

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 562 129**

21 Número de solicitud: 201400945

51 Int. Cl.:

C12N 15/82

(2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

19.11.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

02.03.2016

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE MÁLAGA (100.0%)
Avda Cervantes, 2
29071 Málaga ES**

72 Inventor/es:

**CASTRO RODRÍGUEZ , Vanessa Viviana ;
CÁNOVAS RAMOS , Francisco Miguel ;
GARCÍA-GUTIÉRREZ FERNÁNDEZ , Ángel ;
ÁVILA SÁEZ , Concepción ;
CANALES CARRASCO , Javier y
CAÑAS PENDÓN , Rafael Antonio**

54 Título: **Árboles transgénicos con capacidad de asimilar altas concentraciones de nitrato y de acumular más biomasa en forma de celulosa, y procedimiento y usos asociados**

57 Resumen:

Árboles transgénicos con capacidad de asimilar altas concentraciones de nitrato y de acumular más biomasa en forma de celulosa, y procedimientos y usos asociados. La presente invención se refiere a árboles transgénicos que muestran capacidad de asimilar altas concentraciones de nitrato y de acumular más biomasa en forma de celulosa; panes de árboles, plántulas, tejidos, semillas, células, protoplastos y otros tipos de material de propagación transgénicos; procedimientos para la producción de árboles transgénicos que muestran capacidad de asimilar altas concentraciones de nitrato y de acumular más biomasa en forma de celulosa; así como procedimientos para modular la capacidad de asimilar altas concentraciones de nitrato y de acumular más biomasa en forma de celulosa en dichos árboles. La presente invención tiene su aplicación, entre otros, en fitorremediación de suelos y aguas, y en la obtención de biomasa para la producción de madera y/o papel, y/o para la producción de biocombustibles.

DESCRIPCIÓN

Árboles transgénicos con capacidad de asimilar altas concentraciones de nitrato y de acumular más biomasa en forma de celulosa, y procedimientos y usos asociados

SECTOR TÉCNICO

5

La presente invención se refiere a árboles transgénicos que muestran capacidad de asimilar altas concentraciones de nitrato y de acumular más biomasa en forma de celulosa; partes de árboles, plántulas, tejidos, semillas, células, protoplastos y otros tipos de material de propagación transgénicos; progenies, líneas celulares y clones obtenibles a partir de dichos árboles, partes de árboles, plántulas, semillas, células, protoplastos y otros tipos de material de propagación transgénicos; procedimientos para la producción tanto de dichos árboles, partes de árboles, plántulas, semillas, células, protoplastos y otros tipos de material de propagación transgénicos como de las progenies, líneas celulares y clones obtenibles a partir de dichos árboles, partes de árboles, plántulas, semillas, células, protoplastos y otros tipos de material de propagación transgénicos; así como procedimientos para modular la capacidad de asimilar altas concentraciones de nitrato y de acumular más biomasa en forma de celulosa tanto en dichos árboles, partes de árboles, plántulas, semillas, células, protoplastos y otros tipos de material de propagación transgénicos como en las progenies, líneas celulares y clones obtenibles a partir de dichos árboles, partes de árboles, plántulas, semillas, células, protoplastos y otros tipos de material de propagación transgénicos.

20

La presente invención tiene su aplicación, entre otros, en fitorremediación (descontaminación de suelos y depuración de aguas con altas concentraciones de nitrato) y en la industria dedicada al empleo de árboles para la obtención de biomasa principalmente para la producción de madera y papel, y/o para la producción de biocombustibles.

25

ESTADO DE LA TÉCNICA

30

Alrededor de 85-90 millones de toneladas métricas de fertilizantes nitrogenados son añadidos al suelo anualmente (Good *et al.*, *Trends Plant Sci* 9:597-605, 2004) sin embargo, es conocido que la capacidad de las plantas para aprovechar el N depende del ambiente, las especies y el suelo y más del 50% del N aportado por los fertilizantes no es asimilado por las plantas (Hodge *et al.*, *Trends Plant Sci* 7:304-308, 2000) lo que supone, un exceso de N que

se acumula en el suelo y generalmente por lixiviación, se filtra al subsuelo siendo arrastrado hacia los acuíferos, ríos, estuarios y embalses contaminando el agua y poniendo en inminente peligro el agua destinada para consumo humano y ganadero.

Con la finalidad de disminuir la contaminación por nitratos se ha desarrollado la
 5 Directiva 91/676/CEE que implica la descripción de áreas afectadas y las zonas potencialmente vulnerables, siguiendo la normativa del consejo de las comunidades europeas. Una zona susceptible de riesgo es aquella que supera o puede superar una concentración de nitratos de 50 mg/l. En España las zonas vulnerables se describen en la página web
 10 <http://servicios2.marm.es/sia/visualizacion/lda/protegidas/nitratos.jsp> del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Estos datos apuntan que en España, los esfuerzos para reducir la contaminación no son suficientes y que es necesario actuar preventivamente para que nuevas contaminaciones no se presenten en estas u otras áreas considerando que la red hidrogeológica facilita su propagación.

La fitorremediación es una técnica que utiliza la capacidad que tienen las plantas para
 15 absorber, asimilar, destoxificar, remover y metabolizar los contaminantes que están en el suelo mediante procesos naturales (Kelley *et al.*, *Chem Edu* 5:140-143, 2000; Cherian y Oliveira, *Environ Sci Tec* 39:9377-9390, 2005; Eapen *et al.*, *Environ Res* 91:127-133, 2003). Las plantas poseen sistemas de transporte que les permite asimilar los metabolitos y movilizarlo *in planta* hacia el tallo y las hojas donde posteriormente son o bien degradados o
 20 bien acumulados. Los principales agentes contaminantes susceptibles de remediar son los compuestos orgánicos naturales o sintéticos y los compuestos inorgánicos como metales pesados, nutrientes en exceso (N y P), isótopos radioactivos y otros elementos tóxicos.

Los organismos modificados genéticamente (OMG) juegan un papel muy importante en la fitorremediación ya que en los últimos años se han generado plantas con mayor
 25 capacidad de asimilación de metabolitos contaminantes mediante la alteración de genes implicados en su asimilación o en su degradación. Sin embargo, los transgénicos generados en especies modelo como arroz (*Oryza sativa*) (Kawagashi *et al.*, *Transgenic Res* 14:907-917, 2005; Kawagashi *et al.*, *J. Agri Food Chem* 54:2985-2991, 2006; Kawagashi *et al.*, *Biotech Adv* 25:75-85, 2007; Hirose *et al.*, *Plant Biotech* 22:89-96, 2005), tabaco (*Nicotiana tabacum*) (O'Keefe *et al.*, *J Plant Physiol* 105:473-824, 1994; Didierjean *et al.*, *J Plant Physiol* 130:179-189, 2002; Sonoki *et al.*, *Ap Micro Biotech* 67:138-142, 2005; Limura *et al.*, *Ap Micro Biotech* 59:246-451, 2002; Hannink *et al.*, *Nat Biotech* 19:1168-1172, 2001; Mena-

Benitez *et al.*, *Plant Physiol* 147:1192-1198, 2008) o tomate (*Lycopersicon esculentum*) (Oller *et al.*, *Plant Sci* 169:1102-1111, 2005) entre otros, tienen como desventaja la acumulación de elementos tóxicos en áreas como hojas y/o frutos y no pueden ser usados para el mercado alimenticio, lo que supone una competencia con los alimentos para consumo humano.

Los organismos que mejor se adaptan a estas condiciones sin tener ningún conflicto medioambiental son los árboles. Entre los modelos experimentales más usados para el mejoramiento genético en árboles, se encuentran los chopos, ya que tienen alta tasa de crecimiento, se pueden propagar de forma vegetativa y son utilizados como receptores de transgenes (Gallardo *et al.*, *Plant Physiol Biochem* 41:587-594, 2006). El chopo es un árbol de crecimiento rápido que presenta una serie de ventajas logísticas y beneficios económicos en relación a otros cultivos anuales que puedan ser utilizados con propósitos similares como los cereales. Una de esas ventajas es la flexibilidad en cuanto al tiempo de cosecha lo que permite reducir los costes de almacenamiento y las pérdidas por degradación del material asociadas con el almacenamiento de biomasa de cultivos recogidos en cosechas anuales. Otra importante ventaja es que no se trata de un cultivo de interés agroalimentario.

Entre los transgénicos de chopo cabe mencionar los que sobreexpresan la glutamina sintetasa (GS) de pino (Cantón *et al.*, *Plant Mol Biol* 22:819-828, 1993) que han sido estudiados previamente y los resultados muestran que tienen mayor crecimiento vegetativo (Gallardo *et al.*, *Planta* 210:19-26, 1999; Fu *et al.*, *Plant Cell Environ* 26:411-418, 2003; Jing *et al.*, *New Phytol* 164:137-145, 2004), mayor tasa fotosintética y fotorrespiratoria, mayor eficiencia de asimilación de N (El-Khatib *et al.*, *Tree Physiol* 24:729-736, 2004; Man *et al.*, *New Phytol* 167:31-39, 2005) y la composición de su madera posee características propicias para la producción de pulpa y papel (Coleman *et al.*, *Plant Biotech J* 10:883-889, 2012).

Estudios posteriores que se han llevado a cabo en estos transgénicos, y que se describen a continuación, han puesto de manifiesto que los chopos que sobreexpresan un gen de la glutamina sintetasa de pino (*GS1a*) asimilan sorprendentemente elevados niveles de nitrato y presentan altos contenidos de celulosa, mayores, a los observados anteriormente en otras condiciones experimentales. Por consiguiente, la investigación realizada permite generar usos adicionales en estos árboles transgénicos, como la fitorremediación de suelos o aguas

contaminados por nitratos y la producción de biomasa forestal con alto contenido en celulosa para aplicaciones en bioenergía.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LA INVENCION

5

A continuación se hace referencia a los diferentes objetos de la invención.

Es objeto de la presente invención proporcionar árboles, partes de árboles, plántulas, tejidos, semillas, células, protoplastos y otros tipos de material de propagación transgénicos que muestran parámetros fisiológicos mejorados y, en particular, muestran
10 capacidad de asimilar altas concentraciones de nitrato y de acumular más biomasa en forma de celulosa. Asimismo, es objeto de la presente invención proporcionar progenies, líneas celulares y clones obtenibles a partir de dichos árboles, partes de árboles, plántulas, semillas, células, protoplastos y otros tipos de material de propagación transgénicos.

Por otro lado, también es objeto de la presente invención proporcionar
15 procedimientos para la producción tanto de dichos árboles, partes de árboles, plántulas, semillas, células, protoplastos y otros tipos de material de propagación transgénicos como de las progenies, líneas celulares y clones obtenibles a partir de dichos árboles, partes de árboles, plántulas, semillas, células, protoplastos y otros tipos de material de propagación transgénicos. Asimismo, es objeto de la presente invención proporcionar procedimientos para
20 modular la capacidad de asimilar altas concentraciones de nitrato y de acumular más biomasa en forma de celulosa tanto en dichos árboles, partes de árboles, plántulas, semillas, células, protoplastos y otros tipos de material de propagación transgénicos como en las progenies, líneas celulares y clones obtenibles a partir de dichos árboles, partes de árboles, plántulas, semillas, células, protoplastos y otros tipos de material de propagación transgénicos.

También son objeto de la presente invención los usos tanto de dichos árboles, partes
25 de árboles, plántulas, semillas, células, protoplastos y otros tipos de material de propagación transgénicos como de las progenies, líneas celulares y clones obtenibles a partir de dichos árboles, partes de árboles, plántulas, semillas, células, protoplastos y otros tipos de material de propagación transgénicos. Particularmente son objeto de la presente invención los usos
30 tanto en fitorremediación y/o aprovechamiento de suelos y/o aguas que acumulan altas concentraciones de nitrato, como en la obtención de biomasa principalmente para la producción de madera y papel, y/o para la producción de biocombustibles.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Fotografía de chopos controles y transgénicos al finalizar el experimento con diferentes concentraciones de nitrato. Las plantas individuales se aclimataron bajo las mismas condiciones nutricionales durante 2 meses y a continuación se diferenciaron por su genotipo y se subdividieron en 2 grupos, un grupo se regó con una concentración de nitrato a 10 mM y al otro grupo con 50 mM durante 4 semanas. Las medidas del desarrollo vegetativo y la altura se describen en la Tabla 1: PF: Peso Fresco; PS: Peso seco.

Figura 2. Contenido de proteínas solubles y clorofilas a y b. En el esquema, la planta se divide en las secciones muestreadas: H1/T1 hoja y tallo respectivamente, de la parte superior; H2/T2 hoja y tallo de la parte intermedia; H3/T3 hoja y tallo de la parte inferior de la planta; R1 raíz principal y R2 raíz secundaria. En el histograma, se observa los individuos control y los transgénicos, las barras en blanco corresponden a las muestras de 10 mM, en negro las de 50 mM de nitrato y ND: no detectado. Las proteínas se cuantificaron mediante el protocolo descrito por Bradford (*Anal Biochem* 72:248-254, 1976) y las clorofilas se extrajeron con acetona 80% (v/v), las absorbancias se midieron a 664 y 647 nm y las concentraciones se determinaron mediante las ecuaciones descritas por Graan y Ort (*J Biol Chem* 259:14003-14010, 1984). Los datos de cada muestra han sido analizados a partir de al menos 3 individuos diferentes y el test estadístico ANOVA de dos factores y el test de Tukey con una significancia de $p < 0.001$ se han utilizado para determinar las diferencias entre las muestras.

Figura 3. Análisis de C, N e índice C/N porcentual de los plantas controles y transgénicos a diferentes concentraciones de nitrato. El cálculo de la eficiencia de asimilación del N (EAN) y el uso del N (EUN) han sido cuantificados como se describe en Moll y colaboradores (*J Agron* 74:562-564, 1982) y Olson y colaboradores (*J Soil Sci Soc Am* 48:583-586, 1984).

Figura 4. Determinación de los cambios en el transcriptoma de los árboles control y transgénicos como respuesta a la concentración de nitrato. Se ha calculado el logaritmo del cociente de los niveles de expresión entre los diferentes tratamientos de N. Los genes en rojo hacia arriba y hacia abajo de las líneas discontinuas, representan los genes que se

sobreexpresan (arriba) o se inhiben (abajo). El número de los genes con expresión diferencial en las diferentes condiciones experimentales se detallan en Tabla 2.

Figura 5. Niveles de carbohidratos y biopolímeros. La cuantificación de glucosa, fructosa y sacarosa se llevó a cabo en los individuos controles y transgénicos a 10 y 50 mM como se ha descrito en Sekin (*Tobacco Sci* 23:75-77, 1978), el almidón según Smith y Zeeman (*Nature Protocols* 1:1342-1345, 2006), la celulosa como se explica en Updegroff (*Anal Biochem* 32:420-424, 1969) y la lignina según Lange y colaboradores (*Plant Physiol* 108:1277-1287, 1995).

Figura 6. Estudio de los niveles de expresión de los genes de glutamina sintetasa *GS* endógenos de chopo y del gen *GS1a* del pino en las muestras de las plantas controles y transgénicos a diferentes concentraciones de nitrato. Los niveles relativos de expresión se determinaron utilizando los genes de referencia actina2 y ubiquitina y ND: describe las muestras en las que no se ha detectado expresión.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

A continuación se detallan los diferentes objetos de la invención descritos anteriormente, sin que el orden de exposición de los mismos, o de sus aspectos y/o de sus realizaciones preferidas, implique necesariamente que unos objetos sean más importantes que otros.

Son objeto de la invención (primer objeto):

- Árboles, partes de árboles, plántulas, tejidos, semillas, células, protoplastos y otros tipos de material de propagación transgénicos caracterizados por mostrar parámetros fisiológicos mejorados, en particular por mostrar capacidad de asimilar altas concentraciones de nitrato y de acumular más biomasa en forma de celulosa;
- Progenies, líneas celulares y clones obtenibles a partir de dichos árboles, partes de árboles, plántulas, semillas, células, protoplastos y otros tipos de material de propagación transgénicos.

Un aspecto de dicho primer objeto de la invención se refiere a:

- Árboles, partes de árboles, plántulas, tejidos, semillas, células, protoplastos y otros tipos de material de propagación transgénicos de especies angiospermas;

- Progenies, líneas celulares y clones obtenibles a partir de dichos árboles, partes de árboles, plántulas, semillas, células, protoplastos y otros tipos de material de propagación transgénicos de especies angiospermas.

5 Una realización preferente de dicho primer aspecto de dicho primer objeto de la invención se refiere a:

- Árboles, partes de árboles, plántulas, tejidos, semillas, células, protoplastos y otros tipos de material de propagación transgénicos del género *Populus*;
- Progenies, líneas celulares y clones obtenibles a partir de dichos árboles, partes de árboles, plántulas, semillas, células, protoplastos y otros tipos de material de propagación transgénicos del género *Populus*.

Una realización más preferente de dicho primer aspecto de dicho primer objeto de la invención se refiere a:

- Árboles, partes de árboles, plántulas, tejidos, semillas, células, protoplastos y otros tipos de material de propagación transgénicos de *Populus tremula x P. alba*;
- Progenies, líneas celulares y clones obtenibles a partir de dichos árboles, partes de árboles, plántulas, semillas, células, protoplastos y otros tipos de material de propagación transgénicos de *Populus tremula x P. alba*.

20 Una realización aún más preferente de dicho primer aspecto de dicho primer objeto de la invención se refiere a:

- Árboles, partes de árboles, plántulas, tejidos, semillas, células, protoplastos y otros tipos de material de propagación transgénicos de *Populus tremula x P. alba* clon INRA 7171-BA;
- Progenies, líneas celulares y clones obtenibles a partir de dichos árboles, partes de árboles, plántulas, semillas, células, protoplastos y otros tipos de material de propagación transgénicos de *Populus tremula x P. alba* clon INRA 7171-BA.

Un segundo aspecto de este primer objeto de la invención se refiere a árboles, plántulas, semillas, células, protoplastos, otros tipos de material de propagación transgénicos, progenies, líneas celulares y clones conforme al primer aspecto de dicho primer objeto, incluyendo sus realizaciones preferentes, que comprenden insertada funcionalmente en su genoma una secuencia de nucleótidos similar a una secuencia de nucleótidos que codifica una glutamina sintetasa, particularmente similar a una secuencia de nucleótidos que codifica una

glutamina sintetasa de una gimnosperma, más particularmente similar a una secuencia de nucleótidos que codifica una glutamina sintetasa del género *Pinus*, más particularmente aún similar a una secuencia de nucleótidos que codifica una glutamina sintetasa de la especie *Pinus sylvestris*, todavía más particularmente aún similar a la secuencia de nucleótidos que
5 codifica la glutamina sintetasa citosólica de pino GS1a (SEQ ID NO:1).

En una realización preferida de dicho segundo aspecto del primer objeto de la invención, la secuencia de nucleótidos insertada funcionalmente en el genoma tiene una identidad de al menos el 70% con respecto a una secuencia de nucleótidos que codifica una glutamina sintetasa, particularmente tiene una identidad de al menos el 70% con respecto a
10 una secuencia de nucleótidos que codifica una glutamina sintetasa de una gimnosperma, más particularmente tiene una identidad de al menos el 70% con respecto a una secuencia de nucleótidos que codifica una glutamina sintetasa del género *Pinus*, más particularmente aún tiene una identidad de al menos el 70% con respecto a una secuencia de nucleótidos que
15 codifica una glutamina sintetasa de la especie *Pinus sylvestris*, todavía más particularmente aún tiene una identidad de al menos el 70% con respecto a la secuencia de nucleótidos que codifica la glutamina sintetasa citosólica de pino GS1a (SEQ ID NO:1).

En una realización más preferida de dicho segundo aspecto del primer objeto de la invención, la secuencia de nucleótidos insertada funcionalmente en el genoma tiene una identidad de al menos el 80% con respecto a una secuencia de nucleótidos que codifica una
20 glutamina sintetasa, particularmente tiene una identidad de al menos el 80% con respecto a una secuencia de nucleótidos que codifica una glutamina sintetasa de una gimnosperma, más particularmente tiene una identidad de al menos el 80% con respecto a una secuencia de nucleótidos que codifica una glutamina sintetasa del género *Pinus*, más particularmente aún
25 tiene una identidad de al menos el 80% con respecto a una secuencia de nucleótidos que codifica una glutamina sintetasa de la especie *Pinus sylvestris*, todavía más particularmente aún tiene una identidad de al menos el 80% con respecto a la secuencia de nucleótidos que codifica la glutamina sintetasa citosólica de pino GS1a (SEQ ID NO:1).

En una realización aún más preferida de dicho segundo aspecto del primer objeto de la invención, la secuencia de nucleótidos insertada funcionalmente en el genoma tiene una
30 identidad de al menos el 90% con respecto a una secuencia de nucleótidos que codifica una glutamina sintetasa, particularmente tiene una identidad de al menos el 90% con respecto a una secuencia de nucleótidos que codifica una glutamina sintetasa de una gimnosperma, más

particularmente tiene una identidad de al menos el 90% con respecto a una secuencia de nucleótidos que codifica una glutamina sintetasa del género *Pinus*, más particularmente aún tiene una identidad de al menos el 90% con respecto a una secuencia de nucleótidos que codifica una glutamina sintetasa de la especie *Pinus sylvestris*, todavía más particularmente aún tiene una identidad de al menos el 90% con respecto a la secuencia de nucleótidos que codifica la glutamina sintetasa citosólica de pino GS1a (SEQ ID NO:1).

En una realización todavía más preferida aún de dicho segundo aspecto del primer objeto de la invención, la secuencia de nucleótidos insertada funcionalmente en el genoma es una secuencia de nucleótidos que codifica una glutamina sintetasa, particularmente es una secuencia de nucleótidos que codifica una glutamina sintetasa de una gimnosperma, más particularmente es una secuencia de nucleótidos que codifica una glutamina sintetasa del género *Pinus*, más particularmente aún es una secuencia de nucleótidos que codifica una glutamina sintetasa de la especie *Pinus sylvestris*, todavía más particularmente aún es la secuencia de nucleótidos que codifica la glutamina sintetasa citosólica de pino GS1a (SEQ ID NO:1).

Un tercer aspecto de este primer objeto de la invención se refiere a árboles, plántulas, semillas, células, protoplastos, otros tipos de material de propagación transgénicos, progenies, líneas celulares y clones conforme al primer aspecto de dicho primer objeto, incluyendo sus realizaciones preferentes, que comprenden insertada funcionalmente en su genoma una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína similar a una glutamina sintetasa, particularmente similar a una glutamina sintetasa de una gimnosperma, más particularmente similar a una glutamina sintetasa del género *Pinus*, más particularmente aún similar a una glutamina sintetasa de la especie *Pinus sylvestris*, todavía más particularmente aún similar a la glutamina sintetasa citosólica de pino GS1a (SEQ ID NO:2).

En una realización preferida de dicho tercer aspecto del primer objeto de la invención, la proteína codificada por la secuencia de nucleótidos insertada funcionalmente en el genoma tiene una identidad de al menos el 70% con respecto a una glutamina sintetasa, particularmente tiene una identidad de al menos el 70% con respecto a una glutamina sintetasa de una gimnosperma, más particularmente tiene una identidad de al menos el 70% con respecto a una glutamina sintetasa del género *Pinus*, más particularmente aún tiene una identidad de al menos el 70% con respecto a una glutamina sintetasa de la especie *Pinus*

sylvestris, todavía más particularmente aún tiene una identidad de al menos el 70% con respecto a la glutamina sintetasa citosólica de pino GS1a (SEQ ID NO:2).

En una realización más preferida de dicho tercer aspecto del primer objeto de la invención, la proteína codificada por la secuencia de nucleótidos insertada funcionalmente en el genoma tiene una identidad de al menos el 80% con respecto a una glutamina sintetasa, particularmente tiene una identidad de al menos el 80% con respecto a una glutamina sintetasa de una gimnosperma, más particularmente tiene una identidad de al menos el 80% con respecto a una glutamina sintetasa del género *Pinus*, más particularmente aún tiene una identidad de al menos el 80% con respecto a una glutamina sintetasa de la especie *Pinus sylvestris*, todavía más particularmente aún tiene una identidad de al menos el 80% con respecto a la glutamina sintetasa citosólica de pino GS1a (SEQ ID NO:2).

En una realización aún más preferida de dicho tercer aspecto del primer objeto de la invención, la proteína codificada por la secuencia de nucleótidos insertada funcionalmente en el genoma tiene una identidad de al menos el 90% con respecto a una glutamina sintetasa, particularmente tiene una identidad de al menos el 90% con respecto a una glutamina sintetasa de una gimnosperma, más particularmente tiene una identidad de al menos el 90% con respecto a una glutamina sintetasa del género *Pinus*, más particularmente aún tiene una identidad de al menos el 90% con respecto a una glutamina sintetasa de la especie *Pinus sylvestris*, todavía más particularmente aún tiene una identidad de al menos el 90% con respecto a la glutamina sintetasa citosólica de pino GS1a (SEQ ID NO:2).

En una realización todavía más preferida aún de dicho tercer aspecto del primer objeto de la invención, la proteína codificada por la secuencia de nucleótidos insertada funcionalmente en el genoma es una glutamina sintetasa, particularmente es una glutamina sintetasa de una gimnosperma, más particularmente es una glutamina sintetasa del género *Pinus*, más particularmente aún es una glutamina sintetasa de la especie *Pinus sylvestris*, todavía más particularmente aún es la glutamina sintetasa citosólica de pino GS1a (SEQ ID NO:2).

Un cuarto aspecto de este primer objeto de la invención se refiere a árboles, plántulas, semillas, células, protoplastos, otros tipos de material de propagación transgénicos, progenies, líneas celulares y clones que comprenden insertada funcionalmente en su genoma una secuencia de nucleótidos conforme al segundo o tercer aspectos, incluyendo sus realizaciones preferentes, ligada a promotor constitutivo que permite la sobreexpresión de la proteína

codificada por dicha secuencia de nucleótidos. El promotor puede ser, por ejemplo y sin carácter limitativo, el promotor CaMV 35S, el promotor FMV (*figwort mosaic virus*) 35S, el promotor de la T-DNA manopina sintetasa, el promotor de la nopalina sintasa, o el promotor de la octopina sintasa. En una realización preferida de dicho cuarto aspecto del primer objeto de la invención el promotor es el promotor CaMV 35S. En una realización aún más preferida dicha secuencia de nucleótidos ligada a dicho promotor constitutivo están comprendidos en un *cassette* de expresión. En una realización todavía más preferida dicho *cassette* de expresión está comprendido en un vector de expresión.

Un quinto aspecto de este primer objeto de la invención, incluyendo los aspectos primero a cuarto así como sus realizaciones preferidas, se refiere a árboles, plántulas, semillas, células, protoplastos y otros tipos de material de propagación transgénicos obtenibles a partir de los referidos progenies, líneas celulares y clones; así como a progenies, líneas celulares y clones obtenibles a partir de los mismos.

También son objeto de la invención (segundo objeto):

- Procedimientos para la producción de los árboles, partes de árboles, plántulas, semillas, células, protoplastos y otros tipos de material de propagación transgénicos que constituyen el primer objeto de la invención, incluidos los aspectos y realizaciones preferentes de dicho primer objeto;
- Procedimientos para la producción de las progenies, líneas celulares y clones obtenibles a partir de los árboles, partes de árboles, plántulas, semillas, células, protoplastos y otros tipos de material de propagación transgénicos que constituyen el primer objeto de la invención, incluidas las realizaciones preferentes de dicho primer objeto, dichos progenies, líneas celulares y clones también constituyentes del primer objeto de la invención, incluidos los aspectos y realizaciones preferentes de dicho primer objeto.
- Procedimientos para la producción de árboles, partes de árboles, plántulas, semillas, células, protoplastos y otros tipos de material de propagación transgénicos a partir de las progenies, líneas celulares y clones fruto de los procedimientos del párrafo anterior y constituyentes del primer objeto de la invención, incluidos los aspectos y realizaciones preferentes de dicho primer objeto.

- Procedimientos para la producción de progenies, líneas celulares y clones a partir de árboles, plántulas, semillas, células, protoplastos y otros tipos de material de propagación transgénicos fruto de los procedimientos del párrafo anterior.

5 En una realización preferente dichos procedimientos de producción comprenden la transformación genética estable con una secuencia nucleotídica tal como una secuencia nucleotídica conforme a la referida en los aspectos segundo a cuarto del primer objeto de la invención. La técnica de transformación genética puede ser, por ejemplo y sin carácter limitativo, transformación mediante *Agrobacterium tumefaciens*, transformación mediante
10 *Agrobacterium rhizogenes*, electroporación, o mediante bombardeo de partículas o microproyectiles. En una realización más preferente, la técnica de transformación es transformación mediante *Agrobacterium tumefaciens*.

Asimismo, son objeto de la presente invención (tercer objeto):

- Procedimientos para modular la capacidad de asimilar altas concentraciones de
15 nitrato y de acumular más biomasa en forma de celulosa en los árboles, partes de árboles, plántulas, semillas, células, protoplastos y otros tipos de material de propagación transgénicos que constituyen el primer objeto de la invención, incluidos los aspectos y realizaciones preferentes de dicho primer objeto;
- Procedimientos para modular la capacidad de asimilar altas concentraciones de
20 nitrato y de acumular más biomasa en forma de celulosa en las progenies, líneas celulares y clones obtenibles a partir de los árboles, partes de árboles, plántulas, semillas, células, protoplastos y otros tipos de material de propagación transgénicos que constituyen el primer objeto de la invención, incluidos los aspectos y realizaciones preferentes de dicho primer objeto,
25 dichos progenies, líneas celulares y clones también constituyentes del primer objeto de la invención, incluidos los aspectos y realizaciones preferentes de dicho primer objeto;
- Procedimientos para modular la capacidad de asimilar altas concentraciones de
30 nitrato y de acumular más biomasa en forma de celulosa en los árboles, plántulas, semillas, células, protoplastos y otros tipos de material de propagación transgénicos obtenibles a partir de las progenies, líneas celulares y clones referidos en el párrafo inmediatamente anterior y constituyentes del

primer objeto de la invención, incluidos los aspectos y realizaciones preferentes de dicho primer objeto;

- Procedimientos para modular la capacidad de asimilar altas concentraciones de nitrato y de acumular más biomasa en forma de celulosa en las progenies, líneas celulares y clones obtenibles a partir de árboles, plántulas, semillas, células, protoplastos y otros tipos de material de propagación transgénicos referidos en el párrafo inmediatamente anterior;
- Procedimientos para modular la capacidad de asimilar altas concentraciones de nitrato y de acumular más biomasa en forma de celulosa en árboles, plántulas, semillas, células, protoplastos, otros tipos de material de propagación transgénicos, progenies, líneas celulares y clones resultantes de los procedimientos que constituyen el segundo objeto de la invención, incluidos los aspectos y realizaciones preferentes de dicho segundo objeto.

En una realización preferente de este tercer objeto de la invención dichos procedimientos comprenden la modulación de la expresión uno o más de uno de los genes que se expresan de forma diferencial en árboles, partes de árboles, plántulas, semillas, células, protoplastos, otros tipos de material de propagación transgénicos, progenies, líneas celulares y clones constituyentes del primer objeto de la invención, incluidos los aspectos y realizaciones preferentes de dicho primer objeto. En una realización más preferente, dichos procedimientos de modulación comprenden el uso de promotores genéticos que muestran especificidad bien a nivel de fase de desarrollo, bien a nivel de tejido, bien a nivel de orgánulo. Dichos promotores pueden ser, por ejemplo y sin carácter limitativo, el promotor de la subunidad pequeña de la RuBisCo, el promotor de la subunidad grande de la RuBisCo, el promotor de la CAB (*chlorophyll a/b binding protein*), el promotor de una proteína de almacenamiento en semilla, el promotor de la glutamina sintetasa específica de raíz, o el promotor de la proteína D1. En una realización aún más preferente, dichos promotores genéticos son inducibles. En una realización todavía más preferente aún, dicho promotor está comprendido en un *cassette* de expresión. En una realización todavía más preferente aún, dicho *cassette* de expresión está comprendido en un vector de expresión.

En otra realización preferente de este tercer objeto de la invención dichos procedimientos comprenden la modulación de la expresión de uno o más de dichos genes expresados de forma diferencial en árboles, partes de árboles, plántulas, semillas, células,

protoplastos, otros tipos de material de propagación transgénicos, progenies, líneas celulares y clones resultantes de los procedimientos que constituyen el segundo objeto de la invención, incluidos los aspectos y realizaciones preferentes de dicho segundo objeto. En una realización más preferente, dichos procedimientos de modulación comprenden el uso de promotores genéticos que muestran especificidad bien a nivel de fase de desarrollo, bien a nivel de tejido, bien a nivel de orgánulo. Dichos promotores pueden ser, por ejemplo y sin carácter limitativo, el promotor de la subunidad pequeña de la RuBisCo, el promotor de la subunidad grande de la RuBisCo, el promotor de la CAB (*chlorophyll a/b binding protein*), el promotor de una proteína de almacenamiento en semilla, el promotor de la glutamina sintetasa específica de raíz, o el promotor de la proteína D1. En una realización aún más preferente, dichos promotores genéticos son inducibles. En una realización todavía más preferente aún, dicho promotor está comprendido en un *cassette* de expresión. En una realización todavía más preferente aún, dicho *cassette* de expresión está comprendido en un vector de expresión.

También son objeto de la presente invención (cuarto objeto) los usos tanto de árboles, partes de árboles, plántulas, semillas, células, protoplastos, otros tipos de material de propagación transgénicos, progenies, líneas celulares y clones constituyentes del primer objeto de la invención, incluidos los aspectos y realizaciones preferentes de dicho primer objeto; como de árboles, partes de árboles, plántulas, semillas, células, protoplastos, otros tipos de material de propagación transgénicos, progenies, líneas celulares y clones resultantes de los procedimientos que constituyen el segundo objeto de la invención, incluidos los aspectos y realizaciones preferentes de dicho segundo objeto. Particularmente son objeto de la presente invención los usos tanto en fitorremediación y/o aprovechamiento de suelos y/o aguas que acumulan altas concentraciones de nitrato, o de zonas vulnerables a nitrato o a contaminantes asociados con nitrato o con el nitrógeno en general; como en la obtención de biomasa principalmente para la producción de madera y papel, y/o para la producción de biocombustibles.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

MODOS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

La constitución y características de la invención se comprenderán mejor con ayuda de la
5 siguiente descripción de ejemplos de realización, debiendo entenderse que la invención no
queda limitada a estas realizaciones, sino que la protección abarca todas aquellas
realizaciones alternativas que puedan incluirse dentro del contenido y del alcance de las
reivindicaciones. Asimismo, el presente documento refiere diversos documentos como estado
de la técnica, entendiéndose incorporado por referencia el contenido de todos estos
10 documentos, así como de el contenido completo de los documentos a su vez referidos en
dichos documentos, con objeto de ofrecer una descripción lo más completa posible del estado
de la técnica en el que la presente invención se encuadra. La terminología utilizada a
continuación tiene por objeto la descripción de los ejemplos de modos de realización que
siguen y no debe ser interpretada de forma limitante o restrictiva.

15 En el presente ejemplo de realización de la invención se describe, a título ilustrativo de
la misma, el empleo de chopos transgénicos para la descontaminación de suelos y la
depuración de aguas mediante su uso en fitorremediación. Las plantas transgénicas tratadas
con exceso de nitrato presentan: Mayor acumulación de N en hojas y tallos jóvenes en forma
de compuestos nitrogenados como proteínas y clorofila a y b (Figura 2) significativamente
20 diferentes al resto de secciones de la planta y de las plantas control (no transgénicas).

Los estudios de crecimiento de los árboles transgénicos con alta concentración de
nitrato indican una mayor producción vegetal en comparación con chopos transgénicos
cultivados a concentración menor de nitrato (10 mM) y en relación a los chopos que no
contienen el transgén. Los árboles transgénicos cultivados a 50 mM de nitrato tienen mayor
25 crecimiento en altura y mayor biomasa global que se acumula de forma preferente en la
sección aérea juvenil de estas plantas transgénicas. En cambio, los árboles control que no
expresan el transgén, no muestran cambios significativos en biomasa en respuesta a los
tratamientos nitrogenados (Figura 1 y Tabla 1).

Muestra	Nitrato (mM)	Control			Transgénico		
		Longitud (cm)	PF (g)	PS (g)	Longitud (cm)	PF (g)	PS (g)
Sección aérea	10	31.84 ± 0.70	5.40 ± 0.12	2.28 ± 0.07	39.16 ± 1.03	7.61 ± 0.19	3.10 ± 0.10
Raíz principal			2.10 ± 0.28	0.78 ± 0.10		2.36 ± 0.98	1.04 ± 0.43
Raíz secundaria			6.32 ± 1.47	1.33 ± 0.42		4.72 ± 0.97	1.50 ± 0.59
Sección aérea	50	51.62 ± 1.09	10.02 ± 0.30	3.51 ± 0.16	63.63 ± 1.20	22.35 ± 1.12	3.92 ± 0.27
Raíz principal			3.78 ± 0.65	0.82 ± 0.30		4.00 ± 0.82	1.71 ± 0.50
Raíz secundaria			5.31 ± 0.44	1.12 ± 0.50		6.23 ± 1.44	1.54 ± 0.46

Tabla 1. Características fenotípicas de los árboles de chopo control (Control) y transgénico (Transgénicos) tratadas con 10 y 50 mM de nitrato. Altura de la parte aérea, longitud de la raíz principal y las raíces secundarias y cuantificación en gramos de peso fresco (PF) y peso seco (PS) de cada una de las secciones. Para cada tratamiento y genotipo fueron utilizados 12 plantas y para los análisis estadísticos fue utilizado el promedio aritmético y la desviación estándar de los datos.

El contenido de N y C de los individuos transgénicos tratados con exceso de nitrato se mantiene en equilibrio gracias a que las plantas transgénicas asimilan (EAN) y usan (EUN) el N en exceso de manera eficiente y lo movilizan a las partes juveniles de la planta. De igual forma, las plantas transgénicas fijan mayor cantidad de carbono en estas áreas y mantienen el índice C/N sin diferencias significativas con el resto de plantas del estudio (Figura 3). En cambio, los árboles control, que no expresan el transgén, no son capaces de asimilar el N en exceso y sus niveles de carbono permanecen bajos y significativamente diferentes a los observados en los transgénicos.

Con objeto de comprender la base molecular de las diferencias observadas se han realizado estudios de transcriptómica. Un total de 1345 genes se expresan diferencialmente entre los chopos controles y transgénicos a alta concentración de N, 855 genes se activan y 490 genes se inhiben mientras que solo 626 genes se expresan diferencialmente cuando las plantas se cultivan con suministro óptimo de nitrato. Cuando se compara el efecto del N entre los individuos cultivados a 10 y 50 mM de nitrato, 827 genes se activan y 411 se reprimen en los transgénicos. En cambio, solo 481 genes totales se expresaron diferencialmente en los árboles control, 311 se activaron y 170 se reprimieron (Figura 4 y Tabla 2).

Condición experimental	Total	Activados	Reprimidos
10 mM vs 50 mM Control	481	311	170
10 mM vs 50 mM Transgénicos	1238	827	411
50 mM Control vs 50 mM Transgénicos	1345	855	490
10 mM Control vs 10 mM Transgénicos	626	235	391

Tabla 2. Cuantificación del número total de genes que se expresan diferencialmente detallando los que se activan y se reprimen en los micromatrices. Comparaciones entre individuos control y transgénico en las dos condiciones experimentales de nitrato.

- 5 Entre las rutas metabólicas que se ven activadas en los chopos transgénicos como respuesta al exceso de nitrato se encuentran el metabolismo secundario, la formación de fenilpropanoides, terpenos y flavonoides, parte de la ruta de la síntesis de la pared celular y los genes implicados en las reacciones de la fotosíntesis y el metabolismo del carbono. También se observa activada la respuesta a estímulos bióticos y abióticos aunque parece
- 10 inducirse/inhibirse en ambas condiciones por igual (10 y 50 mM de nitrato). Los árboles control tratados con exceso de nitrato tienen activados los genes implicados en la formación de lípidos y de la pared celular, así como la formación de flavonoides, sin embargo el número de genes diferencialmente expresados es menor comparado con el de los transgénicos. Los genes de señalización implicados en la respuesta a estrés están representados solo a alto N,
- 15 especialmente, las proteínas de defensa entre las que se encuentran, las proteínas PR (Pathogenesis Related) que pertenecen a la familia de proteínas “inducibles por estrés”. Estos resultados sugieren que las plantas control están en una situación importante de estrés cuando se cultivan en exceso de nitrato. Es interesante señalar que los genes que codifican histonas se reprimen a 50 mM de nitrato en los controles, y posiblemente esta sea la razón por la cual el
- 20 perfil transcripcional no manifiesta grandes cambios ya que las histonas facilitan la activación o como es el caso, la represión del control transcripcional (Jenuwein *et al.*, *Science* 293:1074–1080, 2001). También es posible que el efecto de la respuesta al estrés abiótico esté modulado por la modificación postranscripcional de las histonas (Kim *et al.*, *Plant Cell Environ* 33:604–611, 2010).
- 25 El contenido de glucosa, fructosa, sacarosa y almidón se ve diferencialmente representado en los chopos transgénicos, acumulándose estos azúcares principalmente en la sección aérea juvenil de la planta excepto el almidón, que se detecta en las raíces secundarias. La celulosa se acumula hasta 5 veces más en los árboles transgénicos a 50 mM de nitrato que a 10 mM y que en árboles control, especialmente en el tallo (T1) y en las hojas (H1). Estos
- 30 resultados tienen relación con los altos niveles de C total detectados en la parte juvenil de los transgénicos a alto N, así como con la activación de genes del metabolismo del carbono en estas plantas. La lignina por su parte está mayoritariamente representada en la sección intermedia y basal de las plantas transgénicas a 50 mM de nitrato (T2 y T3), así como en la raíz. Estos resultados sugieren que la biomasa acumulada en los transgénicos con alto N en la

parte apical se sustenta con mayor cantidad de lignina en la sección basal de la planta (Figura 5).

El análisis de los niveles de expresión de la familia de genes *GS* de chopo y del transgén (*GS1a*) ha permitido observar que el isógeno *PtGS1.1* se induce en los controles a alta
 5 concentración de nitrato, especialmente en las hojas más jóvenes, lo que no se observa en los transgénicos. *PtGS1.2* se expresa preferencialmente en las raíces de las plantas transgénicas a 10 mM y *PtGS1.3* se expresa mayoritariamente en el tallo de los árboles transgénicos a 50 mM. El transgén muestra diferentes niveles de expresión con mayor abundancia de los mensajeros en las hojas. En general, los niveles de los transcritos de *GS* en los transgénicos
 10 no son muy diferentes a los perfiles detectados en las plantas control, muy posiblemente esto se deba a la presencia del transgén que permite una mayor asimilación del N en comparación a los controles. Una excepción es *PtGS1.1* que parece desempeñar un papel importante en el reciclaje de N en las hojas jóvenes. Es interesante señalar que los niveles del transgén son mayoritarios en las hojas, muy posiblemente por la mayor disponibilidad de N en esta parte
 15 de la planta (Figura 6).

Material y métodos

En el ejemplo de realización descrito se ha utilizado un clon híbrido de chopo control (no transformado) (*Populus tremula* x *P. alba* clon INRA 7171-BA) y una línea transgénica del
 20 clon híbrido de chopo que sobreexpresa la glutamina sintetasa citosólica de pino (*GS1a*) bajo el control del promotor del gen 35S del virus de mosaico de la coliflor (CaMV 35S). Este modelo experimental han sido seleccionado por su capacidad de crecimiento y regeneración en cultivo *in vitro* (Leple *et al.*, *Plant Cell Rep* 11:137-141, 1992). Las plantas se
 25 mantuvieron en cámaras con un fotoperiodo de 16 h de luz con intensidad lumínica de 295 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura constante de 24 °C y humedad al 80%. Se sembraron en sustrato universal y vermiculita (1:1) y se regaron con agua destilada suplementada con macro y micronutrientes para crecimiento óptimo (González, *Tesis doctoral Universidad Autónoma de Madrid*, 1996). Después de 8 semanas, las plantas que tenían aspecto uniforme se dividieron
 30 por su genotipo: chopos controles y chopos transgénicos (24 individuos por cada genotipo) y cada grupo de plantas se subdividieron al azar en 2 grupos, un grupo se regó con la solución nutritiva enriquecida con 10 mM de nitrato (óptimo nitrato) y el otro grupo con 50 mM de

nitrate (excess of nitrate). The plants were watered with this nutritive solution once a week by inundation, during a total of 4 weeks.

The growth measurements were carried out taking into account the height of the plants (12 plants per treatment). Each plant was divided into 3 sections: Aerial section, main root and secondary roots. The fresh weight was measured from the average weight of the leaves and stem of the aerial section, main root and lateral roots, and then these sections were left in an oven at 70 °C for 48 hours and afterwards, the dry weight of the samples was measured.

For the following measurements the samples were divided into the following sections: The aerial section was divided into 3 parts. 1, the region corresponding to the most apical leaves 1^a, 2^a, 3^a, 4^a and 5^a; 2, the intermediate region comprised by the leaves 6^a, 7^a, 8^a, 9^a and 10^a and 3, the most basal region with the leaves 11^a, 12^a, 13^a, 14^a and 15^a; within each section they differentiated: H, leaf blade and T, stem. The third part, not aerial, was divided into: R1, main root and R2, secondary root. The samples were collected and cryopreserved using liquid nitrogen and afterwards they were stored at -80°C.

The extraction of the proteins was carried out with mortar in the presence of 1 g of tissue, 1 g of fine sand and 1 ml of extraction buffer (0.175 M Tris pH 8.8, 0.1% of SDS, 15% glycerol, 0.3 M mercaptoethanol) described by Castro-Rodríguez *et al.* (*BMC Plant Biology* 11:119, 2011). The extract was homogenized and centrifuged at 10,000 g, 4°C for 30 min and the supernatants were used for the determination of soluble proteins by the Bradford assay (*Anal Biochem* 72:248-254, 1976). The total chlorophyll analysis was carried out from the pulverized tissue with liquid nitrogen and dissolved in 80% (v/v) of acetone, after centrifuging at 15,000 g for 10 min, the absorbances at 664 and 647 nm in the supernatant were determined (Graan and Ort *J Biol Chem* 259:14003-14010, 1984).

The determination of total C and total N was carried out from 0.1 g of tissue pulverized and dried in an oven at 70 °C for 48 hours. The percentages of N (%) and C (%) of the samples in triplicate were analyzed in the Atomic Spectrometry Unit of the University of Málaga using the elemental analyzer 2400 CHN (PERKIN-ELMER). The calculation of the nitrogen assimilation efficiency (EAN) and the use of nitrogen (EUN) have been determined by the equations described by Moll and collaborators (*J Agron* 74:562-564, 1982) and Olson and collaborators (*J Soil Sci Soc Am* 48:583-586, 1984).

La extracción de azúcares se realizó a partir de 0.1 g de tejido homogenizado con N líquido, se mezcló con etanol 80% (v/v) y se incubó a 80°C durante 30 min. A continuación se centrifugó 13.500 g durante 15 min. El precipitado se dejó en la estufa a 70°C durante 24 horas para hacer la extracción de almidón y el sobrenadante se lavó 2 veces seguidas con etanol 50% (v/v) y se incubó a 80°C durante 20 min, a continuación se concentró para medir 5 enzimáticamente la sacarosa, glucosa y fructosa mediante la reducción de NADP a 340 nm después de la adición sucesiva de glucosa-6-P-deshidrogenasa, hexoquinasa, fosfoglucoisomerasa e invertasa (Sekin, *Tobacco Sci.* 23:75-77, 1978). Al precipitado se le añadió agua destilada, se calentó a 100 °C durante 10 min, se le añadió acetato sódico 200 mM y a 10 continuación se digirió con amiloglucosidasa y amilasa a 37°C durante 4 horas. Se concentró la muestra y se midió indirectamente el almidón mediante la reacción enzimática de la enzima glucosa-6-P-deshidrogenasa determinando los niveles de glucosa en la muestra (Smith y Zeeman, *Nature Protocols* 1:1342-1345, 2006).

La celulosa se extrajo a partir de 0.1 g de tejido vegetal mezclado con ácido acético 15 80% (v/v)/ácido nítrico concentrado (10:1), se incubó a 100°C durante 30 min y se centrifugó a 4500 g durante 20 min. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se lavó con agua destilada seguido de lavados con ácido sulfúrico y agua destilada. A continuación se centrifugó, el precipitado se homogenizó con antrona y agua (2:1), se calentó a 100 °C durante 10 min y se midió la absorbancia a 630 nm. La concentración de celulosa se 20 determinó colorimétricamente y la recta patrón se llevó a cabo a partir de concentraciones seriadas de celulosa comercial (Sigma-Aldrich) como describe Updegroff (*Anal Biochem* 32:420-424, 1969).

La cuantificación de lignina se llevó a cabo a partir de la extracción de la pared celular de las muestras. Se pesaron 0.3 g de tejido macerado y a continuación se añadió metanol 25 dejando la mezcla en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente, se centrifugó a 7520 g durante 5 min y se hicieron lavados seriados con metanol (2 veces), cloruro sódico 1M, SDS 1% (p/v), agua destilada (2 veces), etanol, cloroformo/metanol (1:1) y tert-butil metil éter. Se dejaron las muestras liofilizando durante 16 horas y a continuación se cuantificó la lignina mediante el método de tioacidolisis descrito por Lange y colaboradores (*Plant Physiol* 30 108:1277-1287, 1995).

La extracción de RNA de las muestras, síntesis de cDNA y cuantificación de los transcritos de *GS* endógena de chopo y *GS1a* de pino se llevó a cabo como se describe en Castro-Rodríguez *et al.* (*BMC Plant Biology* 11:119, 2011).

5 Los cambios de expresión del transcriptoma de los chopos control y transgénico debido a la alta concentración de nitrato se determinó mediante la hibridación de micromatrices (Agilent Technologies Genomics, USA) en muestras de hojas (H1) de 4 condiciones experimentales (10 frente a 50 mM Control; 10 frente a 50 mM Transgénicos; 10 mM Control frente a 10 mM Transgénicos y 50 mM Control frente a 50 mM Transgénicos). Los perfiles de expresión para cada tratamiento han sido visualizados en diagramas de
10 dispersión. Los cambios generales de los genes implicados en rutas del metabolismo de plantas o como respuesta a estrés han sido representados mediante la herramienta de Mapman (Thimm *et al.*, *Plant J* 37:914-939, 2004). Estos perfiles transcripcionales han permitido analizar la expresión coordinada de gran número de genes de manera diferencial y han descrito las rutas o parte de las rutas que están activadas o reprimidas en las diferentes
15 condiciones experimentales. La herramienta puede usarse como una aplicación en la web o descargada en el ordenador desde <http://gabi.rzpd.de/projects/Mapman/>.

Para los análisis estadísticos se han utilizados diferentes aplicaciones software, entre las que se incluyen Excel (Office 2013, Microsoft Corp. USA) para las medidas de promedios aritméticos y las desviaciones estándar y el lenguaje estadístico de programación “R” para el
20 análisis de la varianza, ANOVA de dos factores así como el test de comparaciones múltiples de Tukey con una significancia de $p < 0.001$ y la identificación de los grupos homogéneos significativamente diferentes.

REIVINDICACIONES

1. Árboles transgénicos con capacidad de asimilar altas concentraciones de nitrato y de acumular más biomasa en forma de celulosa caracterizados por comprender funcionalmente en su genoma una secuencia de nucleótidos que codifica la glutamina sintetasa citosólica de pino GS1a que se selecciona entre las siguientes:
 - a. una secuencia de nucleótidos consistente en SEQ ID NO:1;
 - b. una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos consistente en SEQ ID NO:2.
2. Árboles transgénicos según la reivindicación anterior caracterizados por comprender funcionalmente en su genoma una secuencia de nucleótidos que codifica la glutamina sintetasa citosólica de pino GS1a, dicha secuencia de nucleótidos consistente en SEQ ID NO:1.
3. Árboles transgénicos según la reivindicación 1 caracterizados por comprender funcionalmente en su genoma una secuencia de nucleótidos que codifica la glutamina sintetasa citosólica de pino GS1a de secuencia de aminoácidos consistente en SEQ ID NO:2.
4. Árboles transgénicos según la reivindicación 2 caracterizados por que la secuencia de nucleótidos introducida funcionalmente está ligada a un promotor constitutivo que permite la sobreexpresión de la proteína codificada por dicha secuencia de nucleótidos, como por ejemplo el promotor CaMV 35S, el promotor FMV (*figwort mosaic virus*) 35S, el promotor de la T-DNA manopina sintetasa, el promotor de la nopalina sintasa, o el promotor de la octopina sintasa.
5. Árboles transgénicos según la reivindicación anterior caracterizados por que el promotor es el promotor CaMV 35S.
6. Árboles transgénicos según cualquiera de las reivindicaciones 4 ó 5 caracterizados por que la secuencia de nucleótidos ligada a dicho promotor están comprendidos en un *cassette* de expresión.
7. Árboles transgénicos según la reivindicación anterior caracterizados por que el *cassette* de expresión está comprendido en un vector de expresión.
8. Árboles transgénicos según la reivindicación 3 caracterizados por que la secuencia de nucleótidos introducida funcionalmente está ligada a un promotor constitutivo que

permite la sobreexpresión de la proteína codificada por dicha secuencia de nucleótidos, como por ejemplo el promotor CaMV 35S, el promotor FMV (*figwort mosaic virus*) 35S, el promotor de la T-DNA manopina sintetasa, el promotor de la nopalina sintasa, o el promotor de la octopina sintasa.

- 5 9. Árboles transgénicos según la reivindicación anterior caracterizados por que el promotor es el promotor CaMV 35S.
- 10 10. Árboles transgénicos según cualquiera de las reivindicaciones 8 ó 9 caracterizados por que la secuencia de nucleótidos ligada a dicho promotor están comprendidos en un *cassette* de expresión.
- 10 11. Árboles transgénicos según la reivindicación anterior caracterizados por que el *cassette* de expresión está comprendido en un vector de expresión.
12. Árboles transgénicos según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizados por que son angiospermas.
- 15 13. Árboles transgénicos según la reivindicación anterior caracterizados por que son del género *Populus*.
14. Árboles transgénicos según la reivindicación anterior caracterizados por que son *Populus tremula x Populus alba*.
15. Árboles transgénicos según la reivindicación anterior caracterizados por que son *Populus tremula x P. alba* clon INRA 7171-BA.
- 20 16. Parte de un árbol obtenida de un árbol transgénico conforme cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
17. Plántula obtenida de un árbol transgénico conforme cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.
18. Tejido obtenido de un árbol transgénico conforme cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.
- 25 19. Semilla obtenida de un árbol transgénico conforme cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.
20. Célula obtenida de un árbol transgénico conforme cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.
- 30 21. Protoplasto obtenido de una célula conforme a la reivindicación anterior.

22. Material de propagación obtenido de un árbol transgénico conforme cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, dicho material distinto de los materiales conforme a las reivindicaciones 16 a 21.
- 5 23. Método de producción de árboles transgénicos con capacidad de asimilar altas concentraciones de nitrato y de acumular más biomasa en forma de celulosa caracterizado por que comprende la introducción funcional mediante transformación genética de una secuencia de nucleótidos que codifica la glutamina sintetasa citosólica de pino GS1a que se selecciona entre las siguientes:
 - a. una secuencia de nucleótidos consistente en SEQ ID NO:1;
 - 10 b. una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos consistente en SEQ ID NO:2.
- 15 24. Método de producción de árboles transgénicos según la reivindicación anterior caracterizado por que comprende la introducción funcional mediante transformación genética de una secuencia de nucleótidos que codifica la glutamina sintetasa citosólica de pino GS1a, dicha secuencia de nucleótidos consistente en SEQ ID NO:1..
- 25 25. Método de producción de árboles transgénicos según la reivindicación 23 caracterizado por que comprende la introducción funcional mediante transformación genética de una secuencia de nucleótidos que codifica la glutamina sintetasa citosólica de pino GS1a de secuencia de aminoácidos consistente en SEQ ID NO:2.
- 20 26. Método de producción de árboles transgénicos según la reivindicación 24 caracterizado por que la secuencia de nucleótidos introducida funcionalmente está ligada a un promotor constitutivo que permite la sobreexpresión de la proteína codificada por dicha secuencia de nucleótidos, como por ejemplo el promotor CaMV 35S, el promotor FMV (*figwort mosaic virus*) 35S, el promotor de la T-DNA manopina sintetasa, el promotor de la nopalina sintasa, o el promotor de la octopina sintasa.
- 25 27. Método de producción de árboles transgénicos según la reivindicación anterior caracterizado por que el promotor es el promotor CaMV 35S.
- 30 28. Método de producción de árboles transgénicos según cualquiera de las reivindicaciones 26 ó 27 caracterizado por que la secuencia de nucleótidos ligada a dicho promotor están comprendidos en un *cassette* de expresión.

29. Método de producción de árboles transgénicos según la reivindicación anterior caracterizado por que el *cassette* de expresión está comprendido en un vector de expresión.
- 5 30. Método de producción de árboles transgénicos según la reivindicación 25 caracterizado por que la secuencia de nucleótidos introducida funcionalmente está ligada a un promotor constitutivo que permite la sobreexpresión de la proteína codificada por dicha secuencia de nucleótidos, como por ejemplo el promotor CaMV 35S, el promotor FMV (*figwort mosaic virus*) 35S, el promotor de la T-DNA manopina sintetasa, el promotor de la nopalina sintasa, o el promotor de la octopina sintasa.
10
31. Método de producción de árboles transgénicos según la reivindicación anterior caracterizado por que el promotor es el promotor CaMV 35S.
32. Método de producción de árboles transgénicos según cualquiera de las reivindicaciones 30 ó 31 caracterizado por que la secuencia de nucleótidos ligada a
15 dicho promotor están comprendidos en un *cassette* de expresión.
33. Método de producción de árboles transgénicos según la reivindicación anterior caracterizado por que el *cassette* de expresión está comprendido en un vector de expresión.
34. Método de producción de árboles transgénicos según cualquiera de las
20 reivindicaciones 23 a 33 caracterizado por que los árboles transformados son angiospermas.
35. Método de producción de árboles transgénicos según la reivindicación anterior caracterizado por que los árboles transformados son del género *Populus*.
36. Método de producción de árboles transgénicos según la reivindicación anterior
25 caracterizado por que los árboles transformados son *Populus tremula* x *Populus alba*.
37. Método de producción de árboles transgénicos según la reivindicación anterior caracterizado por que los árboles transformados son *Populus tremula* x *P. alba* clon INRA 7171-BA.
38. Método de producción de árboles transgénicos según cualquiera de las
30 reivindicaciones 23 a 37 caracterizado por que los árboles son transformados genéticamente, por ejemplo, mediante transformación mediada por *Agrobacterium*

tumefaciens, transformación mediada por *Agrobacterium rhizogenes*, electroporación, o mediante bombardeo de partículas o microproyectiles.

39. Método de producción de árboles transgénicos según la reivindicación anterior caracterizado por que los árboles son transformados mediante *Agrobacterium tumefaciens*.

40. Árboles transgénicos producidos mediante un método de producción de árboles transgénicos conforme cualquiera de las reivindicaciones 23 a 39.

41. Parte de un árbol obtenida de un árbol transgénico conforme a la reivindicación anterior.

42. Plántula obtenida de un árbol transgénico conforme a la reivindicación 40.

43. Tejido obtenido de un árbol transgénico conforme a la reivindicación 40.

44. Semilla obtenida de un árbol transgénico conforme a la reivindicación 40.

45. Célula obtenida de un árbol transgénico conforme a la reivindicación 40.

46. Protoplasto obtenido de una célula conforme a la reivindicación 40.

47. Material de propagación obtenido de un árbol transgénico conforme a la reivindicación 40, dicho material distinto de los materiales conforme a las reivindicaciones 41 a 46.

48. Procedimiento para modular la capacidad de asimilar altas concentraciones de nitrato y de acumular más biomasa en forma de celulosa de un árbol transgénico seleccionado entre los siguientes:

a. Un árbol transgénico conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15,

b. Un árbol transgénico conforme a la reivindicación 40;

dicho procedimiento caracterizado por que comprende la modulación de la expresión de uno o más genes expresados de forma diferencial en dicho árbol transgénico en comparación con un árbol silvestre cuando ambos son crecidos a alta concentración o exceso de nitrato, ligando para ello dichos uno o más genes a un promotor que muestra especificidad bien a nivel de fase de desarrollo, bien a nivel de tejido, bien a nivel de orgánulo, dicho promotor seleccionado entre los siguientes: el promotor de la subunidad pequeña de la RuBisCo, el promotor de la subunidad grande de la RuBisCo, el promotor de la CAB (*chlorophyll a/b binding protein*), el promotor de una proteína de almacenamiento en semilla, el promotor de la glutamina sintetasa específica de raíz, o el promotor de la proteína D1.

49. Procedimiento según la reivindicación anterior caracterizado por que el árbol transgénico cuya capacidad de asimilar altas concentraciones de nitrato y de acumular más biomasa en forma de celulosa se regula es un árbol transgénico conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.
- 5 50. Procedimiento según la reivindicación 48 caracterizado por que el árbol transgénico cuya capacidad de asimilar altas concentraciones de nitrato y de acumular más biomasa en forma de celulosa se regula es un árbol transgénico conforme a la reivindicación 40.
- 10 51. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 49 ó 50 caracterizado por que el promotor es inducible.
52. Procedimiento según la reivindicación anterior caracterizado por que dicho promotor está comprendido en un *cassette* de expresión.
53. Procedimiento según la reivindicación anterior caracterizado por que dicho *cassette* de expresión está comprendido en un vector de expresión.
- 15 54. Uso de árboles transgénicos conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para fitorremediación y/o aprovechamiento de suelos y/o aguas que acumulan altas concentraciones de nitrato, o de zonas vulnerables a nitrato o a contaminantes asociados con nitrato o con el nitrógeno en general.
- 20 55. Uso de árboles transgénicos conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para la obtención de biomasa para la producción de madera y papel, y/o para la producción de biocombustibles.
- 25 56. Uso de árboles transgénicos conforme a la reivindicación 40 para fitorremediación y/o aprovechamiento de suelos y/o aguas que acumulan altas concentraciones de nitrato, o de zonas vulnerables a nitrato o a contaminantes asociados con nitrato o con el nitrógeno en general.
57. Uso de árboles transgénicos conforme a la reivindicación 40 para la obtención de biomasa para la producción de madera y/o papel, y/o para la producción de biocombustibles.
- 30 58. Uso de la biomasa de árboles transgénicos conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para la producción de madera y/o papel.
59. Uso de la biomasa de árboles transgénicos conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para la producción de biocombustibles.

- 60. Uso de la biomasa de árboles transgénicos conforme a la reivindicación 40 para la producción de madera y/o papel.
- 61. Uso de la biomasa de árboles transgénicos conforme a la reivindicación 40 para la producción de biocombustibles.

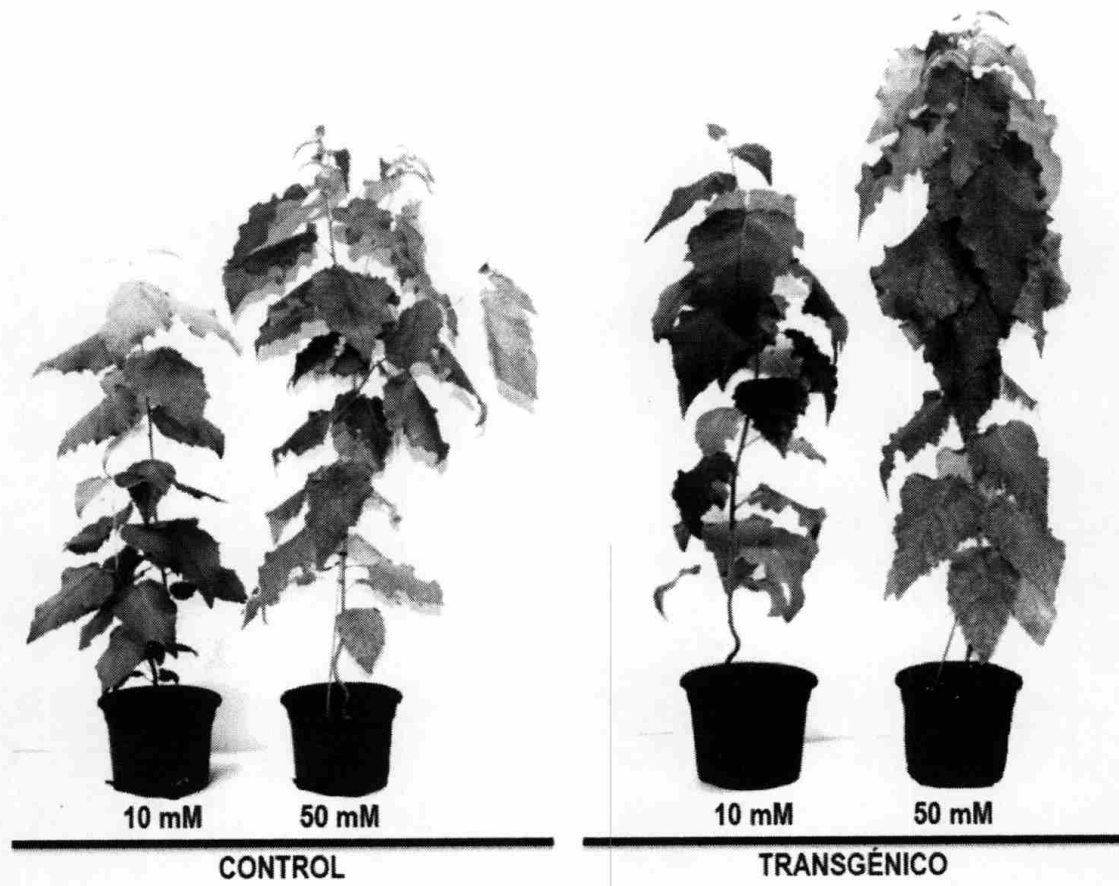


FIGURA 1

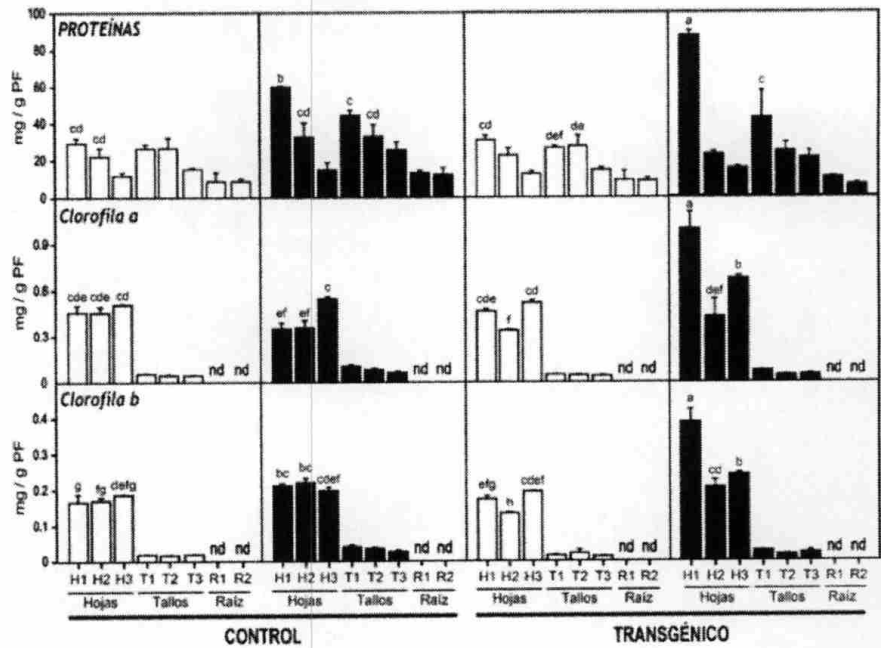
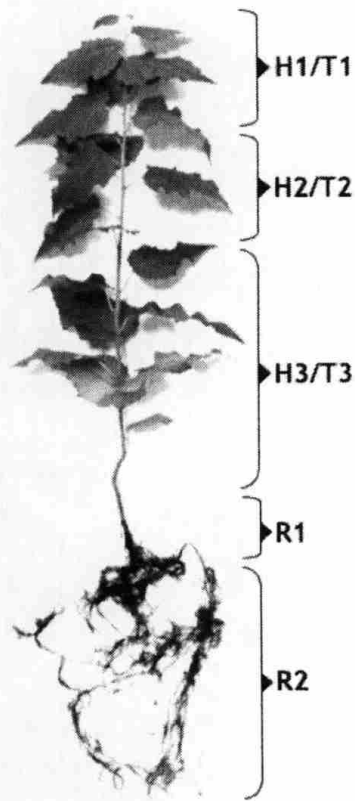


FIGURA 2

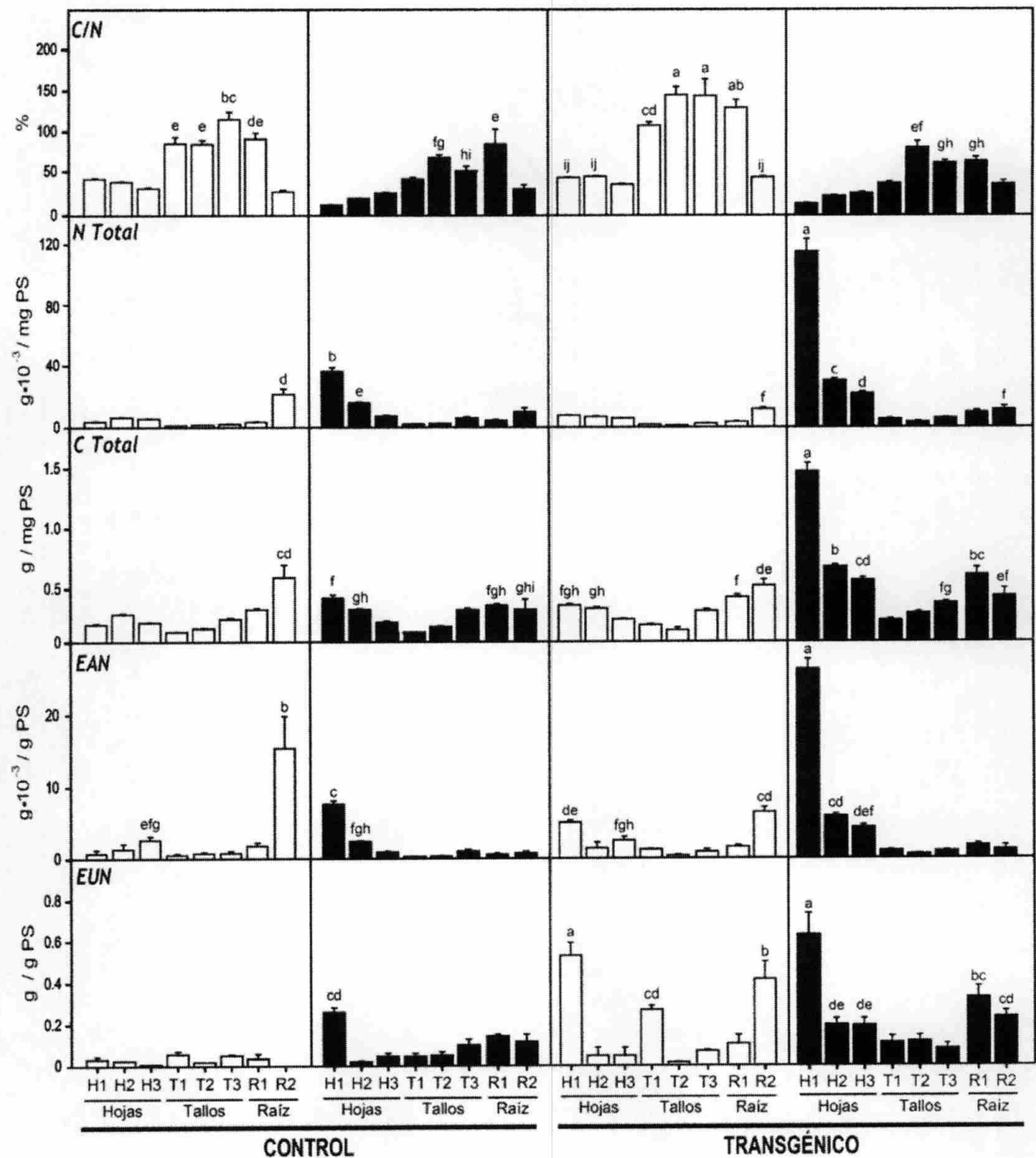


FIGURA 3

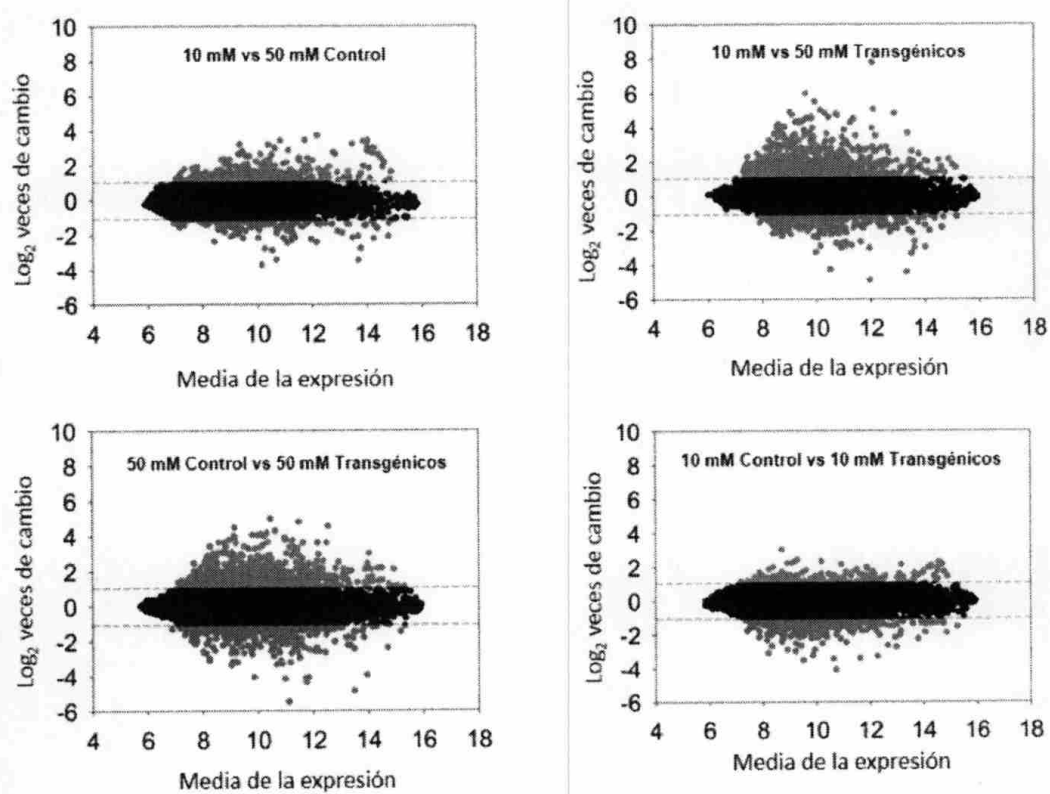


FIGURA 4

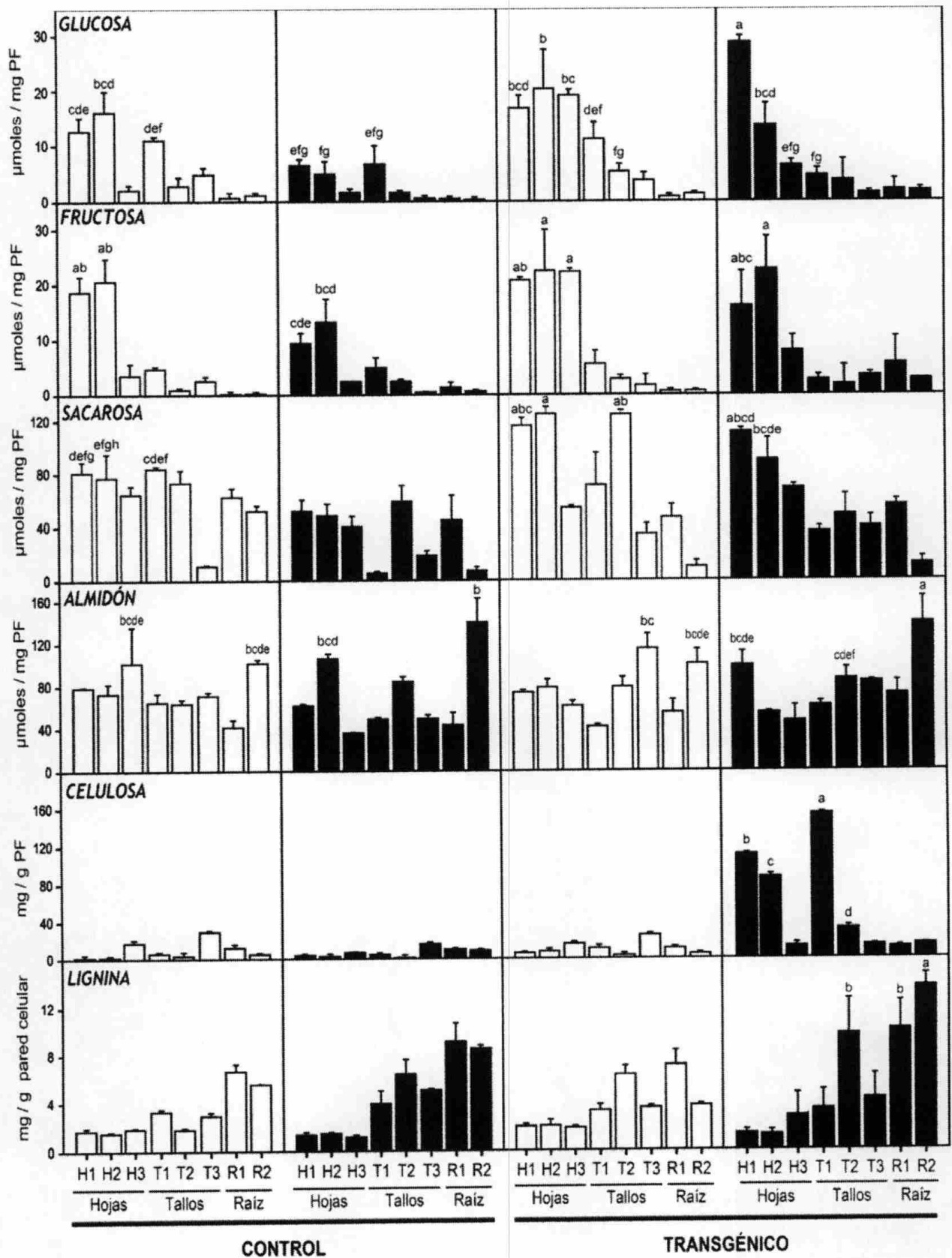


FIGURA 5

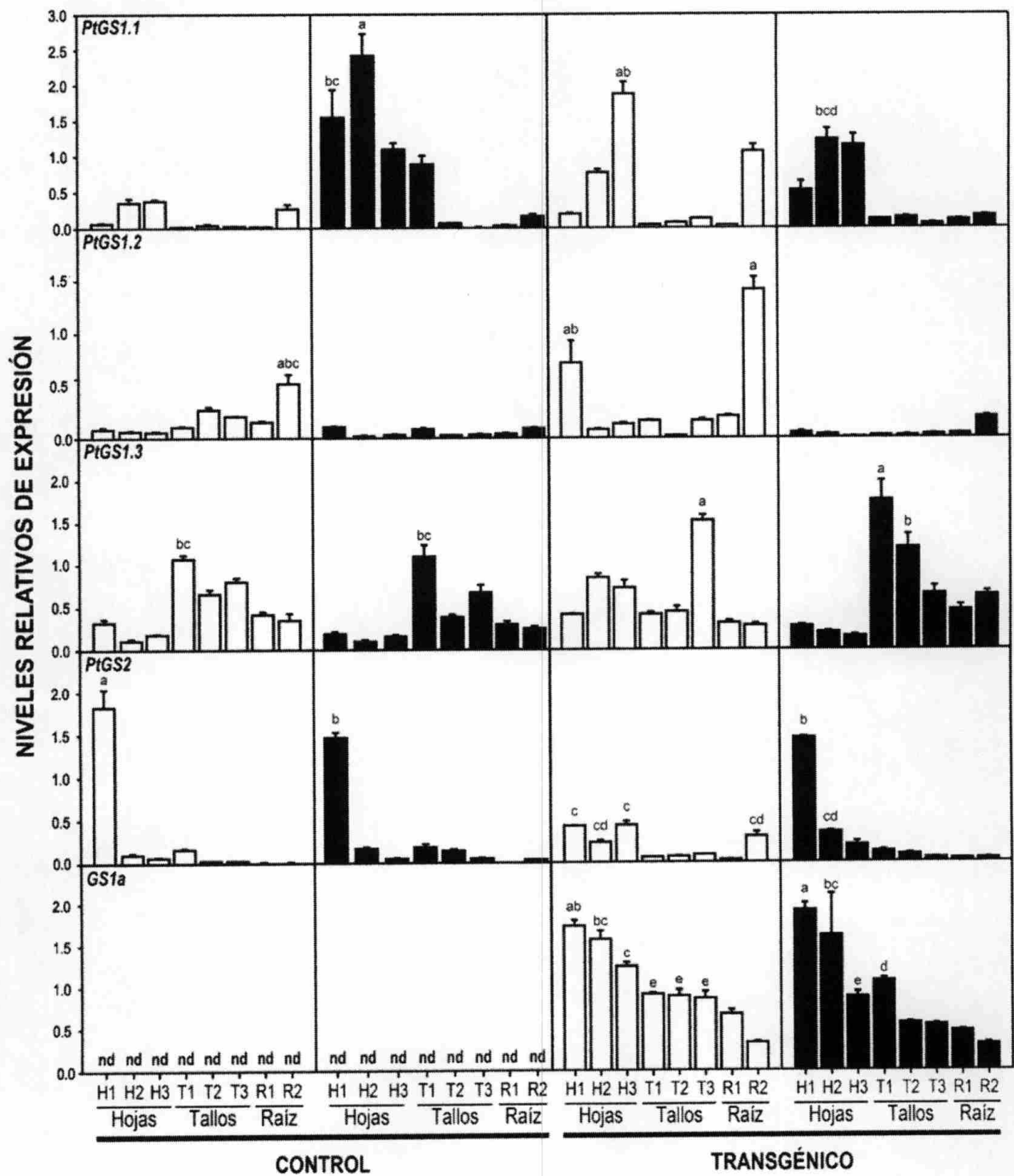


FIGURA 6

ES 2 562 129 A1

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Universidad de Málaga
- <120> Árboles transgénicos con capacidad de asimilar altas concentraciones de nitrato y de acumular más biomasa en forma de celulosa, y procedimientos y usos asociados
- <140> P201400945
- <141> 2014-11-19
- <160> 2
- <210> 1
- <211> 1074
- <212> DNA
- <213> Pinus sylvestris
- <400> 1

atg tcg agc gta tta aca gac ctt ctc aac ctt gac ctg agc gac	45
Met Ser Ser Val Leu Thr Asp Leu Leu Asn Leu Asp Leu Ser Asp	
1 5 10 15	
gtg aca gag aag gtc att gca gag tat ata tgg att gga gga tca	90
Val Thr Glu Lys Val Ile Ala Glu Tyr Ile Trp Ile Gly Gly Ser	
20 25 30	
gga atg gat atg cgc agt aaa gcc aga tct ctg tca gga cct gtg	135
Gly Met Asp Met Arg Ser Lys Ala Arg Ser Leu Ser Gly Pro Val	
35 40 45	
agt agc gtt aaa gag ctt ccc aaa tgg aac tat gac ggc tcc agc	180
Ser Ser Val Lys Glu Leu Pro Lys Tyr Asn Tyr Asp Gly Ser Ser	
50 55 60	
act gga cag gct caa gga cat gac agc gaa gtc att cta tat cca	225
Thr Gly Gln Ala Gln Gly His Asp Ser Glu Val Ile Leu Tyr Pro	
65 70 75	
caa gct atc ttc cgt gat cca ttt cgc aga gga aag cac att ttg	270
Gln Ala Ile Phe Arg Asp Pro Phe Arg Arg Gly Lys His Ile Leu	
80 85 90	
gta atc tgt gat gcc tac tct cct aat ggg act gct att cct tcc	315
Val Ile Cys Asp Ala Tyr Ser Pro Asn Gly Thr Ala Ile Pro Ser	
95 100 105	
aac aag agg gct gca gca gcg aaa att ttt aac gaa aag gcg gtt	360
Asn Lys Arg Ala Ala Ala Lys Ile Phe Asn Glu Lys Ala Val	
110 115 120	
agt gat gaa gag aca tgg tac ggg ctt gaa caa gaa tat aca ctg	405
Ser Asp Glu Glu Thr Trp Tyr Gly Leu Glu Gln Glu Tyr Thr Leu	
125 130 135	
ttg caa aag gac gtc aaa tgg cct ctt ggc tgg cca att ggt ggc	450
Leu Gln Lys Asp Val Lys Trp Pro Leu Gly Trp Pro Ile Gly Gly	

ES 2 562 129 A1

140	145	150	
tac ccc ggt cct cag ggc cca tat tac tgt gga gtt gga gct gac			495
Tyr Pro Gly Pro Gln Gly Pro Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Ala Asp			
155	160	165	
aaa gcc tgg gga cga gac att gtt gat gcc cat tat aag gct tgt			540
Lys Ala Trp Gly Arg Asp Ile Val Asp Ala His Tyr Lys Ala Cys			
170	175	180	
ctc tat tca gga atc aat atc agt ggc atc aat gga gaa gtc atg			585
Leu Tyr Ser Gly Ile Asn Ile Ser Gly Ile Asn Gly Glu Val Met			
185	190	195	
cca ggg cag tgg gaa ttt caa gta ggt ccg tca gtg ggt atc tca			630
Pro Gly Gln Trp Glu Phe Gln Val Gly Pro Ser Val Gly Ile Ser			
200	205	210	
gca gca gat gag ctg tgg tgt gct cgt ttt att atg gag agg att			675
Ala Ala Asp Glu Leu Trp Cys Ala Arg Phe Ile Met Glu Arg Ile			
215	220	225	
aca gaa aag gcg ggt gtc gtt ctg tcc ttt gat ccc aag cca att			720
Thr Glu Lys Ala Gly Val Val Leu Ser Phe Asp Pro Lys Pro Ile			
230	235	240	
gag ggg gac tgg aat ggt gct gga tgc cac aca aat tac agc acc			765
Glu Gly Asp Trp Asn Gly Ala Gly Cys His Thr Asn Tyr Ser Thr			
245	250	255	
aag tcc atg cgc aag gag gga ggc ttc gaa gta att aag aaa gca			810
Lys Ser Met Arg Lys Glu Gly Gly Phe Glu Val Ile Lys Lys Ala			
260	265	270	
ata gaa aaa ctg aag ttg agg cat aag gag cat att tct gcc tat			855
Ile Glu Lys Leu Lys Leu Arg His Lys Glu His Ile Ser Ala Tyr			
275	280	285	
ggg gag gga aat gag aga cgc ctc act ggt cgg cac gag aca gca			900
Gly Glu Gly Asn Glu Arg Arg Leu Thr Gly Arg His Glu Thr Ala			
290	295	300	
gac atg aat acc ttt tcc tgg ggt gtt gca aat cga gga gct tca			945
Asp Met Asn Thr Phe Ser Trp Gly Val Ala Asn Arg Gly Ala Ser			
305	310	315	
gtt aga gtg ggc cgg gac aca gaa aaa gaa gga aaa ggt tat ttt			990
Val Arg Val Gly Arg Asp Thr Glu Lys Glu Gly Lys Gly Tyr Phe			
320	325	330	
gag gac cgt cga cct gct tca aac atg gat cca tac ata gtg act			1035
Glu Asp Arg Arg Pro Ala Ser Asn Met Asp Pro Tyr Ile Val Thr			
335	340	345	
tct atg att gct gag acg acc att cta tgg aaa cct taa			1074
Ser Met Ile Ala Glu Thr Thr Ile Leu Trp Lys Pro Ter			
350	355		

ES 2 562 129 A1

<210> 2
 <211> 358
 <212> PRT
 <213> Pinus sylvestris

<400> 2

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

ES 2 562 129 A1

245	250	255
Lys Ser Met Arg	Lys Glu Gly Gly Phe Glu Val	Ile Lys Lys Ala
260	265	270
Ile Glu Lys Leu	Lys Leu Arg His Lys Glu His	Ile Ser Ala Tyr
275	280	285
Gly Glu Gly Asn	Glu Arg Arg Leu Thr Gly Arg	His Glu Thr Ala
290	295	300
Asp Met Asn Thr	Phe Ser Trp Gly Val Ala Asn	Arg Gly Ala Ser
305	310	315
Val Arg Val Gly	Arg Asp Thr Glu Lys Glu Gly	Lys Gly Tyr Phe
320	325	330
Glu Asp Arg Arg	Pro Ala Ser Asn Met Asp Pro	Tyr Ile Val Thr
335	340	345
Ser Met Ile Ala	Glu Thr Thr Ile Leu Trp Lys	Pro Ter
350	355	



- ②① N.º solicitud: 201400945
②② Fecha de presentación de la solicitud: 19.11.2014
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12N15/82** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	COLEMAN HEATHER D et al. Enhanced expression of glutamine synthetase (GS1a) confers altered fibre and wood chemistry in field grown hybrid poplar (<i>Populus tremula X alba</i>) (717-1B4). <i>Plant Biotechnology Journal</i> . 2012. VOL: 10 No: 7 Págs: 883-889, resumen.	1-61
Y	MAN HUI-MIN et al. Characterization of transgenic poplar with ectopic expression of pine cytosolic glutamine synthetase under conditions of varying nitrogen availability. <i>New Phytologist</i> . 2005. VOL: 167 Págs: 31-39, resumen.	1-61

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
23.02.2016

Examinador
I. Rueda Molíns

Página
1/4

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

C12N

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

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 23.02.2016

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-61	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-61	NO

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	COLEMAN HEATHER D et al. Enhanced expression of glutamine synthetase (<i>GS1a</i>) confers altered fibre and wood chemistry in field grown hybrid poplar (<i>Populus tremula</i> X <i>alba</i>) (717-1B4). <i>Plant Biotechnology Journal</i> . VOL: 10 No: 7 Págs: 883-889	2012
D02	MAN HUI-MIN et al. Characterization of transgenic poplar with ectopic expression of pine cytosolic glutamine synthetase under conditions of varying nitrogen availability. <i>New Phytologist</i> . VOL: 167 Págs: 31-39	2005

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (artículos 6 y 8 LP11/86)**

En las reivindicaciones 1-22 de la solicitud de patente se reivindican árboles transgénicos con capacidad de asimilar altas concentraciones de nitrato y de acumular más biomasa en forma de celulosa caracterizados por comprender funcionalmente en su genoma una secuencia de nucleótidos que codifica la glutamina sintetasa citosólica de pino *GS1a*.

En las reivindicaciones 23-47 de la solicitud de patente se reivindica un método de producción de árboles transgénicos con capacidad de asimilar altas concentraciones de nitrato y de acumular más biomasa en forma de celulosa caracterizado porque comprende la introducción funcional mediante transformación genética de una secuencia de nucleótidos que codifica la glutamina sintetasa citosólica de pino *GS1a*.

En las reivindicaciones 48-53 de la solicitud de patente se reivindica un procedimiento para modular la capacidad de asimilar altas concentraciones de nitrato y de acumular más biomasa en forma de celulosa en un árbol transgénico.

En las reivindicaciones 54-61 de la solicitud de patente se reivindican diferentes usos de los árboles transgénicos objeto de la invención: fitorremediación, obtención de biomasa para la producción de madera y papel y producción de biocombustibles.

En el documento D01 se divulga como chopos (*Populus tremula* x *P. alba*) genéticamente modificados que expresan la glutamina sintetasa del pino (*GS1a*) presentan características apropiadas para la producción de papel, así como para la producción de biocombustibles.

En el citado documento no aparecen estudios relacionados con la asimilación del nitrógeno de los chopos modificados genéticamente. En cambio el documento D02 sí refleja esta información.

El documento D02 refleja como los chopos transgénicos (*Populus tremula* x *P. alba*) que expresan la glutamina sintetasa del pino (*GS1a*) bajo el control del promotor CaMV35S presentan una mayor capacidad para asimilar nitrógeno, así como un mayor crecimiento.

Por tanto, teniendo en cuenta la información divulgada en los documentos D01 y D02 las reivindicaciones 1-61 de la solicitud de patente presentan novedad, pero no actividad inventiva. Según lo establecido en los artículos 6 y 8 de la LP11/86.