una capacidad sobre la célula para metabolizar fosfito (Phi) como fuente de fósforo para favorecer el crecimiento, permitiendo así el crecimiento de la célula sin una fuente externa de fosfato (Pi). El ácido nucleico de este párrafo puede ser descrito adicionalmente como sigue: (A1) en donde la enzima fosfito deshidrogenasa es de origen bacteriano; (A2) en donde la enzima fosfito

10 deshidrogenasa es PtxD de *Pseudomonas stutzeri* (SEQ ID NO:1), un análogo o derivado de PtxD (SEQ ID NO:1), o un homólogo tipo PtxD de otra especie bacteriana; (A3) en donde la enzima fosfito deshidrogenasa bacteriana tiene una secuencia de aminoácido con al menos 50%, 60%, 80%, 90%, o 95% identidad de secuencia con al menos una de las SEQ ID NOS:1-14; (A4) en donde la enzima fosfito deshidrogenasa tiene una secuencia de

15 aminoácido que incluye una primera región de secuencia que tiene un motivo que se une a NAD con similitud o identidad de secuencia con VGILGMGAIG (SEQ ID NO:15), una segunda región de secuencia que tiene similitud o identidad de secuencia con XPGALLVNPCRGSVVD (SEQ ID NO:16), donde X es K o R, una tercera región de secuencia que tiene similitud o identidad de secuencia con GWX₁PX₂X₃YX₄X₅GL (SEQ ID

20 NO:19), donde X₁ es R, Q, T, o K, X₂ es A, V, Q, R, K, H, o E, X₃ es L o F, X₄ es G, F, o S, y X₅ es T, R, M, L, A, o S, o incluye cualquier combinación de las regiones de secuencia primera, segunda y tercera; (A5) en donde la enzima fosfito deshidrogenasa tiene una secuencia de aminoácido que es al menos 90% idéntica a PtxD de *Pseudomonas stutzeri* (SEQ ID NO:1); (A6) en donde el gen quimérico adicionalmente incluye un terminador de la

25 transcripción que está unido operativamente a la región codificante y es heterólogo con respecto a la región codificante; (A7) en donde el promotor es un promotor vegetal o un promotor viral de un virus vegetal y es capaz de promover la suficiente expresión de la enzima en una célula vegetal; (A8) en donde el promotor de A7 corresponde al promotor 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor; (A9) en donde el promotor de A7 es inducible mediante

30 baja disponibilidad de fosfato; (A10) en donde el promotor de A9 corresponde a un promotor del gen PLDZ2 de *Arabidopsis thaliana*; (A11) en donde el gen quimérico es capaz de promover la suficiente expresión de la enzima tanto en una célula vegetal como en una célula fúngica cada una conteniendo el gen quimérico; (A12) en donde el promotor es un promotor fúngico capaz de promover la suficiente expresión de la enzima en una célula fúngica; (A13)

35 en donde uno o más codones de la región codificante han sido cambiados *in vitro* para mejorar la eficiencia de la traducción en plantas y/u hongos; (A14) que adicionalmente

comprende un intrón conectado a la región codificante y está configurado para ser transcrito con la región codificante y eliminado por splicing una vez realizada la transcripción, en donde el intrón está opcionalmente dispuesto dentro de la región codificante; (A15) en donde la región codificante tiene al menos 90% identidad de secuencia con la SEQ ID NO:21; o
 5 (A16) cualquier combinación de A1 a A15.

B. Una célula vegetal que comprende un ácido nucleico que expresa una enzima fosfito deshidrogenasa en la célula vegetal y es capaz de metabolizar fosfito como fuente de fósforo para favorecer el crecimiento. Opcionalmente, el ácido nucleico es de acuerdo al párrafo A. La célula vegetal descrita aquí puede ser adicionalmente descrita como sigue:

10 (B1) que adicionalmente comprende un otro ácido nucleico que expresa una enzima hipofosfito deshidrogenasa que, opcionalmente puede ser de origen bacteriano, en la célula vegetal; (B2) la célula vegetal de B1 en donde los ácidos nucleicos colectivamente confieren una capacidad sobre la célula para metabolizar hipofosfito (Hphi) como fuente de fósforo como fuente de fósforo para favorecer el crecimiento; (B3) en donde el otro ácido
 15 nucleico de B1 o B2 codifica un polipéptido con al menos 95% de identidad de secuencia con HtxA de *Pseudomonas stutzeri* (SEQ ID NO:20); (B4) la célula vegetal de cualquiera de B1 a B3, en donde los ácidos nucleicos están integrados adyacentes uno del otro en el genoma de la célula vegetal; (B5) en donde la expresión de la enzima fosfito deshidrogenasa, la enzima hipofosfito deshidrogenasa, o ambas están controladas por un promotor específico de raíz;
 20 (B6) en donde la célula vegetal es homocigota para el ácido nucleico; (B7) en donde la célula vegetal es una célula eucariótica de alga; (B8) en donde la célula de alga de B7 es una célula de *Chlamydomonas*; (B9) en donde la célula vegetal es de una especie de planta vascular; o (B10) cualquier combinación de B1 a B9.

C. Una planta compuesta de una pluralidad de células vegetales de acuerdo con el párrafo B. La planta de este párrafo puede ser descrita adicionalmente como sigue: (C1) en
 25 donde la planta es una planta vascular, tal como una especie de planta de cultivo, (C2) en donde la especie de planta de cultivo de C1 es seleccionada a partir del grupo que consiste de maíz, soja, arroz, patata, tomate, caña de azúcar y trigo.

D. Una célula fúngica que comprende un ácido nucleico que expresa una enzima
 30 fosfito deshidrogenasa en la célula fúngica y es capaz de metabolizar fosfito como fuente de fósforo para favorecer el crecimiento. Opcionalmente, el ácido nucleico es de acuerdo con el párrafo A. La célula fúngica de este párrafo puede ser adicionalmente descrita como sigue: (D1) que adicionalmente comprende un ácido nucleico que expresa una enzima hipofosfito deshidrogenasa bacteriana en la célula fúngica; (D2) la célula fúngica de D1, en donde los
 35 ácidos nucleicos colectivamente confieren una capacidad sobre la célula para metabolizar hipofosfito (Hphi) como fuente de fósforo para favorecer el crecimiento de la célula fúngica;

(D3) en donde la célula fúngica es de una especie de *Trichoderma*; (D4) en donde la célula fúngica es un miembro de una especie de hongo micorrizal capaz de formar una relación simbiótica con una planta; o (D5) cualquier combinación de D1 a D4.

E. Un método para reducir infecciones fúngicas en plantas, que comprende:
5 aplicar una pluralidad de las células fúngicas del párrafo D a una forma de semilla de plantas, las plantas en sí mismas, suelo en el cual las plantas están dispuestas, o una combinación de las mismas. En algunos casos, las células fúngicas pueden ser esporas.

F. Una planta asociada con una pluralidad de células fúngicas de acuerdo con el párrafo D para formar micorrizas. Opcionalmente, las células fúngicas hacen que la planta
10 sea capaz de crecer sobre un medio que contiene fosfito (Phi), hipofosfito (Hphi), o ambos, como fuente de fósforo para favorecer el crecimiento.

G. Un método para fertilizar una planta de cultivo que utiliza hipofosfito y/o fosfito como fuente de fósforo para favorecer el crecimiento, la planta de cultivo (a) que incluye una pluralidad de células que comprenden el ácido nucleico del párrafo A, (b) que
15 forma micorrizas con un hongo micorrizal que comprende el ácido nucleico del párrafo A, y/o (c) que está asociada con un hongo *Trichoderma* que comprende el nucleico de la reivindicación 1, comprendiendo el método: aplicar al menos una forma reducida de fósforo a la planta y/o al suelo adyacente a la planta, de modo que la forma reducida sea metabolizada a fosfato por parte de la planta y/o el hongo, para favorecer el crecimiento y productividad de la
20 planta.

H. Un método para fertilizar la planta del párrafo C, comprendiendo el método: aplicar al menos una forma reducida de fósforo a la planta y/o al suelo adyacente a la planta, de modo que la forma reducida sea metabolizada a fosfato por parte de la planta para favorecer el crecimiento y productividad de la planta. Opcionalmente, la forma reducida
25 pueda ser aplicada como fertilizante foliar o agregada para corregir el suelo para proporcionar una fuente de fosfato para sostener el crecimiento y productividad.

I. Un método para tratar agua para disminuir su contenido de fósforo reducido, comprendiendo el método: poner en contacto agua que contiene hipofosfito y/o fosfito con una pluralidad de las células vegetales y/o células fúngicas que comprende el ácido nucleico
30 del párrafo A, de modo que al menos una porción del hipofosfito y/o fosfito es oxidada a fosfito y/o fosfato. Opcionalmente, la etapa de poner en contacto incluye una etapa de poner en contacto el agua con una pluralidad de plantas vasculares compuestas de células vegetales que comprenden el ácido nucleico del párrafo A.

J. Un método para tratar desechos (residuos) líquidos para disminuir su
35 contenido de fósforo reducido, comprendiendo el método: poner en contacto (i) agua que contiene hipofosfito y/o fosfito como un contaminante y (ii) una pluralidad de las células

vegetales y/o células fúngicas que comprenden el nucleico del párrafo A, de modo que al menos una porción del hipofosfito y/o fosfito es oxidado a fosfito y/o fosfato.

K. Un método para utilizar el ácido nucleico del párrafo A para la producción de una planta transgénica, que comprende: seleccionar por crecimiento de células vegetales que comprenden el ácido nucleico del párrafo A como marcador de selección durante la producción de una planta transgénica.

L. Un método para obtener una planta transformada con un ácido nucleico que codifica una enzima fosfito deshidrogenasa que se expresa a partir del ácido nucleico como marcador de selección, que comprende: poner en contacto células vegetales y una composición que incluye el ácido nucleico bajo condiciones que promueven la introducción del ácido nucleico dentro de al menos un subconjunto de las células vegetales; cultivar las células vegetales en un medio que contiene fosfito como fuente de fósforo primaria o exclusiva para el crecimiento; seleccionar células vegetales transformadas producidas mediante las etapas de poner en contacto y cultivar, y expresar la enzima fosfito deshidrogenasa evidenciada por el crecimiento en el medio; y regenerar al menos una porción de las células vegetales transformadas dentro de una planta transgénica. El método descrito aquí puede ser descrito adicionalmente como sigue: (L1) en donde la composición incluye células de *Agrobacterium* que suministran el ácido nucleico durante la etapa de poner en contacto; o (L2) en donde la composición incluye proyectiles que son disparados a las células vegetales en la etapa de poner en contacto.

M. Una planta, que comprende: un ácido nucleico que incluye un gen quimérico que expresa una enzima fosfito deshidrogenasa de modo que la planta es capaz de metabolizar fosfito (Phi) como fuente de fósforo para favorecer el crecimiento, permitiendo así el crecimiento de la planta sin una fuente externa de fosfato (Pi). La planta descrita aquí puede ser adicionalmente descrita como sigue: (M1) en donde el ácido nucleico está establemente integrado dentro del genoma de la planta; (M2) en donde la planta es una planta vascular; (M3) en donde la planta es una especie de alga; (M4) en donde la enzima fosfito deshidrogenasa tiene cualquiera de las características del párrafo A; o (M5) cualquier combinación de M1 a M4.

N. Un hongo, que comprende: un ácido nucleico que incluye un gen quimérico que expresa una enzima fosfito deshidrogenasa de modo que el hongo es capaz de metabolizar fosfito (Phi) como fuente de fósforo para favorecer el crecimiento, permitiendo así el crecimiento del hongo sin una fuente externa de fosfato (Pi). El hongo de este párrafo puede ser adicionalmente descrito como sigue: (N1) en donde el ácido nucleico está establemente integrado dentro del genoma del hongo; (N2) en donde el hongo es una especie de *Trichoderma*; (N3) en donde el hongo es una especie micorrizal capaz de formar una

relación simbiótica con una planta; (N4) que adicionalmente comprende una planta asociada con el hongo para formar micorrizas; (N5) en donde la enzima fosfito deshidrogenasa tiene cualquiera de las características del párrafo A; o (N6) cualquier combinación de N1 a N5.

La descripción establecida anteriormente puede abarcar múltiples invenciones
5 distintas con utilidad independiente. A pesar de que cada una de estas invenciones ha sido descrita en su/s forma/s preferida/s, las realizaciones específicas de las mismas tal como se describen e ilustran en la presente invención, no están consideradas en un sentido limitante, dado que numerosas variaciones son posibles. El objeto de las invenciones incluye todas las combinaciones y sub-combinaciones novedosas y no obvias de los diversos elementos,
10 características, funciones y/o propiedades descritas en la presente invención. Las siguientes reivindicaciones particularmente destacan ciertas combinaciones y sub-combinaciones consideradas como novedosas y no obvias. Las invenciones abarcadas en otras combinaciones y sub-combinaciones de características, funciones, elementos y/o propiedades pueden ser reivindicadas en solicitudes que invocan prioridad sobre esta o de solicitudes
15 relacionadas. Dichas reivindicaciones, ya sea dirigidas a una invención diferente o a la misma invención, y ya sea más amplia, más estrecha, igual o diferente en alcance a las reivindicaciones originales, también están consideradas como incluidas dentro del objeto de las invenciones de la presente descripción.

Bibliografía

Este apartado presenta un conjunto de referencias pertinentes a aspectos de la presente descripción. Cada una de las referencias está incorporada en el presente documento como
5 referencia para todo propósito.

Aspectos Generales

Baek, J. M. & Kenerley, C. M. (1998). The *arg2* gene of *Trichoderma virens*: cloning and development of a homologous transformation system. Fungal Genet. Biol. 23:34-44.

10

Cavalcante, R.S., Lima, H.L.S., Pinto, G.A.S., Gava, C.A.T., y Rodrigues, S. (2008). Effect of Moisture on *Trichoderma* Conidia Production on Corn and Wheat Bran by Solid State Fermentation. Food Bioprocess. Technol. 1:100-104.

15

Goldman, G.H., Van Montagu, M., y Herrera-Estrella, A. (1990). Transformation of *Trichoderma harzianum* by high-voltage electric pulse. Curr. Genet. 17:169-174.

Herrera-Estrella, A., Goldman, G.H., y Van Montagu, M. (1990). High efficiency transformation system for the biocontrol agents, *Trichoderma* spp. Mol. Microbiol. 4:839-
20 843.

Howell, C.R. (2003) Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases. Plant Dis. 87:4-10.

25

Lorito, M., Hayes, C.K., Di Pietro, A., y Harman, G.E. (1993). Biolistic transformation of *Trichoderma harzianum* and *Gliocladium virens* using plasmid and genomic DNA. Curr. Genet. 24:349-356.

30

Yedidia, I., Benhamou, N., y Chet, I. (1999). Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. Appl. Environ. Microbiol. 65:1061-1070.

Barrett, V., Dixon, R.K., y Lemke, P.A. (1990) Genetic transformation of a mycorrhizal fungus. Appl. Microbiol. Biotechnol. 33:313-316.

35

Bills, S.N., Richter, D.L., y Podila G.K. (1995) Genetic transformation of the

ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* by particle bombardment. *Mycological Research* 99:557-561.

5 Bills, S.N., Podila, G.K., y Hiremath, S.T. (1999) Genetic engineering of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* for use as a biological control agent. *Mycologia* 91: 237-242.

Forbes, P.J., Millam, S., Hooker, J.E., y Harrier L.A. (1998) Transformation of the arbuscular mycorrhiza *Gigaspora rosea* by particle bombardment. *Mycol. Res.*, 102:497-501.

10 Hanif, M., Pardo, A.G., Gorfer, M., y Raudaskoski, M. (2002) T-DNA transfer and integration in the ectomycorrhizal fungus *Suillus bovinus* using hygromycin B as a selectable marker. *Curr. Genet.* 41:183-188.

15 Kemppainen, M., Circosta, A., Tagu, D., Martin, F., y Pardo, A.G. (2005) *Agrobacterium*-mediated transformation of the ectomycorrhizal symbiont *Laccaria laccata* S238N. *Mycorrhiza*. 16:19-22.

Khan, A.G. (2006) Mycorrhizoremediation—an enhanced form of phytoremediation. *Journal of Zhejiang University Science B.* 7:503-514.

20 Marmeisse, R., Gay, G., Debaud, J-C., y Casselton, A. (1992) Genetic transformation of the symbiotic basidiomycete fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *Curr. Genet.*, 22:41-45.

Ohtake, H., 1995. Applications of biotechnology to pollution prevention. *Bioremediation: the Tokyo '94 Workshop*, OECD, Paris, pp. 409-417.

Pardo, A., Hanif, M., Raudaskoski, M., y Gorfer, M. (2002) Genetic transformation of ectomycorrhizal fungi mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Mycol. Res.* 106: 132-137.

30 Pardo, A.G., Kemppainen, M., Valdemoros, D., Duplessis, S., Martin, F., y Tagu, D. (2005) T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus microcarpus*. *Revista Argentina de Microbiologia.* 37:69-72.

35 Peng, M, Lemke, P.A., y Shaw J.J. (1993) Improved conditions for protoplast formation and transformation of *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Micobiol. Biotechnol.* 40:101-106.

Smith S.E., y Read D.J. (1997) Mycorrhizal Symbiosis. Academia Press, San Diego, CA. USA.

Fosfito en plantas

5 Ticconi, C.A., Delatorre, C.A., y Abel, S. (2001) Attenuation of phosphate starvation responses by phosphite in *Arabidopsis*. Plant Physiol. 127:963-972.

Varadarajan, D.K., Karthikeyan, A.S., Matilda, P.D., y Raghothama, K.G. (2002) Phosphite, an analogue of phosphate, suppresses the coordinated expression of genes under phosphate
10 starvation. Plant Physiol. 129:1232-1240.

Ouimette, D.G., y Coffey, M.D. (1989) Phosphonate levels in Avocado (*Persea americana*) seedlings and soil following treatment with Fosetyl-Al or potassium phosphonate. Plant Dis.
73:212-215.

15 Ouimette, D.G., y Coffey, M.D. (1990) Symplastic entry and phloem translocation of phosphonate. Pestic. Biochem. Physiol. 38:18-25.

Niere, J.O., DeAngelis, G., y Grant, B.R. (1994) The effect of phosphonate on the acid-soluble phosphorus components in the genus *Phytophthora*. Can. J. Microbiol. 140:1661-
20 1670.

Guest, D., y Grant, B.R. (1991) The complex action of phosphonates as antifungal agents. Biol. Rev. 66:159-187.

25 Förster H., Adaskaveg, J.E., Kim, D.H., y Stanghellini, M.E. (1998) Effect of Phosphite on Tomato and Pepper Plants and on Susceptibility of Pepper to *Phytophthora* Root and Crown Rot in Hydroponic Culture. Plant Dis. 82:1165-1170.

30 Carswell, C., Grant, B.R., Theodorou, M.E., Harris, J., Niere, J.O., Plaxton, W.C. (1996) The Fungicide Phosphonate Disrupts the Phosphate-Starvation Response in *Brassica nigra* Seedlings. Plant Physiol. 110:105-110.

Sukarno N., Smith, S.E., y Scott, E.S. (1993) The effect of fungicides on vesiculararbuscular mycorrhizal symbiosis: I. The effects on vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and plant
35 growth. New Phytol. 25:139-147.

Ohtake, H. (1995). Applications of biotechnology to pollution prevention. Bioremediation: the Tokyo '94 Workshop, OECD, Paris, pp. 409-417.

5 Ohtake H., Wu, H., Imazu, K., Anbe, Y., Kato, J., y Kuroda, A. (1996) Bacterial phosphonate degradation, phosphite oxidation and polyphosphate accumulation. Resources, Conservation and Recycling 18: 125-134.

10 Albrigo, L.G. (1999) Effects of foliar applications of urea or nutriphite on flowering and yields of Valencia orange trees. Proc. Fla. State Hort. Soc. 112:1-4.

Fenn, M.E., y Coffey, M.D. (1984) Studies on the In Vitro and In Vivo Antifungal Activity of Fosetyl-Al and Phosphorous Acid. Phytopathology. Vol. 74, No. 5.

15 Schroetter, S., Angeles-Wedler, D., Kreuzig, R., y Schnug, E. (2006) Effects of phosphite on phosphorus supply and growth of corn (*Zea mays*). Landbauforschung Völkenrode 3/4 2006 (56):87-99.

20 Rebollar-Alviter, A.L., Madden, L.V., y Ellis, M.A. (2005) Efficacy of Azoxystrobin, Pyraclostrobin, Potassium Phosphite, and Mafenoxam for Control of Strawberry Leather Rot Caused by *Phytophthora cactorum*. Plant Health Progress.

Wilcoxy, W. (2005) ProPhyt, Alliete, and Phosphorous Acid. The Lake Erie Regional Grape Program.

25 McDonald, A.E., Grant, B.R., y Plaxton, W.C. Phosphite (Phosphorous Acid): Its Relevance in the Environment and Agriculture and Influence on Plant Phosphate Starvation. J. Plant Nutr. 24:1505-1519.

30 Niere, J.O., DeAngelis, G., y Grant, B.R. (1994) The effect of phosphonate on the acid-soluble phosphorus components in the genus *Phytophthora*. Microbiol. 140:1661-1670.

Guest, D., y Grant, B.R. (1991) The complex action of phosphonates as antifungal agents. Biol. Rev. 66:159-187.

35

Identificación, clonado, y caracterización de RP-oxidorreductasas

White, A.K., y Metcalf, W.W. (2007) Microbial Metabolism of Reduced Phosphorus Compounds. Annu. Rev. Microbiol. 61:379-400.

- 5 White, A.K., y Metcalf, W.W. (2002) Isolation and Biochemical Characterization of Hypophosphite/2-Oxoglutarate Dioxygenase. A Novel Phosphorus-Oxidizing Enzyme from *Pseudomonas stutzeri* WM88. J. Biol. Chem. 277:38262-38271.

- 10 Metcalf, W.W., y Wolfe, R.S. (1998) Molecular Genetic Analysis of Phosphite and Hypophosphite Oxidation by *Pseudomonas stutzeri* WM88. J. Bacteriol. 180:5547-5558.

Garcia-Costas, A.M., White, A.K., y Metcalf, W.W. (2001) Purification and Characterization of a Novel Phosphorus-oxidizing Enzyme from *Pseudomonas stutzeri* WM88. J. Biol. Chem. 276: 17429-17436.

15

Schink, B., Thiemann, V., Laue, H., y Friedrich, M.W. (2002) *Desulfotignum phosphitoxidans* sp. nov., a new marine sulfate reducer that oxidizes phosphite to phosphate. Arch. Microbiol. (2002) 177:381-391.

- 20 Transformación de Plantas

Martinez-Trujillo, M. et al. (2004) Improving Transformation Efficiency of *Arabidopsis thaliana* by Modifying the Floral Dip Method. Plant Mol. Biol. Reporter. 22: 63-70.

REIVINDICACIONES

1. Un ácido nucleico que comprende:

un gen quimérico que incluye (a) una región codificante que codifica para una enzima
5 fosfito deshidrogenasa y (b) un promotor de transcripción unido operativamente a la región
codificante,

donde el promotor es heterólogo con respecto a la región codificante y es funcional
en plantas, hongos, o ambos, y

en donde el gen quimérico proporciona suficiente expresión de la enzima, en una
10 célula vegetal o fúngica que contiene el gen quimérico, para conferir una capacidad a la
célula para metabolizar fosfito (Phi) como fuente de fósforo para favorecer el crecimiento,
permitiendo así el crecimiento de la célula sin una fuente externa de fosfato (Pi).

2. El ácido nucleico según la reivindicación 1, donde la enzima fosfito
15 deshidrogenasa es de origen bacteriano.

3. El ácido nucleico según la reivindicación 2, donde la enzima fosfito
deshidrogenasa es PtxD de *Pseudomonas stutzeri* (SEQ ID NO:1), un análogo o derivado de
la PtxD de SEQ ID NO:1, o un homólogo similar a PtxD de otra especie bacteriana.

20

4. El ácido nucleico según la reivindicación 2, donde la enzima fosfito
deshidrogenasa bacteriana tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 80% de
identidad de secuencia con al menos una de las SEQ ID NOs:1-14.

5. El ácido nucleico según la reivindicación 1, donde la enzima fosfito
deshidrogenasa tiene una secuencia de aminoácidos que incluye una primera región que tiene
un motivo de unión a NAD con similitud o identidad de secuencia con VGILGMGAIG (SEQ
ID NO:15), una segunda región que tiene similitud o identidad de secuencia con
XPGALLVNPCRGSVVD (SEQ ID NO:16), donde X es K o R, y una tercera región que
30 tiene similitud o identidad de secuencia con GWX₁PX₂X₃YX₄X₅GL (SEQ ID NO:19), donde
X₁ es R, Q, T, o K, X₂ es A, V, Q, R, K, H, o E, X₃ es L o F, X₄ es G, F, o S, y X₅ es T, R, M,
L, A, o S.

6. El ácido nucleico según la reivindicación 1, donde la enzima fosfito
35 deshidrogenasa tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a PtxD de
Pseudomonas stutzeri (SEQ ID NO:1).

7. El ácido nucleico según la reivindicación 1, donde el gen quimérico incluye además un terminador de la transcripción que está unido operativamente a la región codificante y es heterólogo con respecto a dicha región codificante.

5 8. El ácido nucleico según la reivindicación 1, donde el promotor es un promotor vegetal o un promotor viral de un virus vegetal y es capaz de inducir la suficiente expresión de la enzima en una célula vegetal.

9. El ácido nucleico según la reivindicación 8, donde el promotor es el
10 promotor 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor.

10. El ácido nucleico según la reivindicación 8, donde el promotor es inducible mediante baja disponibilidad de fosfato.

11. El ácido nucleico según la reivindicación 8, donde el promotor es un
15 promotor del gen PLDZ2 de *Arabidopsis thaliana*.

12. El ácido nucleico según la reivindicación 1, donde el gen quimérico es capaz de inducir la suficiente expresión de la enzima tanto en una célula vegetal como en una célula
20 fúngica que contengan el gen quimérico.

13. El ácido nucleico según la reivindicación 1, donde el promotor es un promotor fúngico capaz de inducir la suficiente expresión de la enzima en una célula fúngica.

14. Una célula vegetal que comprende el ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 y que es capaz de metabolizar fosfito como fuente de fósforo para favorecer el crecimiento.

15. La célula vegetal según la reivindicación 14, que adicionalmente comprende
30 un ácido nucleico que expresa una enzima hipofosfito deshidrogenasa bacteriana en la célula vegetal.

16. La célula vegetal según la reivindicación 15, donde los ácidos nucleicos colectivamente confieren una capacidad a la célula para metabolizar hipofosfito (Hphi) como
35 fuente de fósforo para favorecer el crecimiento.

17. La célula vegetal según la reivindicación 16, donde la expresión de la enzima fosfito deshidrogenasa, la enzima hipofosfito deshidrogenasa bacteriana, o ambas están controladas mediante un promotor específico de raíz.

5 18. La célula vegetal según la reivindicación 14, donde la célula vegetal es una célula de alga eucariótica.

19. La célula vegetal según la reivindicación 18, donde la célula de alga es una célula *Chlamydomonas*.

10

20. La célula vegetal según la reivindicación 14, donde la célula vegetal es de una especie de planta vascular.

15

21. Una planta compuesta de una pluralidad de células vegetales según la reivindicación 14.

22. Una planta compuesta de una pluralidad de células vegetales según la reivindicación 20.

20

23. La planta de la reivindicación 22, donde la planta es de una especie de planta de cultivo.

25

24. La planta de la reivindicación 23, donde la especie de la planta de cultivo se selecciona a partir del grupo que consiste en: maíz, soja, arroz, patata, tomate, caña de azúcar, y trigo.

30

25. Una célula fúngica que comprende el ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, 12, y 13 y que es capaz de metabolizar fosfito como fuente de fósforo para favorecer el crecimiento.

26. La célula fúngica según la reivindicación 25, que adicionalmente comprende un ácido nucleico que expresa una enzima hipofosfito deshidrogenasa bacteriana en la célula fúngica.

27. La célula fúngica según la reivindicación 26, donde los ácidos nucleicos colectivamente confieren una capacidad a la célula para metabolizar hipofosfito (Hphi) como fuente de fósforo para favorecer el crecimiento.

5 28. La célula fúngica según la reivindicación 25, en donde la célula fúngica es de una especie de *Trichoderma*.

29. Un método para reducir infecciones fúngicas en plantas, que comprende:
aplicar una pluralidad de las células fúngicas de la reivindicación 25 a una forma de
10 semilla de plantas, a las plantas en sí mismas, al suelo en el cual las plantas están o estarán dispuestas, o a una combinación de las mismas.

30. La célula fúngica según la reivindicación 25, donde dicha célula fúngica es un miembro de una especie de hongo micorrizal capaz de formar una relación simbiótica con
15 una planta.

31. Una planta asociada con una pluralidad de células fúngicas según la reivindicación 30 para formar micorrizas.

20 32. La planta según la reivindicación 31, donde las células fúngicas hacen a la planta capaz de crecer sobre un medio que contiene fosfito (Phi) como fuente de fósforo para favorecer el crecimiento.

33. Un método para fertilizar una planta de cultivo utilizando hipofosfito y/o
25 fosfito como fuente de fósforo para favorecer el crecimiento, incluyendo la planta de cultivo (a) una pluralidad de células que comprenden el ácido nucleico de la reivindicación 1, (b) formando micorrizas con un hongo micorrizal que comprende el nucleico de la reivindicación 1, y/o (c) estando asociada con un hongo *Trichoderma* que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 1, donde el método comprende:

30 aplicar al menos una forma reducida de fósforo a la planta y/o al suelo adyacente a la planta, de modo que la forma reducida sea metabolizada a fosfato por la planta y/o que el hongo favorezca el crecimiento y productividad de la planta.

34. Un método para fertilizar la planta según la reivindicación 22, que
35 comprende:

aplicar al menos una forma reducida de fósforo a la planta y/o al suelo adyacente a la planta, de modo que la forma reducida sea metabolizada a fosfato por la planta para favorecer el crecimiento y productividad de la planta.

5 35. Un método para tratar residuos líquidos para disminuir su contenido en fósforo reducido, que comprende:

poner en contacto (i) agua que contiene hipofosfito y/o fosfito como contaminante y (ii) una pluralidad de las células vegetales y/o células fúngicas que comprenden el nucleico de la reivindicación 1, de modo que al menos una porción del hipofosfito y/o fosfito sea
10 oxidado a fosfito y/o fosfato.

36. El método según la reivindicación 35, donde la etapa de poner en contacto incluye una paso de poner en contacto el agua y una pluralidad de plantas vasculares compuestas de células vegetales que comprenden el ácido nucleico de la reivindicación 1.

15

37. Un método para aislar células transformadas que contienen el ácido nucleico de la reivindicación 1, que comprende:

poner en contacto células seleccionadas a partir de células vegetales y células fúngicas con una composición que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 1; y

20 hacer proliferar selectivamente una o más de las células que han sido transformadas mediante el ácido nucleico cultivando las células en un medio que contiene fosfito y que carece de suficiente fosfato para favorecer el crecimiento.

38. Un método para utilizar el ácido nucleico de la reivindicación 1 para la producción de una planta transgénica, que comprende:

25 seleccionar por crecimiento células vegetales que comprenden el ácido nucleico de la reivindicación 1 como un marcador de selección durante la producción de una planta transgénica.

39. Un método para obtener una planta transformada con un ácido nucleico que codifica para una enzima fosfito deshidrogenasa que se expresa a partir del ácido nucleico como un marcador de selección, que comprende:

30 poner en contacto células vegetales y una composición que incluye el ácido nucleico bajo condiciones que promueven la introducción del ácido nucleico en al menos un subconjunto de las células vegetales;

35

cultivar las células vegetales en un medio que contiene fosfito como una fuente primaria o exclusiva de fósforo para crecimiento;

seleccionar células vegetales transformadas producidas mediante las etapas de poner en contacto y cultivar, y expresar la enzima fosfito deshidrogenasa como evidenciada por crecimiento en el medio; y

regenerar al menos una porción de las células vegetales transformadas, en una planta transgénica.

40. El método según la reivindicación 39, donde la composición incluye células de *Agrobacterium* que suministran el ácido nucleico durante la etapa de poner en contacto.

41. El método según la reivindicación 39, donde la composición incluye proyectiles que son disparados a las células vegetales en la etapa de poner en contacto.

42. Una planta, que comprende:

un ácido nucleico que incluye un gen quimérico que expresa una enzima fosfito deshidrogenasa de modo que la planta es capaz de metabolizar fosfito (Phi) como fuente de fósforo para favorecer el crecimiento, permitiendo así el crecimiento de la planta sin una fuente externa de fosfato (Pi).

43. La planta según la reivindicación 42, donde el ácido nucleico está establemente integrado dentro del genoma de la planta.

44. La planta de la reivindicación 42, según donde la planta es una planta vascular.

45. La planta de la reivindicación 42, según donde la planta es una especie de alga.

46. Un hongo, que comprende:

un ácido nucleico que incluye un gen quimérico que expresa una enzima fosfito deshidrogenasa de modo que el hongo es capaz de metabolizar fosfito (Phi) como fuente de fósforo para favorecer el crecimiento, permitiendo así el crecimiento del hongo sin una fuente externa de fosfato (Pi).

47. El hongo según la reivindicación 46, donde el ácido nucleico está establemente integrado dentro del genoma del hongo.

5 48. El hongo según la reivindicación 46, donde el hongo es una especie de *Trichoderma*.

49. El hongo según la reivindicación 46, donde el hongo es de la especie micorrizal capaz de formar una relación simbiótica con una planta.

10 50. El hongo según la reivindicación 46, que adicionalmente comprende una planta asociada con el hongo para formar micorrizas.

Fig. 1

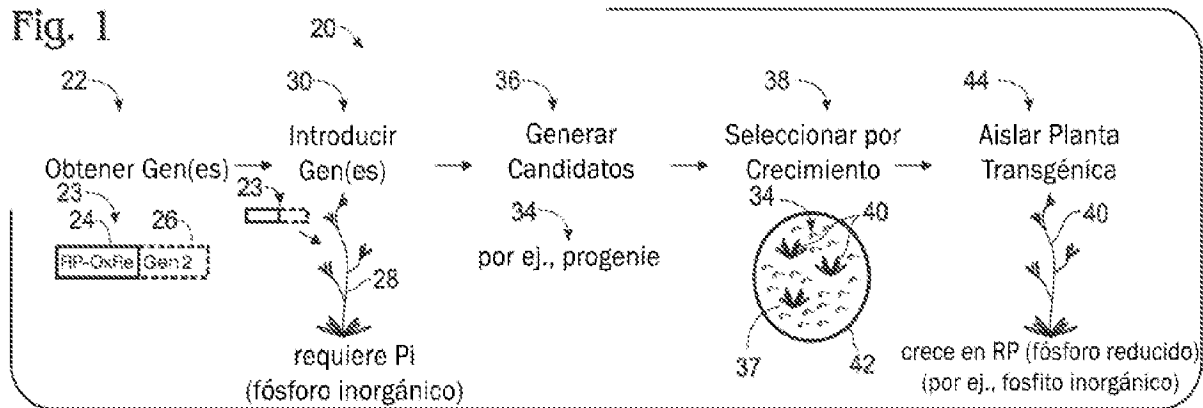


Fig. 2

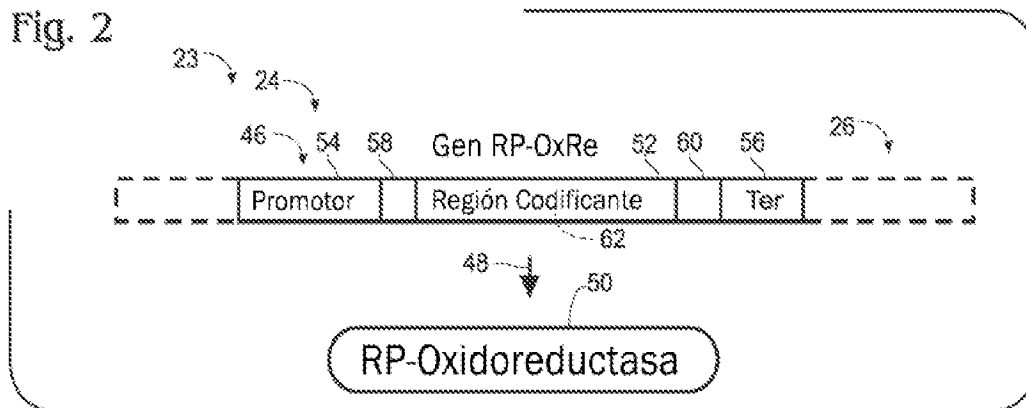


Fig. 3

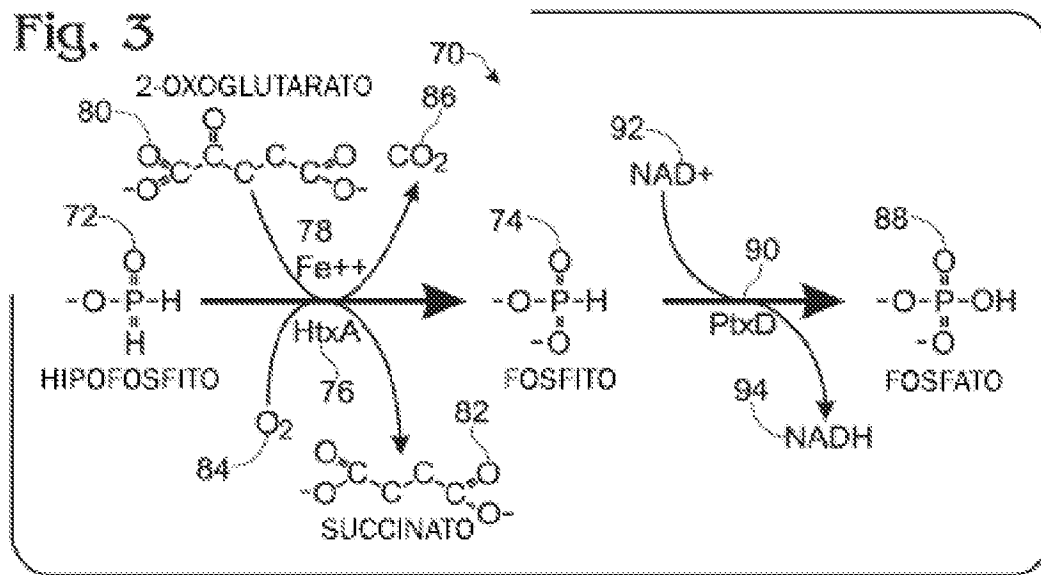


Fig. 4



Fig. 5

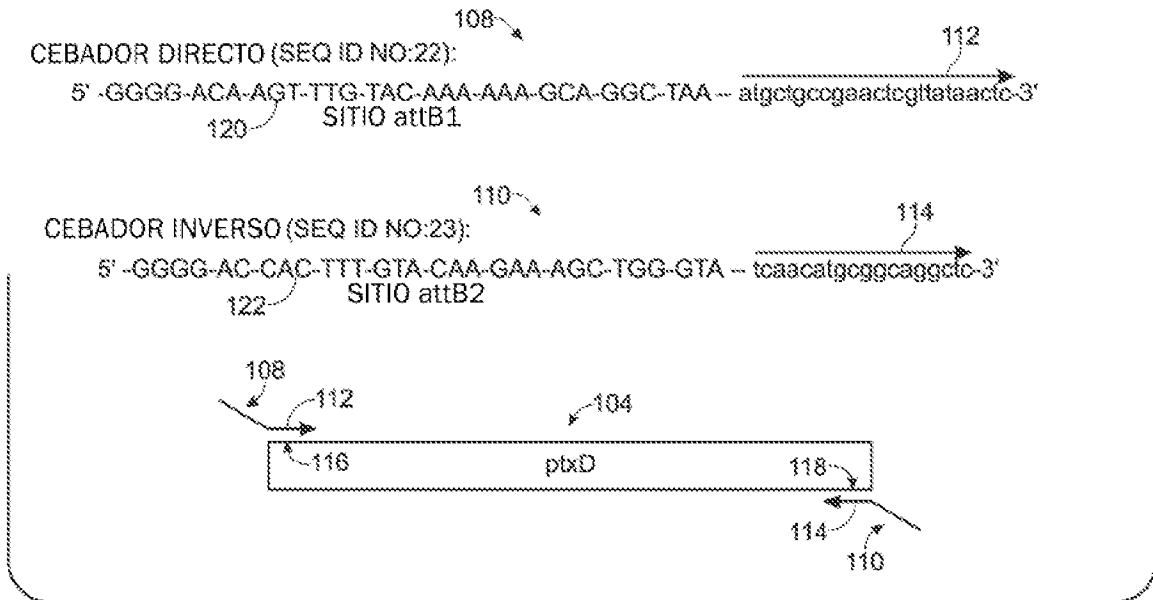


Fig. 6

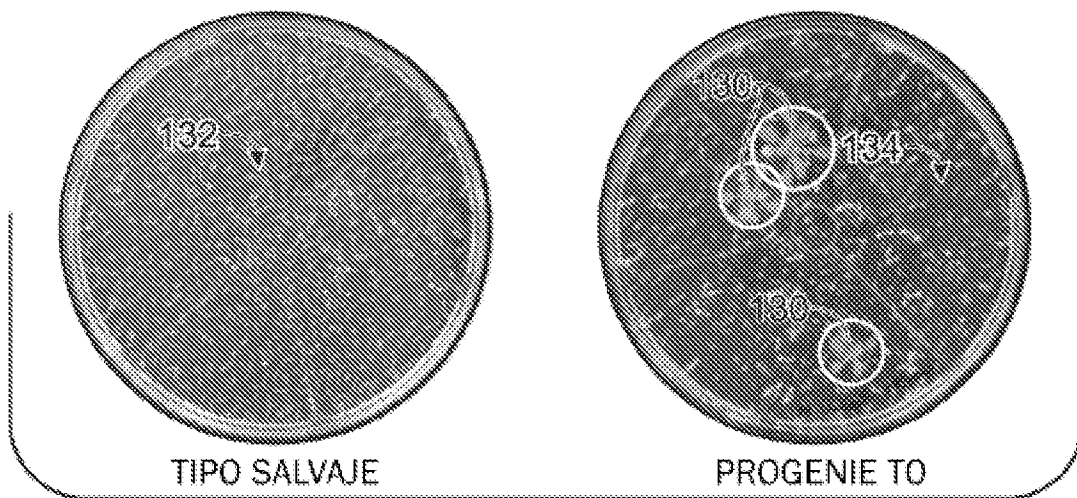


Fig. 7

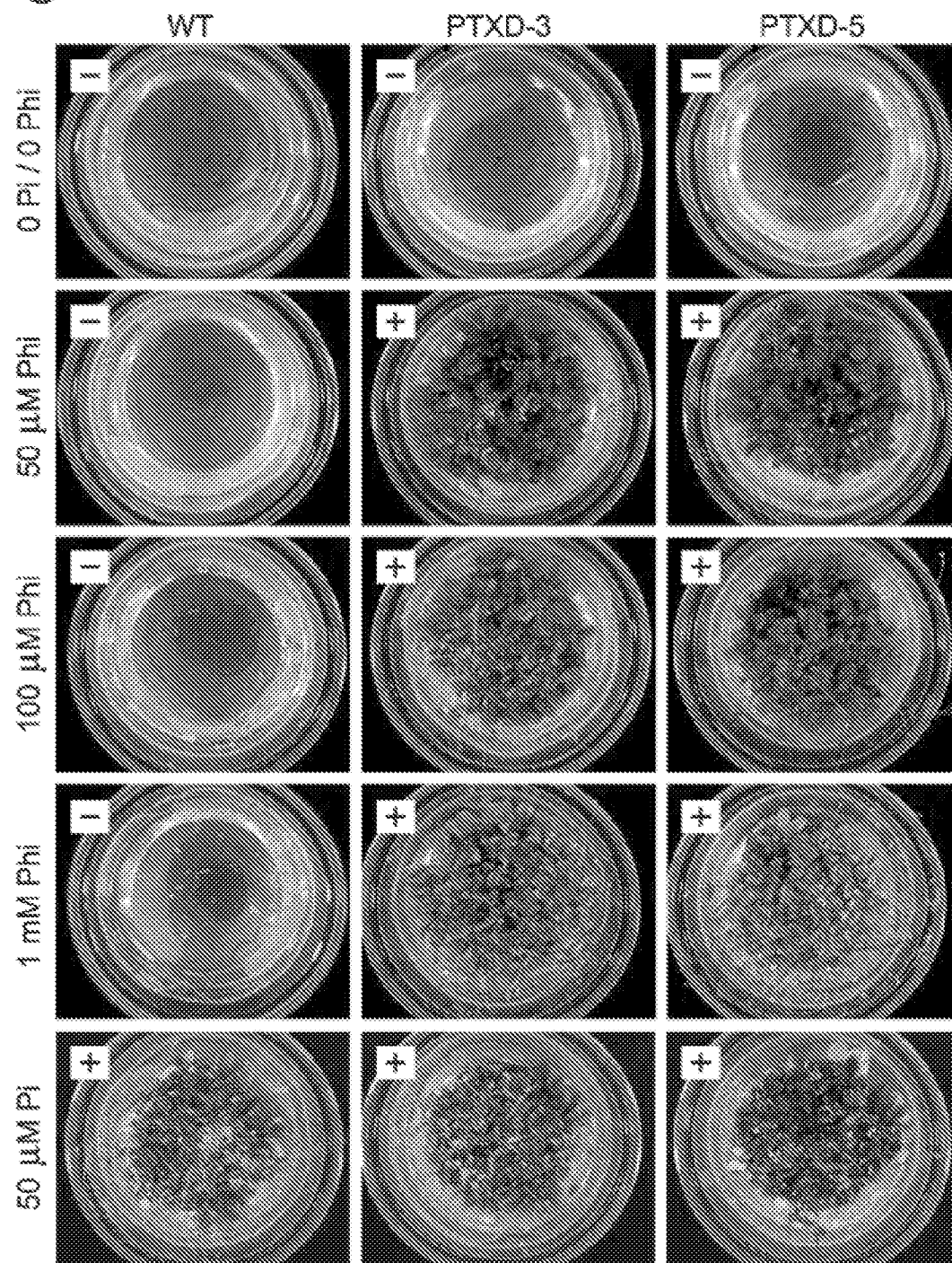


Fig. 8

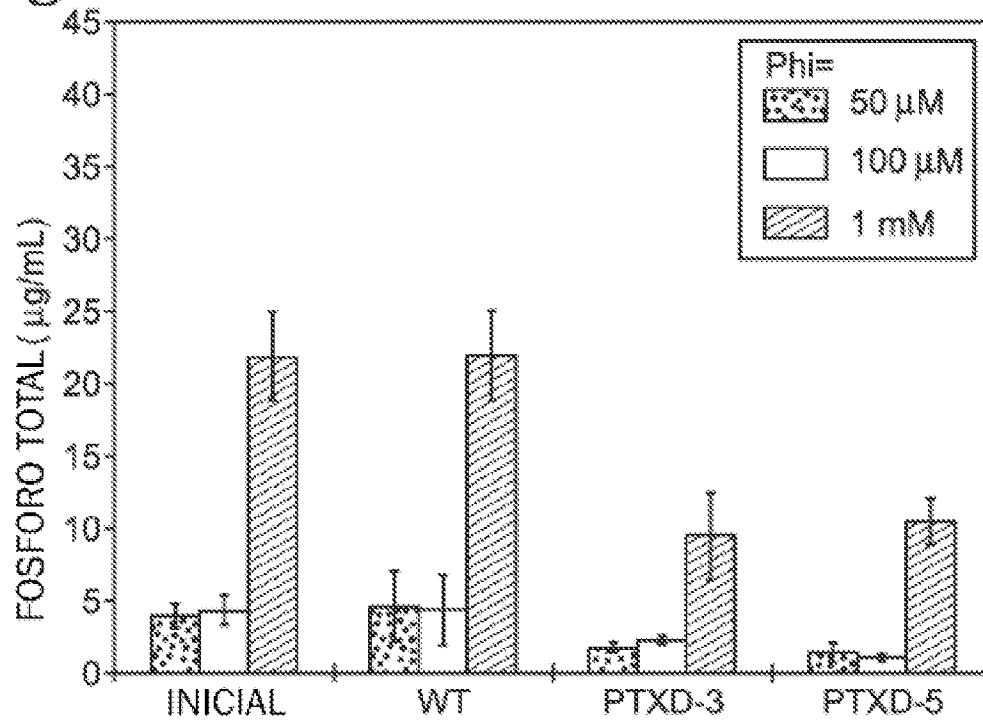


Fig. 9

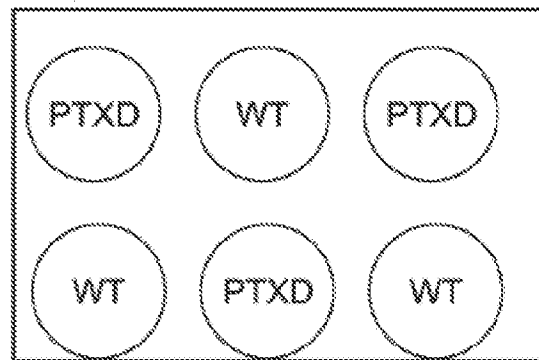


Fig. 10

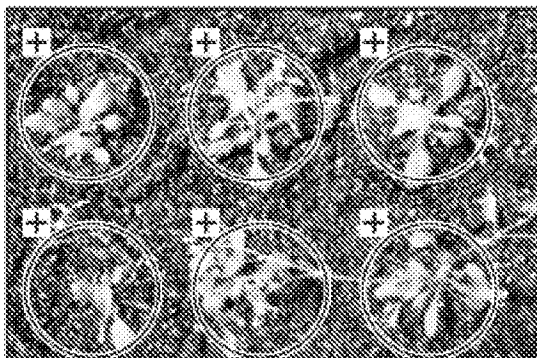


Fig. 11

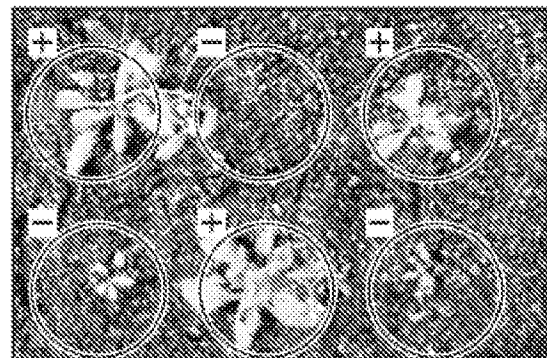


Fig. 12

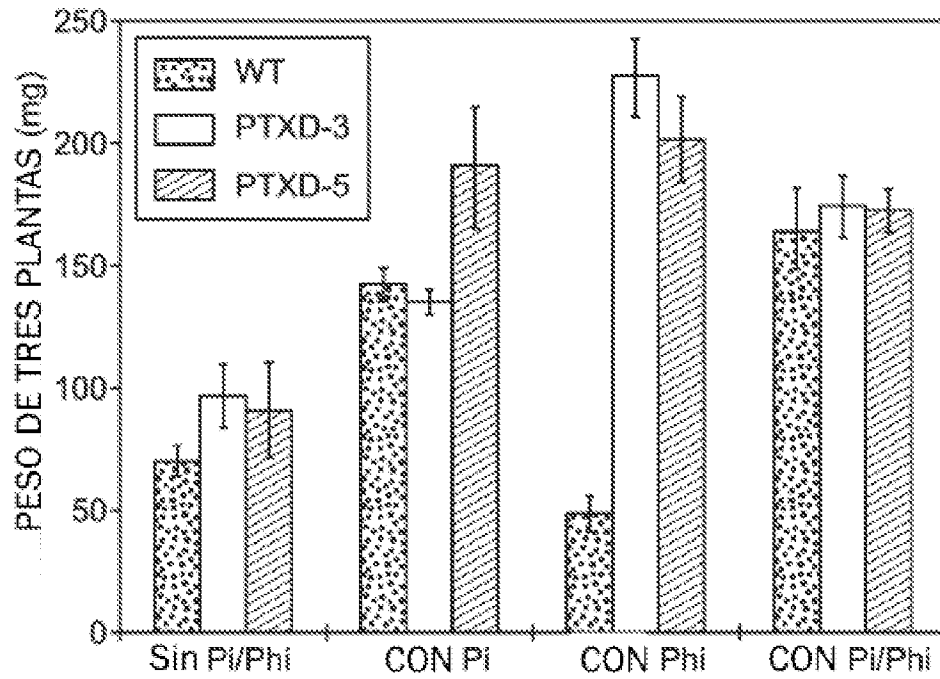


Fig. 13

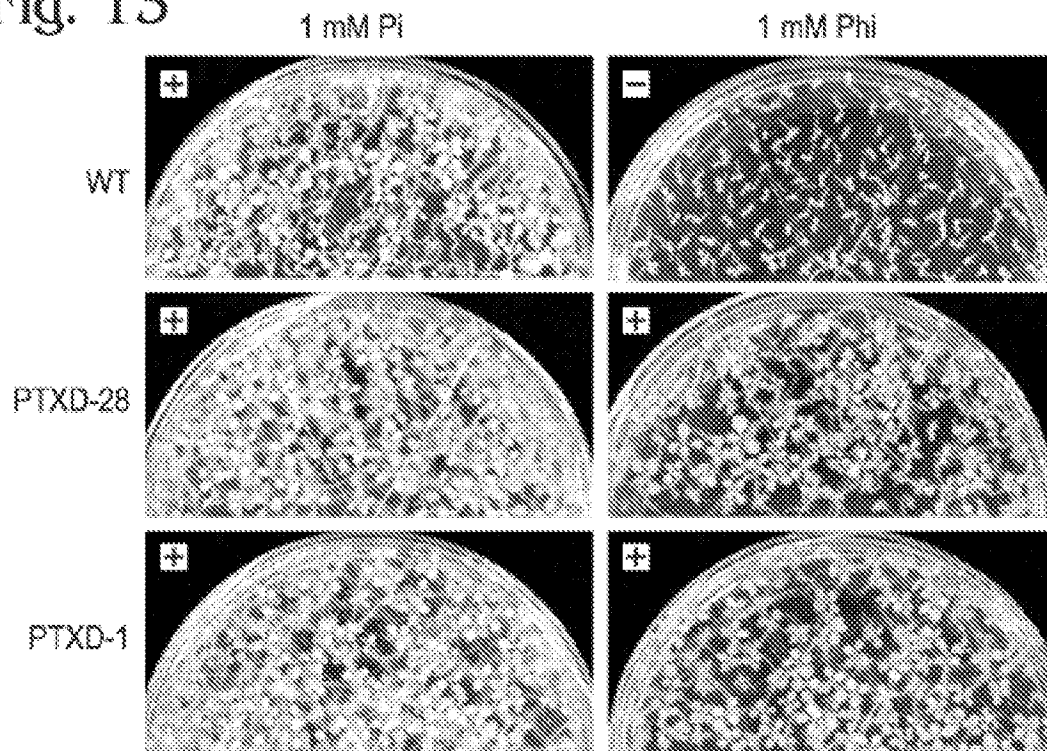
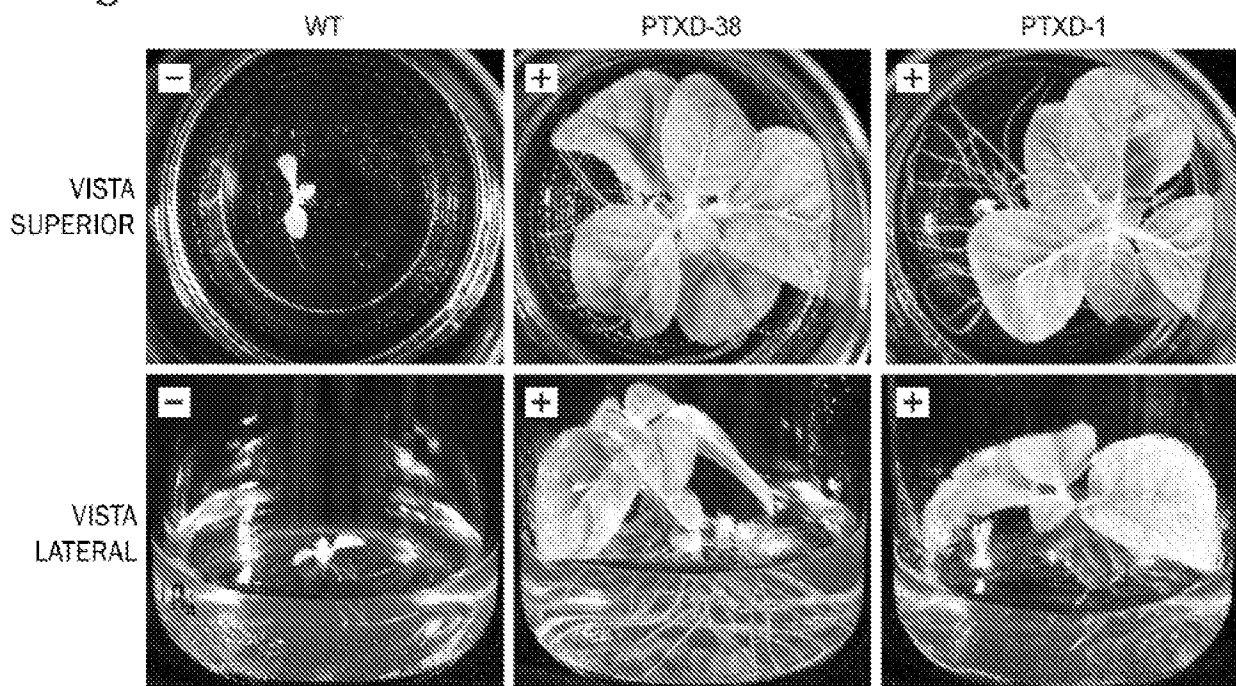


Fig. 14



ES 2 391 351 A1

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del
Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV)
Herrera-Estrella, Luis R
López-Arredondo, Damar L
Herrera-Estrella, Alfredo H

<120> PLANTAS Y HONGOS TRANSGÉNICOS CAPACES DE METABOLIZAR FOSFITO COMO FUENTE
DE FÓSFORO

<130> P-04580

<150> US 61/199,784
<151> 2008-11-19

<160> 23

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 336
<212> PRT
<213> Pseudomonas stutzeri

<400> 1

Met	Leu	Pro	Lys	Leu	Val	Ile	Thr	His	Arg	Val	His	Asp	Glu	Ile	Leu	1	5	10	15
Gln	Leu	Leu	Ala	Pro	His	Cys	Glu	Leu	Met	Thr	Asn	Gln	Thr	Asp	Ser	20	25	30	
Thr	Leu	Thr	Arg	Glu	Glu	Ile	Leu	Arg	Arg	Cys	Arg	Asp	Ala	Gln	Ala	35	40	45	
Met	Met	Ala	Phe	Met	Pro	Asp	Arg	Val	Asp	Ala	Asp	Phe	Leu	Gln	Ala	50	55	60	
Cys	Pro	Glu	Leu	Arg	Val	Val	Gly	Cys	Ala	Leu	Lys	Gly	Phe	Asp	Asn	65	70	75	80
Phe	Asp	Val	Asp	Ala	Cys	Thr	Ala	Arg	Gly	Val	Trp	Leu	Thr	Phe	Val	85	90	95	
Pro	Asp	Leu	Leu	Thr	Val	Pro	Thr	Ala	Glu	Leu	Ala	Ile	Gly	Leu	Ala	100	105	110	
Val	Gly	Leu	Gly	Arg	His	Leu	Arg	Ala	Ala	Asp	Ala	Phe	Val	Arg	Ser	115	120	125	
Gly	Glu	Phe	Gln	Gly	Trp	Gln	Pro	Gln	Phe	Tyr	Gly	Thr	Gly	Leu	Asp	130	135	140	
Asn	Ala	Thr	Val	Gly	Ile	Leu	Gly	Met	Gly	Ala	Ile	Gly	Leu	Ala	Met	145	150	155	160
Ala	Asp	Arg	Leu	Gln	Gly	Trp	Gly	Ala	Thr	Leu	Gln	Tyr	His	Glu	Ala	165	170	175	

ES 2 391 351 A1

Lys Ala Leu Asp Thr Gln Thr Glu Gln Arg Leu Gly Leu Arg Gln Val
 180 185 190
 Ala Cys Ser Glu Leu Phe Ala Ser Ser Asp Phe Ile Leu Leu Ala Leu
 195 200 205
 Pro Leu Asn Ala Asp Thr Gln His Leu Val Asn Ala Glu Leu Leu Ala
 210 215 220
 Leu Val Arg Pro Gly Ala Leu Leu Val Asn Pro Cys Arg Gly Ser Val
 225 230 235 240
 Val Asp Glu Ala Ala Val Leu Ala Ala Leu Glu Arg Gly Gln Leu Gly
 245 250 255
 Gly Tyr Ala Ala Asp Val Phe Glu Met Glu Asp Trp Ala Arg Ala Asp
 260 265 270
 Arg Pro Arg Leu Ile Asp Pro Ala Leu Leu Ala His Pro Asn Thr Leu
 275 280 285
 Phe Thr Pro His Ile Gly Ser Ala Val Arg Ala Val Arg Leu Glu Ile
 290 295 300
 Glu Arg Cys Ala Ala Gln Asn Ile Ile Gln Val Leu Ala Gly Ala Arg
 305 310 315 320
 Pro Ile Asn Ala Ala Asn Arg Leu Pro Lys Ala Glu Pro Ala Ala Cys
 325 330 335

<210> 2
 <211> 335
 <212> PRT
 <213> Acinetobacter radioresistens

<400> 2

Met Lys Gln Lys Ile Val Leu Thr His Trp Val His Pro Glu Ile Ile
 1 5 10 15
 Asp Tyr Leu Gln Ser Val Ala Asp Val Val Pro Asn Met Thr Arg Asp
 20 25 30
 Thr Met Ser Arg Ala Glu Leu Leu Glu Arg Ala Lys Asp Ala Asp Ala
 35 40 45
 Leu Met Val Phe Met Pro Asp Ser Ile Asp Asp Asp Phe Leu Ala Ser
 50 55 60
 Cys Pro Lys Leu Lys Ile Val Ser Ala Ala Leu Lys Gly Tyr Asp Asn
 65 70 75 80
 Phe Asp Val Asp Ala Cys Thr Arg Arg Gly Ile Trp Phe Ser Ile Val
 85 90 95
 Pro Asp Leu Leu Thr Ile Pro Thr Ala Glu Leu Thr Ile Gly Leu Leu
 100 105 110
 Leu Gly Leu Thr Arg His Leu Ala Glu Gly Asp Arg Arg Ile Arg Thr
 115 120 125

ES 2 391 351 A1

His Gly Phe Asn Gly Trp Arg Pro Glu Leu Tyr Gly Thr Gly Leu Thr
 130 135 140
 Gly Arg Thr Leu Gly Ile Ile Gly Met Gly Ala Val Gly Arg Ala Ile
 145 150 155 160
 Ala Lys Arg Leu Ser Ser Phe Asp Met Arg Val Leu Tyr Cys Asp Asp
 165 170 175
 Ile Ala Leu Asn Gln Glu Gln Glu Lys Ala Trp Asn Ala Arg Gln Val
 180 185 190
 Ser Leu Asp Glu Leu Leu Ser Ser Ser Asp Phe Val Val Pro Met Leu
 195 200 205
 Pro Met Thr Pro Gln Thr Leu His Leu Leu Asn Ala Glu Thr Ile Gly
 210 215 220
 Thr Met Arg Thr Gly Ser Tyr Leu Ile Asn Ala Cys Arg Gly Ser Val
 225 230 235 240
 Val Asp Glu Leu Ala Val Ala Glu Ala Leu Glu Ser Gly Lys Leu Ala
 245 250 255
 Gly Tyr Ala Ala Asp Val Phe Glu Leu Glu Glu Trp Ile Arg Val Asp
 260 265 270
 Arg Pro Thr Ala Ile Pro Gln Glu Leu Leu Thr Asn Thr Ala Gln Thr
 275 280 285
 Phe Phe Thr Pro His Leu Gly Ser Ala Val Asp Asp Val Arg Phe Glu
 290 295 300
 Ile Glu Gln Leu Ala Ala Asn Asn Ile Leu Gln Ala Leu Thr Gly Gln
 305 310 315 320
 Arg Pro Ser Asp Ala Ile Asn Asn Pro Ile Leu Glu Gly Val Asn
 325 330 335

<210> 3
 <211> 333
 <212> PRT
 <213> *Alcaligenes faecalis*

<400> 3

Met Lys Pro Arg Ile Val Thr Thr His Arg Ile His Pro Asp Thr Leu
 1 5 10 15
 Ala Leu Leu Glu Thr Ala Ala Glu Val Ile Ser Asn Gln Ser Asp Ser
 20 25 30
 Thr Met Ser Arg Glu Glu Val Leu Leu Arg Thr Asn Asp Ala Asp Gly
 35 40 45
 Met Met Val Phe Met Pro Asp Ser Ile Asp Ala Asp Phe Leu Ser Ala
 50 55 60

ES 2 391 351 A1

Cys Pro Asn Leu Lys Val Ile Gly Ala Ala Leu Lys Gly Tyr Asp Asn
 65 70 75 80
 Phe Asp Val Glu Ala Cys Thr Arg His Gly Ile Trp Phe Thr Ile Val
 85 90 95
 Pro Asp Leu Leu Thr Ser Pro Thr Ala Glu Leu Thr Ile Gly Leu Leu
 100 105 110
 Leu Ser Ile Thr Arg Asn Met Leu Gln Gly Asp Asn Tyr Ile Arg Ser
 115 120 125
 Arg Gln Phe Asn Gly Trp Thr Pro Arg Phe Tyr Gly Thr Gly Leu Thr
 130 135 140
 Gly Lys Thr Ala Gly Ile Ile Gly Thr Gly Ala Val Gly Arg Ala Val
 145 150 155 160
 Ala Lys Arg Leu Ala Ala Phe Asp Met Gln Ile Gln Tyr Thr Asp Pro
 165 170 175
 Gln Pro Leu Pro Gln Glu Ser Glu Arg Ala Trp Asn Ala Ser Arg Thr
 180 185 190
 Ser Leu Asp Gln Leu Leu Ala Thr Ser Asp Phe Ile Ile Pro Met Leu
 195 200 205
 Pro Met Ser Ser Asp Thr His His Thr Ile Asn Ala Arg Ala Leu Asp
 210 215 220
 Arg Met Lys Pro Gly Ala Tyr Leu Val Asn Ala Cys Arg Gly Ser Ile
 225 230 235 240
 Val Asp Glu Arg Ala Val Val His Ala Leu Arg Thr Gly His Leu Gly
 245 250 255
 Gly Tyr Ala Ala Asp Val Phe Glu Met Glu Glu Trp Ala Arg Pro Asp
 260 265 270
 Arg Pro His Ser Ile Pro Asp Glu Leu Leu Asp Pro Ala Leu Pro Thr
 275 280 285
 Phe Phe Thr Pro His Leu Gly Ser Ala Val Lys Ser Val Arg Met Glu
 290 295 300
 Ile Glu Arg Glu Ala Ala Leu Ser Ile Leu Glu Ala Leu Gln Gly Arg
 305 310 315 320
 Ile Pro Arg Gly Ala Val Asn His Val Gly Ala Gly Arg
 325 330

<210> 4
 <211> 332
 <212> PRT
 <213> Cyanothece sp. CCY0110

ES 2 391 351 A1

<400> 4

```

Met Ser Gln Lys Pro Lys Val Val Ile Thr His Trp Ile His Pro Glu
1      5      10      15

Val Ile Asp Tyr Leu Asn Pro Tyr Cys Glu Leu Ile Leu Asn Gln Thr
      20      25      30

Lys Glu Thr Leu Ser Arg Glu Glu Val Ile Asn Arg Ser Arg Asn Ala
      35      40      45

Gln Gly Leu Met Val Phe Met Pro Asp His Ile Asp Val Lys Phe Leu
      50      55      60

Glu Ala Cys Pro Asn Leu Lys Val Ile Ser Gly Ala Leu Arg Gly Tyr
65      70      75      80

Asp Asn Phe Asp Val Glu Ala Cys Thr Lys His Asn Ile Trp Phe Thr
      85      90      95

Ile Val Pro Asp Leu Leu Ala Ala Pro Thr Ala Glu Leu Thr Ile Gly
      100      105      110

Leu Leu Ile Ile Leu Ala Arg Arg Met Leu Glu Gly Asp Arg Leu Ile
      115      120      125

Arg Ser Asp Asn Phe Gln Gly Trp Lys Pro Gln Leu Tyr Gly Thr Gly
      130      135      140

Leu Leu Asn Lys Ser Leu Gly Ile Ile Gly Met Gly Lys Leu Gly Lys
145      150      155      160

Ala Leu Ala Lys Arg Leu Val Gly Phe Asp Met Asn Leu Leu Tyr Thr
      165      170      175

Asp Pro Ile Ser Leu Thr Asn Gln Gln Glu Lys Asp Trp Lys Ile Ser
      180      185      190

Lys Thr Ser Leu Glu Glu Leu Leu Ser Lys Ser Asp Tyr Val Val Leu
      195      200      205

Met Val Ser Leu Val Pro Asp Thr Tyr His Leu Ile Asn Glu Asn Thr
      210      215      220

Leu Lys Leu Met Lys Pro Lys Ser Phe Leu Ile Asn Pro Cys Arg Gly
225      230      235      240

Ser Val Val Asp Glu Asn Ala Ile Ala Asp Ala Ile Lys Ser Gly His
      245      250      255

Leu Ala Gly Tyr Ala Ala Asp Val Phe Glu Met Glu Asp Trp Ala Ile
      260      265      270

Ala Asn Arg Pro Lys Ser Ile Asn Gln Thr Leu Leu Thr Asp Ile Lys
      275      280      285

His Thr Phe Phe Thr Pro His Leu Gly Ser Ala Ile Asn Asp Val Arg
      290      295      300

```

ES 2 391 351 A1

Arg Glu Ile Ala Ile Glu Ala Ala Lys Asn Ile Ile Glu Val Phe Ser
305 310 315 320

Asp Asn Arg Pro Lys Ser Ala Ile Asn Asn Ile Ile
325 330

<210> 5

<211> 335

<212> PRT

<213> Gallionella ferruginea

<400> 5

Met Lys Pro Lys Ile Val Ile Thr Ser Trp Val His Pro Gln Thr Leu
1 5 10 15

Asp Met Leu Arg Pro His Cys Asp Val Val Ala Asn Glu Thr Arg Glu
20 25 30

Arg Leu Ser Arg Glu Glu Ile Ile Lys Arg Cys Ser Asp Ala Val Ala
35 40 45

Val Met Thr Phe Met Pro Asp Ser Ile Asp Asp Ala Phe Leu Ala Glu
50 55 60

Cys Pro Gln Leu Arg Leu Val Ala Cys Ala Leu Lys Gly Tyr Asp Asn
65 70 75 80

Tyr Asp Val Ala Ala Cys Thr Arg Arg Gly Val Arg Ile Thr Asn Val
85 90 95

Pro Asp Leu Leu Thr Ile Pro Thr Ala Glu Leu Thr Val Gly Leu Leu
100 105 110

Ile Gly Leu Thr Arg Lys Val Leu Gln Gly Asp Arg Phe Val Arg Ser
115 120 125

Gly Gln Phe Thr Gly Trp Arg Pro Met Leu Tyr Gly Ala Gly Leu Thr
130 135 140

Gly Arg Thr Leu Gly Ile Ile Gly Met Gly Ala Val Gly Arg Ala Ile
145 150 155 160

Ala Ala Arg Leu Gln Gly Tyr Glu Met Glu Leu Leu Tyr Thr Asp Pro
165 170 175

Gln Pro Leu Pro Pro Glu Leu Glu Ala Arg Leu Gly Leu Arg Lys Val
180 185 190

Gly Leu Val Gln Leu Leu Ala Glu Ser Asp Tyr Val Val Pro Met Val
195 200 205

Pro Tyr Thr Gln Asp Thr Leu His Met Ile Asn Ala Ala Ser Leu Ser
210 215 220

Ile Met Lys Pro Gly Ala Tyr Leu Val Asn Thr Cys Arg Gly Ser Val
225 230 235 240

ES 2 391 351 A1

Val Asp Glu Lys Ala Val Ala Asp Ala Leu Asp Ser Gly Lys Leu Ala
245 250 255

Gly Tyr Ala Ala Asp Val Phe Glu Leu Glu Glu Trp Met Arg Pro Asp
260 265 270

Arg Pro Glu Ser Ile Ser Glu Arg Leu Leu Ser Asn Thr Glu Leu Thr
275 280 285

Leu Phe Thr Pro His Ile Gly Ser Ala Val Asp Thr Val Arg Leu Ala
290 295 300

Ile Glu Met Glu Ala Ala Thr Asn Ile Leu Gln Val Leu Lys Gly Gln
305 310 315 320

Ile Pro Gln Gly Ala Ile Asn His Pro Leu Asp Lys Val Ala Val
325 330 335

<210> 6

<211> 336

<212> PRT

<213> Janthinobacterium sp. Marseille

<400> 6

Met Lys Pro Lys Ile Val Ile Thr His Trp Val His Pro Glu Ile Val
1 5 10 15

Glu Met Leu Ser Ser Val Ala Glu Val Val Thr Asn Asp Thr Leu Glu
20 25 30

Thr Leu Pro Arg Glu Glu Leu Leu Arg Arg Ser Lys Asp Ala Asp Ala
35 40 45

Val Met Ala Phe Met Pro Asp Ser Val Asp Asp Ser Phe Leu Ala Ala
50 55 60

Cys Pro Lys Leu Lys Ile Val Phe Ala Ala Leu Lys Gly Tyr Asp Asn
65 70 75 80

Phe Asp Val Asp Ala Cys Thr Lys Arg Gly Val Trp Phe Gly Ile Val
85 90 95

Pro Asp Leu Leu Thr Val Pro Thr Ala Glu Leu Thr Val Gly Leu Leu
100 105 110

Leu Gly Leu Thr Arg His Val Met Ala Gly Asp Asp His Val Arg Ser
115 120 125

Gly Thr Phe His Gly Trp Arg Pro Lys Leu Tyr Gly Ala Gly Leu Ala
130 135 140

Gly Ser Thr Ile Gly Ile Ile Gly Met Gly Arg Val Gly Lys Ala Ile
145 150 155 160

Ala Lys Arg Leu Ser Gly Phe Glu Met Asn Ala Val Tyr Cys Asp Ser
165 170 175

Val Pro Leu Asn Pro Val Asp Glu Gln Ala Trp Asn Ala Arg Gln Val
180 185 190

ES 2 391 351 A1

Ser Phe Asp Glu Leu Leu Thr Cys Ser Asp Phe Val Val Pro Met Leu
195 200 205

Pro Met Thr Ser Asp Thr Phe His Leu Ile Asp Ala His Ala Ile Ser
210 215 220

Lys Met Arg Arg Gly Ser Tyr Leu Leu Asn Thr Ser Arg Gly Ser Val
225 230 235 240

Val Asp Glu Asn Ala Val Val Glu Ala Leu Asn Gln Gly His Leu Ala
245 250 255

Gly Tyr Ala Ala Asp Val Phe Glu Met Glu Glu Trp Ala Arg Pro Asp
260 265 270

Arg Pro Leu Thr Val Pro Gln Ala Leu Leu Asn Asn Arg Thr Gln Thr
275 280 285

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

Ile Glu Arg Tyr Ser Ala His Ser Ile Leu Gln Ala Leu Ala Gly Gln
305 310 315 320

Arg Pro Asp Gly Ala Leu Asn Glu Pro Leu Lys Ala Ser Val Ala Ala
325 330 335

<210> 7
<211> 336
<212> PRT
<213> Klebsiella pneumoniae

<400> 7

Met Leu Pro Lys Leu Val Ile Thr His Arg Val His Asp Glu Ile Leu
1 5 10 15

Gln Leu Leu Ala Pro His Cys Glu Leu Val Thr Asn Gln Thr Asp Ser
20 25 30

Thr Leu Thr Arg Glu Glu Ile Leu Arg Arg Cys Arg Asp Ala Gln Ala
35 40 45

Met Met Ala Phe Met Pro Asp Arg Val Asp Ala Asp Phe Leu Gln Ala
50 55 60

Cys Pro Glu Leu Arg Val Val Gly Cys Ala Leu Lys Gly Phe Asp Asn
65 70 75 80

Phe Asp Val Asp Ala Cys Thr Ala Arg Gly Val Trp Leu Thr Phe Val
85 90 95

Pro Asp Leu Leu Thr Val Pro Thr Ala Glu Leu Ala Ile Gly Leu Ala
100 105 110

Val Gly Leu Gly Arg His Leu Arg Ala Ala Asp Ala Phe Val Arg Ser
115 120 125

ES 2 391 351 A1

Gly Glu Phe Gln Gly Trp Gln Pro Gln Phe Tyr Gly Thr Gly Leu Asp
 130 135 140
 Asn Ala Thr Val Gly Ile Leu Gly Met Gly Ala Ile Gly Leu Ala Met
 145 150 155 160
 Ala Glu Arg Leu Gln Gly Trp Gly Ala Thr Leu Gln Tyr His Glu Ala
 165 170 175
 Lys Ala Leu Asp Thr Gln Thr Glu Gln Arg Leu Gly Leu Arg Gln Val
 180 185 190
 Ala Cys Ser Glu Leu Phe Ala Ser Ser Asp Phe Ile Leu Leu Ala Leu
 195 200 205
 Pro Leu Asn Ala Asp Thr Gln His Leu Val Asn Ala Glu Leu Leu Ala
 210 215 220
 Leu Val Arg Pro Gly Ala Leu Leu Val Asn Pro Cys Arg Gly Ser Val
 225 230 235 240
 Val Asp Glu Ala Ala Val Leu Ala Ala Leu Glu Arg Gly Gln Leu Gly
 245 250 255
 Gly Tyr Ala Ala Asp Val Phe Glu Met Glu Asp Trp Ala Arg Ala Asp
 260 265 270
 Arg Pro Arg Leu Ile Asp Pro Ala Leu Leu Ala His Pro Asn Thr Leu
 275 280 285
 Phe Thr Pro His Ile Gly Ser Ala Val Arg Ala Val Arg Leu Glu Ile
 290 295 300
 Glu Arg Cys Ala Ala Gln Asn Ile Ile Gln Val Leu Ala Gly Ala Arg
 305 310 315 320
 Pro Ile Asn Ala Ala Asn Arg Leu Pro Lys Ala Glu Pro Ala Ala Cys
 325 330 335

<210> 8
 <211> 336
 <212> PRT
 <213> Marinobacter algicola

<400> 8

Met Lys Pro Arg Val Val Ile Thr His Arg Val His Asp Ser Ile Leu
 1 5 10 15
 Ala Ser Leu Glu Pro His Cys Glu Leu Ile Thr Asn Gln Ser Ala Val
 20 25 30
 Thr Leu Pro Pro Asp Ser Val Arg Ala Arg Ala Ala Thr Ala Asp Ala
 35 40 45
 Met Met Ala Phe Met Pro Asp Arg Val Ser Glu Glu Phe Leu Val Ala
 50 55 60

ES 2 391 351 A1

Cys Pro Asp Leu Lys Val Ile Gly Ala Ala Leu Lys Gly Phe Asp Asn
 65 70 75 80
 Phe Asp Val Asp Ala Cys Thr Arg His Gly Val Trp Leu Thr Phe Val
 85 90 95
 Pro Asp Leu Leu Thr Val Pro Thr Ala Glu Leu Thr Val Gly Leu Thr
 100 105 110
 Ile Gly Leu Ile Arg Gln Ile Arg Pro Ala Asp Gln Phe Val Arg Ser
 115 120 125
 Gly Glu Phe Gln Gly Trp Gln Pro Gln Phe Tyr Gly Leu Gly Ile Glu
 130 135 140
 Gly Ser Thr Ile Gly Ile Val Gly Met Gly Ala Ile Gly Lys Ala Val
 145 150 155 160
 Ala Thr Arg Leu Gln Gly Trp Gly Ala Arg Val Leu Tyr Ser Gln Pro
 165 170 175
 Glu Ser Leu Pro Ala Ala Glu Glu Gly Ala Leu Gly Leu Ser Arg Ser
 180 185 190
 Glu Leu Asp Asp Leu Leu Ala Glu Ser Asp Ile Val Ile Leu Ala Leu
 195 200 205
 Ala Leu Asn Glu His Thr Leu His Thr Leu Asn Ala Asp Arg Leu Arg
 210 215 220
 Gln Met Lys Arg Gly Ser Phe Leu Ile Asn Pro Cys Arg Gly Ser Val
 225 230 235 240
 Val Asp Glu Ala Ala Val Leu Gln Ser Leu Thr Tyr Gly His Leu Ser
 245 250 255
 Gly Tyr Ala Ala Asp Val Phe Glu Met Glu Asp Trp Ala Arg Pro Asp
 260 265 270
 Arg Pro Gln Arg Ile Asp Pro Ala Leu Leu Ala His Pro Asn Thr Leu
 275 280 285
 Phe Thr Ala His Thr Gly Ser Ala Val Arg Asp Val Arg Phe Ala Ile
 290 295 300
 Glu Leu Arg Ala Ala Asp Asn Ile Leu Gln Ala Leu Arg Gly His Gln
 305 310 315 320
 Pro Gln Asp Ala Val Asn Ser Pro Leu Glu Pro Lys Gly Thr Val Cys
 325 330 335

<210> 9
 <211> 339
 <212> PRT
 <213> Methylobacterium extorquens

<400> 9

Met Arg Phe Lys Val Val Val Thr Asn Pro Val Phe Pro Glu Thr Arg
 1 5 10 15

ES 2 391 351 A1

Glu Ile Leu Glu Gly Leu Cys Asp Val Asp Ile Asn Pro Gly Pro Glu
 20 25 30
 Pro Trp Pro Ala Ala Glu Val Arg Ala Arg Cys Ser Asp Ala Asp Ala
 35 40 45
 Leu Leu Ala Phe Met Thr Asp Cys Val Asp Ala Gly Phe Leu Glu Ala
 50 55 60
 Cys Pro Arg Leu Lys Val Val Ala Cys Ala Leu Lys Gly Trp Asp Asn
 65 70 75 80
 Phe Asp Val Glu Ala Cys Thr Arg Ser Gly Ile Trp Leu Thr Ala Val
 85 90 95
 Pro Asp Leu Leu Thr Glu Pro Thr Ala Glu Leu Ala Val Gly Leu Ala
 100 105 110
 Ile Gly Leu Cys Arg Asn Val Val Ala Gly Asp Arg Ala Val Arg Ala
 115 120 125
 Gly Phe Asp Gly Trp Arg Pro Arg Leu Tyr Gly Ser Gly Leu Tyr Gly
 130 135 140
 Ser Val Val Gly Val Ala Gly Met Gly Lys Val Gly Arg Ala Ile Thr
 145 150 155 160
 Arg Arg Leu Lys Gly Phe Gly Ala Arg Glu Leu Leu Tyr Phe Asp Glu
 165 170 175
 Gln Ala Leu Pro Ala Ser Ala Glu Ala Glu Leu Gly Ala Cys Arg Val
 180 185 190
 Ser Trp Asp Thr Leu Val Gly Arg Ser Asp Val Leu Ile Leu Ala Leu
 195 200 205
 Pro Leu Thr Pro Asp Thr Arg His Met Leu Asp Ala Ala Ala Leu Ala
 210 215 220
 Ala Ala Ser Pro Gly Leu Arg Ile Val Asn Ala Gly Arg Gly Ser Val
 225 230 235 240
 Val Asp Glu Ala Ala Val Ala Glu Ala Leu Ala Glu Gly Arg Leu Gly
 245 250 255
 Gly Tyr Ala Ala Asp Val Phe Glu Met Glu Asp Trp Ala Leu Asp Asp
 260 265 270
 Arg Pro Arg Arg Ile Ala Pro Gly Leu Leu Thr Val Glu Asp Arg Thr
 275 280 285
 Leu Phe Thr Pro His Leu Gly Ser Gly Val Val Asp Thr Arg Arg Arg
 290 295 300
 Ile Glu Ala Ala Ala Ala His Asn Leu Leu Asp Ala Leu Lys Gly Leu
 305 310 315 320
 Val Pro Ala Asp Ser Ile Asn His Pro Glu Ser Leu Arg Gly Phe Asp
 325 330 335

ES 2 391 351 A1

Gly Ala Asn

<210> 10
 <211> 332
 <212> PRT
 <213> Nostoc sp. PCC 7120

<400> 10

Met	Lys	Pro	Lys	Val	Val	Ile	Thr	Asn	Trp	Val	His	Pro	Glu	Val	Ile	1	5	10	15
Glu	Leu	Leu	Lys	Pro	Ser	Cys	Glu	Val	Ile	Ala	Asn	Pro	Ser	Lys	Glu	20	25	30	
Ala	Leu	Ser	Arg	Glu	Glu	Ile	Leu	Gln	Arg	Ala	Lys	Asp	Ala	Glu	Ala	35	40	45	
Leu	Met	Val	Phe	Met	Pro	Asp	Thr	Ile	Asp	Glu	Ala	Phe	Leu	Arg	Glu	50	55	60	
Cys	Pro	Lys	Leu	Lys	Ile	Ile	Ala	Ala	Ala	Leu	Lys	Gly	Tyr	Asp	Asn	65	70	75	80
Phe	Asp	Val	Ala	Ala	Cys	Thr	His	Arg	Gly	Ile	Trp	Phe	Thr	Ile	Val	85	90	95	
Pro	Ser	Leu	Leu	Ser	Ala	Pro	Thr	Ala	Glu	Ile	Thr	Ile	Gly	Leu	Leu	100	105	110	
Ile	Gly	Leu	Gly	Arg	Gln	Met	Leu	Glu	Gly	Asp	Arg	Phe	Ile	Arg	Thr	115	120	125	
Gly	Lys	Phe	Thr	Gly	Trp	Arg	Pro	Gln	Phe	Tyr	Ser	Leu	Gly	Leu	Ala	130	135	140	
Asn	Arg	Thr	Leu	Gly	Ile	Val	Gly	Met	Gly	Ala	Leu	Gly	Lys	Ala	Ile	145	150	155	160
Ala	Gly	Arg	Leu	Ala	Gly	Phe	Glu	Met	Gln	Leu	Leu	Tyr	Ser	Asp	Pro	165	170	175	
Val	Ala	Leu	Pro	Pro	Glu	Gln	Glu	Ala	Thr	Gly	Asn	Ile	Ser	Arg	Val	180	185	190	
Pro	Phe	Glu	Thr	Leu	Ile	Glu	Ser	Ser	Asp	Phe	Val	Val	Leu	Val	Val	195	200	205	
Pro	Leu	Gln	Pro	Ala	Thr	Leu	His	Leu	Ile	Asn	Ala	Asn	Thr	Leu	Ala	210	215	220	
Lys	Met	Lys	Pro	Gly	Ser	Phe	Leu	Ile	Asn	Pro	Cys	Arg	Gly	Ser	Val	225	230	235	240
Val	Asp	Glu	Gln	Ala	Val	Cys	Lys	Ala	Leu	Glu	Ser	Gly	His	Leu	Ala	245	250	255	

ES 2 391 351 A1

Gly Tyr Ala Ala Asp Val Phe Glu Met Glu Asp Trp Tyr Arg Ser Asp
260 265 270

Arg Pro His Asn Ile Pro Gln Pro Leu Leu Glu Asn Thr Lys Gln Thr
275 280 285

Phe Phe Thr Pro His Ile Gly Ser Ala Val Asp Glu Leu Arg His Asn
290 295 300

Ile Ala Leu Glu Ala Ala Gln Asn Ile Leu Gln Ala Leu Gln Gly Gln
305 310 315 320

Lys Pro Gln Gly Ala Val Asn Tyr Leu Arg Glu Ser
325 330

<210> 11

<211> 331

<212> PRT

<213> Oxalobacter formigenes

<400> 11

Met Asn Lys Gln Lys Val Val Leu Thr His Trp Val His Pro Glu Ile
1 5 10 15

Val Glu Met Leu Gln Glu Lys Thr Asp Val Val Ala Asn Leu Ser Arg
20 25 30

Lys Thr Phe Thr Arg Asp Glu Leu Leu Glu Arg Ala Ala Ala Ala Asp
35 40 45

Ala Leu Met Ala Phe Met Pro Asp Cys Ile Asp Glu Asp Phe Leu Lys
50 55 60

Ala Cys Pro Lys Leu Lys Val Ile Gly Ala Ala Leu Lys Gly Tyr Asp
65 70 75 80

Asn Phe Asp Val Lys Ala Cys Thr Glu Arg Gly Val Trp Leu Thr Ile
85 90 95

Ala Pro Asp Leu Leu Thr Ile Pro Thr Ala Glu Leu Thr Val Gly Leu
100 105 110

Val Leu Ala Ile Thr Arg Asn Met Leu Glu Gly Asp Arg His Ile Arg
115 120 125

Ser Gly Gln Phe Asn Gly Trp Arg Pro Glu Leu Tyr Gly Leu Gly Leu
130 135 140

His Lys Arg Thr Ala Gly Ile Ile Gly Met Gly Phe Val Gly Lys Ala
145 150 155 160

Val Ala Glu Arg Leu Lys Gly Phe Gly Met Asp Ile Leu Tyr Ala Asp
165 170 175

Gln Ser Pro Leu Ser Gln Glu Glu Glu Arg Glu Leu Gly Leu Thr Arg
180 185 190

ES 2 391 351 A1

Thr Gly Leu Pro Gln Leu Met His Ser Ser Asp Val Val Ile Pro Leu
 195 200 205
 Leu Pro Leu Thr Glu Gln Thr Phe His Leu Phe Asp Lys Asp Ile Leu
 210 215 220
 Gly Gln Met Lys Gln Gly Ser Tyr Leu Val Asn Ala Cys Arg Gly Ser
 225 230 235 240
 Val Val Asp Glu Lys Ala Val Val His Ser Leu Lys Thr Gly Gln Leu
 245 250 255
 Ala Gly Tyr Ala Ala Asp Val Phe Glu Met Glu Asp Trp Ile Arg Ser
 260 265 270
 Asp Arg Pro Arg Glu Ile Pro Gln Glu Leu Leu Asp Asn Thr Ala Gln
 275 280 285
 Thr Phe Phe Thr Pro His Leu Gly Ser Ala Val Asp Glu Ile Arg Ile
 290 295 300
 Glu Ile Glu Arg Tyr Cys Ala Thr Ser Ile Leu Gln Ala Leu Ala Gly
 305 310 315 320
 Asp Ile Pro Asp Gly Arg Val Asn Asp Ile Arg
 325 330

<210> 12
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sviveus

<400> 12

Met Val Thr His Trp Ile His Pro Glu Val Val Asp Tyr Leu Arg Arg
 1 5 10 15
 Phe Cys Asp Pro Val Val Pro Val Glu Thr Glu Val Leu Gly Arg Arg
 20 25 30
 Gln Cys Leu Glu Leu Ala Ala Asp Ala Asp Ala Leu Ile Met Cys Met
 35 40 45
 Ala Asp Arg Val Asp Asp Asp Phe Leu Ala Gln Cys Pro Arg Leu Arg
 50 55 60
 Val Ile Ser Thr Val Val Lys Gly Tyr Asp Asn Phe Asp Ala Glu Ala
 65 70 75 80
 Cys Ala Arg Arg Gly Val Trp Leu Thr Val Leu Pro Asp Leu Leu Thr
 85 90 95
 Ala Pro Thr Ala Glu Leu Ala Val Thr Leu Ala Val Ala Leu Gly Arg
 100 105 110
 Arg Ile Arg Glu Gly Asp Ala Leu Met Arg Ser Gly Arg Tyr Asp Gly
 115 120 125
 Trp Arg Pro Val Leu Tyr Gly Thr Gly Leu Tyr Arg Ser Arg Val Gly
 130 135 140

ES 2 391 351 A1

Val Val Gly Met Gly Arg Leu Gly Arg Ala Val Ala Arg Arg Leu Ser
145 150 155 160

Gly Phe Glu Pro Ser Glu Val Leu Tyr Tyr Asp Lys Gln Pro Leu Gly
165 170 175

Ala Ser Glu Glu Arg Arg Leu Gly Val Arg Ala Ala Gly Leu Glu Glu
180 185 190

Leu Met Gly Arg Cys Gln Val Val Leu Ser Leu Leu Pro Leu Ala Met
195 200 205

Asp Thr Arg His Leu Ile Gly Ser Asp Ala Ile Ala Ala Ala Arg Pro
210 215 220

Gly Gln Leu Leu Val Asn Val Gly Arg Gly Ser Val Val Asp Glu Asp
225 230 235 240

Ala Val Ala Ala Ala Leu Asp Cys Gly Pro Leu Gly Gly Tyr Ala Ala
245 250 255

Asp Val Phe Gly Cys Glu Asp Leu Thr Ala Pro Gly His Leu Arg Glu
260 265 270

Val Pro Arg Arg Leu Leu Thr His Pro Arg Thr Leu Leu Thr Pro His
275 280 285

Leu Gly Ser Ala Val Asp Val Ile Arg Arg Asp Met Glu Ile Ala Ala
290 295 300

Ala His Gln Val Glu Gln Ala Leu Ser Gly Arg Val Pro Asp His Glu
305 310 315 320

Val Thr Ala Gly Leu Leu Arg Glu
325

<210> 13
<211> 336
<212> PRT
<213> Thioalkalivibrio sp. HL-EbGR7

<400> 13

Met Leu Pro Lys Leu Val Ile Thr His Arg Val His Asp Glu Ile Leu
1 5 10 15

Gln Leu Leu Ala Pro His Cys Glu Leu Met Thr Asn Gln Thr Asp Ser
20 25 30

Thr Leu Pro Arg Glu Glu Ile Leu Arg Arg Cys Arg Asp Ala Gln Ala
35 40 45

Met Met Ala Phe Met Pro Asp Arg Val Asp Ala Asp Phe Leu Gln Ala
50 55 60

Cys Pro Glu Leu Arg Val Val Gly Cys Ala Leu Lys Gly Phe Asp Asn
65 70 75 80

ES 2 391 351 A1

Phe Asp Val Asp Ala Cys Thr Ala Arg Gly Val Trp Leu Thr Phe Val
 85 90 95
 Pro Asp Leu Leu Thr Val Pro Thr Ala Glu Leu Ala Ile Gly Leu Ala
 100 105 110
 Val Gly Leu Gly Arg His Leu Arg Ala Ala Asp Ala Phe Val Arg Ser
 115 120 125
 Gly Glu Phe Gln Gly Trp Gln Pro Gln Phe Tyr Gly Thr Gly Leu Asp
 130 135 140
 Asn Ala Thr Val Gly Ile Leu Gly Met Gly Ala Ile Gly Leu Ala Met
 145 150 155 160
 Ala Asp Arg Leu Gln Gly Trp Gly Ala Thr Leu Gln Tyr His Glu Ala
 165 170 175
 Lys Ala Leu Asp Thr Gln Thr Glu Gln Arg Leu Gly Leu Arg Arg Val
 180 185 190
 Ala Cys Ser Glu Leu Phe Ala Ser Ser Asp Phe Ile Leu Leu Ala Leu
 195 200 205
 Pro Leu Asn Ala Asp Thr Gln His Leu Val Asn Ala Glu Leu Leu Ala
 210 215 220
 Leu Val Arg Pro Gly Ala Leu Leu Val Asn Pro Cys Arg Gly Ser Val
 225 230 235 240
 Val Asp Glu Ala Ala Val Leu Ala Ala Leu Glu Arg Gly Gln Leu Gly
 245 250 255
 Gly Tyr Ala Ala Asp Val Phe Glu Met Glu Asp Trp Ala Arg Ala Asp
 260 265 270
 Arg Pro Arg Leu Ile Asp Pro Ala Leu Leu Thr His Pro Asn Thr Leu
 275 280 285
 Phe Thr Pro His Ile Gly Ser Ala Val Arg Ala Val Arg Leu Glu Ile
 290 295 300
 Glu Arg Cys Ala Ala Gln Asn Ile Ile Gln Val Leu Ala Gly Ala Arg
 305 310 315 320
 Pro Ile Asn Ala Ala Asn Arg Leu Pro Lys Ala Glu Pro Ala Ala Cys
 325 330 335

<210> 14
 <211> 331
 <212> PRT
 <213> Xanthobacter flavus

<400> 14

Met Ala Arg Lys Thr Ile Val Thr Asn Trp Val His Pro Glu Val Leu
 1 5 10 15

ES 2 391 351 A1

Asp	Leu	Leu	Ser	Thr	Arg	Gly	Pro	Ala	Glu	Ala	Asn	Thr	Thr	Arg	Glu	20	25	30	
Pro	Trp	Pro	Arg	Asp	Glu	Ile	Ile	Arg	Arg	Ala	His	Gly	Ala	Asp	Ala	35	40	45	
Met	Leu	Ala	Phe	Met	Thr	Asp	His	Val	Asp	Ala	Ala	Phe	Leu	Asp	Ala	50	55	60	
Cys	Pro	Glu	Leu	Lys	Ile	Val	Ala	Cys	Ala	Leu	Lys	Gly	Ala	Asp	Asn	65	70	75	80
Phe	Asp	Met	Glu	Ala	Cys	Arg	Ala	Arg	Lys	Val	Ala	Val	Thr	Ile	Val	85	90	95	
Pro	Asp	Leu	Leu	Thr	Ala	Pro	Thr	Ala	Glu	Leu	Ala	Val	Gly	Leu	Met	100	105	110	
Ile	Thr	Leu	Gly	Arg	Asn	Leu	Leu	Ala	Gly	Asp	Arg	Leu	Ile	Arg	Glu	115	120	125	
Arg	Pro	Phe	Ala	Gly	Trp	Arg	Pro	Val	Leu	Tyr	Gly	Thr	Gly	Leu	Asp	130	135	140	
Gly	Ala	Glu	Val	Gly	Ile	Val	Gly	Met	Gly	Ala	Val	Gly	Gln	Ala	Ile	145	150	155	160
Ala	His	Arg	Leu	Arg	Pro	Phe	Arg	Cys	Arg	Leu	Ser	Tyr	Cys	Asp	Ala	165	170	175	
Arg	Pro	Leu	Ser	Pro	Ala	Ala	Glu	Asp	Ala	Gln	Gly	Leu	Leu	Arg	Arg	180	185	190	
Asp	Leu	Ala	Asp	Leu	Val	Ala	Arg	Ser	Asp	Tyr	Leu	Val	Leu	Ala	Leu	195	200	205	
Pro	Leu	Thr	Pro	Ala	Ser	Arg	His	Leu	Ile	Asp	Ala	Ala	Ala	Leu	Ala	210	215	220	
Gly	Met	Lys	Pro	Gly	Ala	Leu	Leu	Ile	Asn	Pro	Ala	Arg	Gly	Ser	Leu	225	230	235	240
Val	Asp	Glu	Ala	Ala	Val	Ala	Asp	Ala	Leu	Glu	Ala	Gly	His	Leu	Gly	245	250	255	
Gly	Tyr	Ala	Ala	Asp	Val	Phe	Glu	Thr	Glu	Asp	Trp	Ala	Arg	Pro	Asp	260	265	270	
Arg	Pro	Ala	Ala	Ile	Glu	Ala	Arg	Leu	Leu	Ala	His	Pro	Arg	Thr	Val	275	280	285	
Leu	Thr	Pro	His	Ile	Gly	Ser	Ala	Val	Asp	Ser	Val	Arg	Arg	Asp	Ile	290	295	300	
Ala	Leu	Ala	Ala	Ala	Arg	Asp	Ile	Leu	Arg	His	Leu	Asp	Gly	Leu	Gln	305	310	315	320
Gln	Asp	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Arg	Ser	Ala	Ala						325	330		

ES 2 391 351 A1

<210> 15
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia consenso para el motivo de unión a NAD

<400> 15

Val Gly Ile Leu Gly Met Gly Ala Ile Gly
 1 5 10

<210> 16
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia consenso distintiva para el D-isómero específico de la familia de 2-hidroxiácido

<220>
 <221> CARACT_MISCELÁNEA
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa puede ser Arg o Lys

<400> 16

Xaa Pro Gly Ala Leu Leu Val Asn Pro Cys Arg Gly Ser Val Val Asp
 1 5 10 15

<210> 17
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia conservada distintiva para el isómero D-específico de la familia de 2-hidroxiácido

<400> 17

Arg Gly Ser Val Val Asp
 1 5

<210> 18
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Motivo consenso que puede permitir a las hidrogenasas utilizar el fosfito como sustrato

ES 2 391 351 A1

<400> 18

Gly Trp Gln Pro Gln Phe Tyr Gly Thr Gly Leu
1 5 10

<210> 19

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Motivo consenso que puede permitir a las hidrogenasas utilizar el fosfito como sustrato

<220>

<221> CARACT MISCELÁNEA

<222> (3)..(3)

<223> Xaa representa X1, el cual es Arg, Gln, Lys, o Thr

<220>

<221> CARACT MISCELÁNEA

<222> (5)..(5)

<223> Xaa representa X2, el cual es Ala, Val, Gln, Arg, Lys, His, o Glu

<220>

<221> CARACT MISCELÁNEA

<222> (6)..(6)

<223> Xaa representa X3, el cual es Leu o Phe

<220>

<221> CARACT MISCELÁNEA

<222> (8)..(8)

<223> Xaa representa X4, el cual es Gly, Phe, o Ser

<220>

<221> CARACT MISCELÁNEA

<222> (9)..(9)

<223> Xaa representa X5, el cual es Thr, Arg, Met, Leu, Ala, o Ser

<400> 19

Gly Trp Xaa Pro Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Gly Leu
1 5 10

<210> 20

<211> 286

<212> PRT

<213> Pseudomonas stutzeri

<400> 20

Met Phe Ala Glu Gln Gln Arg Glu Tyr Leu Asp Lys Gly Tyr Thr Lys
1 5 10 15

Ile Glu Ser Phe Phe Ser Ala Glu Glu Val Ala Lys Ile Leu Glu Asp
20 25 30

ES 2 391 351 A1

Val Lys Gln Ile Glu Leu Gly Ala Ile Gly Val Ala Ser Asp Asn Glu
35 40 45

Thr Tyr Gln Phe Glu Lys Lys Asn Gly Glu Thr Thr Lys Leu Leu Arg
50 55 60

Arg Val Glu Asn Pro His Leu Tyr Phe Asp Ala Ile Asp Ser Leu Val
65 70 75 80

Arg Ser Glu Lys Ile Val Asp Leu Leu Arg His Phe Leu Gly Glu Asn
85 90 95

Ile Arg Leu His Asn Ser Lys Ile Asn Phe Lys Pro Pro Ser Gly Ala
100 105 110

Pro Val Gln Trp His Gln Asp Trp Ala Phe Tyr Pro His Thr Asn Asp
115 120 125

Asp Phe Leu Thr Leu Gly Ile Phe Leu Asp Glu Thr Ser Glu Lys Asn
130 135 140

Gly Ala Met Ala Cys Leu Pro Gly Ser His Lys Gly Lys Val Tyr Asp
145 150 155 160

His Arg Asn Val Glu Thr Gly Glu Phe Cys His Ala Ile Ser Arg Ser
165 170 175

Asn Trp Asp Glu Ala Leu Asp Pro Thr Glu Gly Glu Leu Leu Thr Gly
180 185 190

Pro Val Gly Thr Val Thr Leu His His Val Arg Thr Leu His Gly Ser
195 200 205

Gly Pro Asn His Ser Thr Ile Arg Arg Arg Phe Leu Leu Ile Gly Tyr
210 215 220

Ala Ala Ala Asp Ala Trp Pro Leu Leu Gly Cys Gly Asn Tyr Gly Asp
225 230 235 240

Tyr Glu Ser Leu Met Val Ser Gly Arg Ser Thr Val Phe Pro Arg Met
245 250 255

Val Glu Leu Pro Leu Thr Val Pro Tyr Pro Leu Ser Met Tyr Gly Asp
260 265 270

Arg Ile Phe Glu Ser Gln Arg Ala Leu Thr Gln Lys Tyr Tyr
275 280 285

<210> 21

<211> 1011

<212> DNA

<213> Pseudomonas stutzeri

<400> 21

atgctgccga aactcggttat aactcaccga gtacacgatg agatcctgca actgctggcg 60

ccacattgcg agctgatgac caaccagacc gacagcacgc tgacgcgcga ggaaattctg 120

ES 2 391 351 A1

cgccgctgtc gcgatgctca ggcgatgatg gcgttcatgc ccgatcgggt cgatgcagac	180
tttcttcaag cctgccctga gctgcgtgta gtcggctgcg cgctcaaggg cttegacaat	240
ttcgatgtgg acgcctgtac tgcccgcggt gtctggctga ccttcgtgcc tgatctgttg	300
acggtcccga ctgccgagct ggcgatcgga ctggcggtgg ggctggggcg gcatctgcgg	360
gcagcagatg cgttcgtccg ctctggcgag ttccagggtt ggcaaccaca gttctacggc	420
acggggctgg ataacgctac ggtcggcatc cttggcatgg gcgccatcgg actggccatg	480
gctgatcgct tgcagggatg gggcgcgacc ctgcagtacc acgaggcgaa ggctctggat	540
acacaaaccg agcaacggct cggcctgcgc cagggtggcg gcagcgaaact cttegccagc	600
tcggacttca tctgctggc gttcccttg aatgccgata ccagcatct ggtcaacgcc	660
gagctgcttg ccctcgtagc gccgggcgct ctgcttgtaa acccctgtcg tggttcggta	720
gtggatgaag ccgccgtgct cgcggcgctt gagcgaggcc agctcggcgg gtatgcggcg	780
gatgtattcg aaatggaaga ctgggctcgc gcggaccggc cgcggtgat cgatcctgcg	840
ctgctcgcgc atccgaatac gctgttact ccgcacatag ggtcggcagt gcgcgcggtg	900
cgcttgaga ttgaacgttg tgcagcgag aacatcatcc aggtattggc aggtgcgcgc	960
ccaatcaacg ctgcgaaccg tctgcccaag gccgagcctg ccgatgttg a	1011

<210> 22
 <211> 56
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador sentido para la amplificación de la secuencia codificante ptxD de *Pseudomonas stutzeri*

<400> 22 ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggcta aatgctgccg aaactcgta taactc	56
--	----

<210> 23
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador antisentido para la amplificación de la secuencia codificante ptxD de *Pseudomonas stutzeri*

<400> 23 ggggaccact ttgtacaaga aagctgggta tcaacatgcg gcaggctc	48
--	----



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201190037

②② Fecha de presentación de la solicitud: 19.11.2009

③② Fecha de prioridad: **19-11-2008**

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12N15/80** (2006.01)
C12N15/82 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	US 20040091985 A1 (METCALF, et al.) 13.05.2004, párrafos [0013],[0024],[0042],[0044],[0069],[0090],[0096], SEQ ID NO:1.	1-10,12-18,20-28,30-32,37-50
Y	US 20060253920 A1 (WANG, et al.) 09.11.2006, párrafos [0012],[0029],[0032],[0044],[0048],[0059],[0063],[0068],[0071],[0074],[0075],[0081].	1-10,12,14-18,20-24,37,42-45
Y	WO 2005100573 A2 (WENZEL, et al.) 27.10.2005, resumen; reivindicaciones.	1,13,25-28,30-32,37,46-50
A	CRUZ-RAMIREZ, et al., Phospholipase D22 plays an important role in extraplastidic galactolipid biosynthesis and phosphate recycling in Arabidopsis roots. <i>Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America</i> . 2006. Vol nº17, páginas 6765-6770.	1-50
A	US 6096545 A (LEFEBVRE, et al.) 01.08.2000	1-50
A	US 20040261578 A1 (HARMAN, et al.) 30.12.2004	1-50

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
12.11.2012

Examinador
I. Rueda Molíns

Página
1/5

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: 12.11.2012

Declaración**Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)**

Reivindicaciones 1-50

Reivindicaciones

SI**NO****Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)**

Reivindicaciones 11, 19, 29, 33, 34, 35, 36

Reivindicaciones 1-10, 12-18, 20-28, 30-32, 37-50

SI**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.

OPINIÓN ESCRITA**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	US 20040091985 A1 (METCALF, et al.)	13.05.2004
D02	US 20060253920 A1 (WANG, et al.)	09.11.2006
D03	WO 2005100573 A2 (WENZEL, et al.)	27.10.2005
D04	CRUZ-RAMIREZ, et al., Phospholipase D Z2 plays an important role in extraplastidic galactolipid biosynthesis and phosphate recycling in Arabidopsis roots. <i>Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America</i> . Vol nº 17, páginas 6765-6770.	2006
D05	US 6096545 A (LEFEBVRE, et al.)	01.08.2000
D06	US 20040261578 A1 (HARMAN, et al.)	30.12.2004

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

En las reivindicaciones 1-10 y 12 de la solicitud de patente se reivindica un ácido nucleico que comprende un gen quimérico que incluye: a) una región codificante que codifica para un enzima fosfito deshidrogenasa, de origen bacteriano, con una secuencia SEQ ID NO:1, o una secuencia que presente un determinado porcentaje de identidad respecto a SEQ ID NO:1, y b) un promotor de transcripción, como puede ser el, 35S del virus del Mosaico de la Coliflor, o un promotor inducible mediante baja disponibilidad de fosfato, heterólogo respecto de la región codificante y funcional en plantas, hongos, o ambos. Dicho gen confiere a la célula transformada la capacidad para metabolizar fosfito, como fuente de fósforo, favoreciendo de este modo, el crecimiento de la célula sin una fuente externa de fosfato. El citado ácido nucleico, también podrá incluir un terminador de la transcripción. Dicho enzima, fosfito deshidrogenasa, tiene una secuencia de aminoácidos, que contiene una primera región con una secuencia que presenta similitud o identidad con la secuencia SEQ ID NO:15, una segunda región, que contiene similitud o identidad con la secuencia SEQ ID NO:16, y una tercera región, que contiene una secuencia que presenta similitud o identidad con la secuencia SEQ ID NO:19. Las reivindicaciones 14-18, 20-24, 42-45 reivindican una célula vegetal y una planta que contiene el enzima fosfito deshidrogenasa, y que es capaz de metabolizar fosfito e hipofosfito como fuente de fósforo. En las reivindicaciones 37-41 se reivindica un método para aislar las células transformadas y para obtener la planta transformada.

El documento D01 divulga, en los párrafos [0013], [0042], [0069], [0090] y [0096], una secuencia que, codifica para un enzima fosfito deshidrogenasa de origen bacteriano, identificada como secuencia SEQ ID NO:1. En el citado documento, D01, se divulga como dicha enzima es capaz de catalizar la oxidación del fosfito a fosfato, permitiendo de este modo, el crecimiento celular, en medios con fosfito o hipofosfito, pero sin ninguna fuente externa de fosfato.

La secuencia divulgada en el documento D01, SEQ ID NO:1, es idéntica a la secuencia reivindicada en la solicitud de patente, SEQ ID NO:1. La secuencia reivindicada presenta una primera región con una secuencia SEQ ID NO:15, que corresponde con los aminoácidos 148-157, de la secuencia SEQ ID NO:1 divulgada en el documento D01, una segunda región, que presenta similitud o identidad con la secuencia SEQ ID NO:16, que corresponde con los aminoácidos 227-242, de la secuencia SEQ ID NO:1 del documento D01, y una tercera región, que presenta similitud o identidad con la secuencia SEQ ID NO:19, que se corresponde con los aminoácidos 133-143, de la secuencia SEQ ID NO:1 divulgada en el documento D01.

En la solicitud de patente se reivindica una construcción que contiene la región codificante divulgada en el documento D01, unida a un promotor de transcripción, como el promotor 35S del virus del Mosaico de la Coliflor y un terminador de la transcripción. Además se reivindica una planta transformada con la citada construcción así como, un método para obtenerla. Este tipo de construcciones son ampliamente conocidas en el estado de la técnica, como también lo son los métodos, para obtener células vegetales y plantas transformadas, empleados en la solicitud de patente como se muestra por ejemplo, en los párrafos [0012], [0029], [0032], [0044], [0048], [0059], [0063], [0068], [0071], [0074], [0075], [0081] del documento D02.

Por tanto, teniendo en cuenta la información divulgada en los documentos D01 y D02, las reivindicaciones 1-10, 12, 14-18, 20-24, 37-45 presentan novedad, pero no actividad inventiva, según lo establecido en los Artículos 6 y 8 de la Ley de Patentes 11/1986.

En la reivindicación 13 se reivindica un promotor fúngico, para utilizarse en la región codificante SEQ ID NO:1. En las reivindicaciones 25-28, 30-32, 46-50 se reivindica una célula fúngica y un hongo perteneciente al género *Trichoderma*, o a cualquier otro género que comprenda hongos micorrícicos que expresa una enzima hipofosfito deshidrogenasa, capaz de metabolizar fosfito e hipofosfito como fuente de fósforo.

El documento D 03 divulga, en las reivindicaciones, un promotor fúngico empleado en las construcciones de proteínas heterólogas en células fúngicas pertenecientes al género *Trichoderma* o a la división Ascomycota (división que contiene hongos micorrícicos).

Por tanto, teniendo en cuenta la información divulgada en los documentos D01 y D03, las reivindicaciones 1, 13, 25-28, 30-32, 46-50 presentan novedad, pero no actividad inventiva, según lo establecido en los Artículos 6 y 8 de la Ley de Patentes 11/1986.