

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 701 381**

21 Número de solicitud: 201830544

51 Int. Cl.:

C12N 9/02 (2006.01)

A01H 13/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

05.06.2018

43 Fecha de publicación de la solicitud:

21.02.2019

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE HUELVA (100.0%)
C/ Dr. Cantero Cuadrado 6
21071 Huelva ES**

72 Inventor/es:

**LEON BAÑARES, Rosa;
VILA SPINOLA, Marta y
MOLINA MARQUEZ, Ana Maria**

74 Agente/Representante:

ALGUACIL OJEDA, Juan;

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico.

54 Título: **GEN CRTI SINTÉTICO Y SU USO EN UN MÉTODO DE SELECCIÓN DE ALGAS RESISTENTES A HERBICIDAS**

57 Resumen:

La invención describe una construcción génica que comprende la secuencia de un gen CRTI sintético de origen bacteriano que codifica una enzima de la ruta de síntesis de carotenoides, la fitoeno desaturasa. La construcción génica puede emplearse en métodos de selección de transformantes resistentes a herbicidas dado que la enzima fitoeno desaturasa codificada en la construcción, a diferencia de la de algas y plantas, no es sensible a herbicidas blanqueantes, lo que le convierte a la construcción en un marcador para seleccionar células de algas transformadas usando un herbicida blanqueante como agente de selección.

ES 2 701 381 A1

DESCRIPCIÓN

Gen *crtI* sintético y su uso en un método de selección de algas resistentes a herbicidas.

5

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se engloba dentro de la biotecnología, más concretamente dentro del ámbito de la ingeniería genética de algas.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las algas tienen múltiples aplicaciones biológicas tales como la mitigación de las emisiones de CO₂, el tratamiento de aguas residuales y biorremediación, nutrición y salud humana, nutrición animal y agricultura, producción de biocombustibles, biofertilizantes o como sistemas de expresión de proteínas heterólogas.

15

La manipulación genética de algas es una estrategia para obtener sistemas productores de compuestos de interés comercial. A pesar de su interés biotecnológico, actualmente no existen métodos estables para la transformación genética de muchas especies del grupo de las microalgas.

20

Uno de los sistemas más empleados en la manipulación genética de plantas y algas es la selección de transformantes resistentes a antibióticos. Para ello se introduce en la célula, junto con la construcción génica de interés, un gen de resistencia a un antibiótico, de forma que las células que hayan incorporado la construcción de interés son además resistentes al antibiótico usado como marcador, lo que permite seleccionar fácilmente los transformantes. Sin embargo, el uso de antibióticos en la selección de transformantes tiene el inconveniente de que los genes selectivos pueden transferirse a otros organismos, lo que facilita el desarrollo indeseado de resistencia a antibióticos en microorganismos por transferencia horizontal.

25

30

Muchas especies de microalgas, especialmente las salinas, son además poco sensibles a los antibióticos (higromicina, kanamicina o paramomicina), bien porque son resistentes de forma natural o porque la efectividad del antibiótico se reduce a altas salinidades.

35

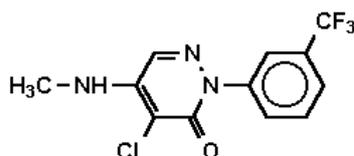
Una alternativa a la selección de células transformantes de algas con antibióticos es la selección con herbicidas.

El gen que codifica la enzima glifosato aminotransferasa (GAT) confiere resistencia al herbicida glifosato y el gen que codifica la enzima acetolactato sintasa (ALS) confiere resistencia a sulfometuron metil. Estos genes han sido utilizados como reporteros en la transformación de las microalgas *Chlamydomonas reinhardtii*, *Porphyridium* sp. o *Parietochloris incisa*. Sin embargo, se ha descrito que el glifosato puede estar implicado en el desarrollo de diversos tipos de cáncer en humano y enfermedades crónicas, por lo que la Organización Mundial de la Salud lo ha calificado como un producto probablemente cancerígeno. El sulfometuron metil, aunque está considerado por la OMS como que no presenta riesgo agudo, tiene un precio elevado, lo que le hace un mal candidato para usarlo de forma habitual en el laboratorio.

Por el contrario, el herbicida blanqueante norflurazón se ha considerado por la OMS como un compuesto que no presenta riesgo agudo y, además, su precio es muy inferior al de otros herbicidas. Esto permite que sea una alternativa segura, barata y eficaz para la selección de células de algas transformadas, resistentes a herbicidas.

El norflurazón (4-cloro-5-(metilamino)-2-(3-(trifluorometil)fenil)-3(2H)-piridazinona, (número CAS 27314-13-2, representado en la Fórmula I) es un herbicida perteneciente a la familia de las piridazinonas conocido por su efecto sobre la biosíntesis de carotenoides en plantas superiores y microalgas (León *et al.*, 2005).

25



Fórmula I

30

El tratamiento de plantas con norflurazón provoca blanqueamiento celular debido a la inhibición de la síntesis de carotenoides por la inhibición de la enzima fitoeno desaturasa y a la consecuente reducción en el contenido en clorofila, provocando la muerte de la planta. El norflurazón también tiene un potente efecto inhibitorio sobre muchas especies de algas como por ejemplo los géneros *Chlamydomonas*, *Dunaliella*, *Haematococcus* o *Isochrysis* entre otras.

35

El licopeno es un isoprenoide poliinsaturado, importante intermediario de la ruta de biosíntesis de carotenoides. Las enzimas implicadas en la síntesis de licopeno en plantas y algas, cianobacterias y bacterias y hongos son diferentes. Mientras que en plantas y algas intervienen las enzimas fitoeno desaturasa (PDS), ζ-caroteno desaturasa (ZDS) y caroteno isomerasa (CRTISO), en cianobacterias el mismo proceso lo llevan a cabo las enzimas CRTP y CRTQ, que realizan la misma función que PDS y ZDS respectivamente. En bacterias y hongos, todas las reacciones de síntesis del proceso las cataliza la enzima fitoeno desaturasa (CRTI) (Cunningham y Gantt 1998).

10 La secuencia aminoacídica de la enzima fitoeno desaturasa de plantas y algas (PDS) y la de cianobacterias (CRTP) están muy conservadas (Lohr *et al.*, 2005), pero ambas tienen muy bajo grado de identidad con la correspondiente fitoeno desaturasa de bacterias y hongos (CRTI), que parece haber surgido de forma independiente en la evolución. Por ejemplo, el grado de identidad de CRTI de la bacteria *Pantoea ananatis* y de PDS del alga *Chlamydomonas* es solamente del 36%.

Para poder usar el herbicida norflurazón como agente de selección de transformantes en algas, se han descrito sistemas basados en la enzima PDS mutada del propio organismo, como en *Chlamydomonas reinhardtii* (Suarez *et al.* 2014), en 20 *Haematococcus pluvialis* (Steinbrenner y Sandmann 2006), en *Chorella zofingiensis* (Huang *et al.* 2008) o en *Isochrysis sp* (Prasad *et al.* 2014).

El problema de los sistemas basados en enzimas PDS mutadas de algas es que proporcionan distintos niveles de resistencia al herbicida según la mutación que 25 contengan, lo que da lugar a resultados poco reproducibles. Además, en muchos casos las mutaciones también afectan a la interacción de la enzima con la plastoquinona celular o con el cofactor FAD. La plastoquinona es un isoprenoide que se encuentra en la membrana tilacoidal de los cloroplastos del alga, participa en la fotosíntesis y el FAD es un flavín adenín dinucleótido que actúa como aceptor de los 30 electrones en la reacción catalizada por la fitoeno desaturasa, ambos son esenciales para el funcionamiento de la enzima PDS y para la síntesis de licopeno. Por lo tanto, mutaciones en la enzima fitoeno desaturasa de algas reducen en muchas ocasiones la actividad de la PDS y la viabilidad de las algas transformadas.

35 El estado del arte más próximo es el documento Suárez *et al.* 2014, que describe mutaciones en la secuencia de la enzima PDS del alga *Chlamydomonas reinhardtii* que hacen que el alga sea resistente a norflurazón y permite por lo tanto su uso en un

sistema de selección de transformantes. Sin embargo, los propios autores reconocen que las mutaciones que han identificado, afectan al sitio de unión de la enzima con su cofactor (FAD), lo que provoca que la actividad de la PDS mutada esté disminuida. La resistencia de las células al herbicida es debido a la presencia de la proteína mutada, ya que la enzima nativa está totalmente inhibida por el norflurazón.

El problema técnico objetivo es la necesidad de una alternativa para la selección de algas transformantes resistentes a herbicidas que no afecte a la síntesis del licopeno ni a la viabilidad del organismo transformado.

10

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención describe una construcción génica que permite seleccionar algas eucariotas transformadas resistentes a herbicidas.

15

La construcción génica comprende la secuencia de un gen *CRTI* sintético, preferiblemente de origen bacteriano.

La expresión “algas” o “algas eucariotas” se refiere a organismos con capacidad de realizar fotosíntesis oxigénica. Pueden ser unicelulares o pluricelulares y la expresión incluye a las algas verdes, algas pardas, algas rojas y a varios grupos de protistas unicelulares o coloniales que forman parte del fitoplancton (por ejemplo, dinoflagelados, diatomeas, haptofitas, criptofitas, etc.). Las cianobacterias están excluidas del término, por ser procariontes. En una realización preferida, las algas a las que se refiere el método de la invención son algas unicelulares, también llamadas microalgas.

A efectos de la presente invención, las expresiones “construcción génica exógena” y “construcción génica” se consideran equivalentes. Una construcción génica exógena es cualquier molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA) que no pertenece a la célula en la que se introduce. La construcción de la invención comprende una secuencia de DNA que codifica la enzima fitoeno desaturasa CRTI de bacterias. Esta enzima (EC 1.3.99.31) es una oxidoreductasa implicada en la síntesis de carotenoides que usa como cofactor FAD. La enzima está codificada en el gen *CRTI*.

35

En una realización preferida, la enzima CRTI proviene de una especie bacteriana perteneciente al género *Pantoea*. En una realización más preferida, pertenece a la especie *Pantoea ananatis*. La enzima CRTI de *Pantoea ananatis* tiene 492

aminoácidos y su secuencia se corresponde a la indicada en la base de datos Uniprot, código N° A0A0H3LAP6 y está codificado en el gen *CRTI*.

5 La construcción génica comprende una secuencia de un gen *CRTI* sintético, derivado del gen *CRTI* de *Pantoea ananatis*. El gen sintético se caracteriza porque comprende la secuencia SEQ ID NO:1 o una secuencia con al menos un 95, 98, 99 o 100% de identidad con la secuencia SEQ ID NO:1. La invención se refiere a una construcción génica caracterizada porque comprende la secuencia de un gen *CRTI* sintético, dicho gen identificado por la secuencia SEQ ID NO:1. En otra realización, la construcción
10 génica se caracteriza porque el gen *CRTI* sintético presenta al menos un 90% de identidad con la secuencia SEQ ID NO:1. La secuencia del gen *CRTI* sintético codifica una enzima fitoeno desaturasa(*CRTI*)sintética caracterizada porque su secuencia comprende la secuencia SEQ ID NO:2.

15 La secuencia del gen *CRTI* sintético permite que la enzima fitoeno desaturasa bacteriana que codifica, se exprese y tenga actividad en algas. Con el fin de que el gen sintético no solo se exprese y tenga actividad en algas, sino que además ejerza su función en la localización óptima de la célula (el cloroplasto), la construcción génica de la invención adicionalmente comprende un fragmento de una secuencia que codifica
20 un péptido señal cloroplástico. En una realización más preferida, el péptido señal es el de la subunidad pequeña de la de la enzima ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa (RuBisCo) de *Chlamydomonas*. La secuencia del péptido señal comprende la secuencia representada en SEQ ID NO:3 y está codificado en una secuencia nucleotídica que comprende la secuencia SEQ ID NO:4. En la construcción de la invención, el extremo
25 3' de la secuencia nucleotídica del péptido señal está unido al extremo 5' de la secuencia que comprende la secuencia del gen sintético *CRTI*.

La construcción génica comprende además un promotor para la expresión de la enzima *CRTI* en algas. En una realización preferida, el promotor de la construcción es
30 el promotor híbrido RBCS2/HSP70A de *Chlamydomonas*. La secuencia del promotor está localizada en el extremo 5' de la construcción génica de la invención.

Además, la construcción génica comprende un fragmento del intrón 1 del gen *RBCS2* del alga *Chlamydomonas* unido al extremo 3' del promotor y al extremo 5' de la
35 secuencia del péptido señal.

En una realización preferida, la construcción génica exógena de la invención consiste en una secuencia nucleotídica que comprende el promotor híbrido RBCS2/HSP70A de

Chlamydomonas, al menos un fragmento de la secuencia del intrón 1 del gen *RBCS2* unido al extremo 3' de la secuencia promotor, la secuencia que codifica al menos un fragmento del péptido señal cloroplástico de la RuBisCo unida al extremo 3' de la secuencia del intrón, la secuencia del gen sintético *CRTI* unida al extremo 3' de la
5 secuencia que codifica el fragmento del péptido señal y, por último, al menos un fragmento de la secuencia de la región terminadora 3'UTR de la subunidad pequeña de la enzima RuBisCo de *Chlamydomonas*, unida al extremo 3' de la secuencia del gen sintético *CRTI*. En una realización preferida, la secuencia nucleotídica de la construcción génica de la invención comprende la secuencia representada por SEQ ID
10 NO:5. La presente invención se refiere a una construcción génica caracterizada porque comprende la secuencia de un gen *CRTI* sintético identificada por la secuencia SEQ ID NO:1, en el que la construcción génica comprende la secuencia identificada por la secuencia SEQ ID NO:5. La **Figura 1** muestra un esquema de la construcción génica de la invención.

15 La construcción génica definida anteriormente puede obtenerse mediante técnicas de biología molecular conocidas por un experto medio en el sector, como síntesis nucleotídica o clonaje. Además, la construcción se puede opcionalmente introducir en un vector de expresión adecuado para la transformación de algas mediante técnicas
20 de biología molecular. Vectores adecuados para este propósito son, por ejemplo, y sin intención de limitarse: Phyco106 (Phycogenetics SL), Phyco69 (WO 2017144750 A1) o pChlamy4 (GenArt, Thermo Fisher).

25 La construcción génica definida anteriormente puede usarse en la transformación de algas eucariotas. La introducción de una construcción génica exógena en una célula se conoce como transformación. La construcción génica se introduce en la célula mediante cualquiera de los sistemas de transformación de algas conocidos por un experto medio en el sector, tales como: electroporación, biolistic o bombardeo de
30 partículas, agitación con perlas de vidrio en presencia de PEG, etc. (León-Bañares 2004).

35 Un alga transformada se define como una célula de una especie de alga que ha incorporado una construcción génica exógena. En una realización preferida, la construcción génica se incorpora en el núcleo de la célula. Las células transformadas incorporan marcadores que permiten seleccionarlas mediante un método de selección. En la presente invención, la expresión de la enzima fitoeno desaturasa sintética en la célula permite seleccionar las células resistentes a herbicidas.

En otra realización, la presente invención describe un método de selección de algas (un alga o una célula de un alga) resistentes a herbicidas, comprende:

- a) introducir en una célula del alga una construcción génica que comprende la secuencia de un gen *CRTI* sintético de origen bacteriano;
- 5 b) incubar la célula en un medio que contiene un herbicida;
- c) seleccionar las células resistentes al herbicida.

En una realización más preferida, el método de selección de un alga (o de una célula de un alga) resistente a un herbicida que comprende:

- 10 a) introducir en una célula de alga una construcción génica que comprende la secuencia SEQ ID NO:1;
- b) incubar la célula del paso a) en un medio que contiene un herbicida;
- c) seleccionar las células resistentes al herbicida.

- 15 En una realización todavía más preferida, la construcción génica del paso a) comprende la secuencia SEQ ID NO:5.

Una vez transformada la célula con la construcción génica, en el paso b) éstas se incuban o cultivan en un medio de cultivo adecuado para el crecimiento del alga. El medio de cultivo comprende un herbicida como agente de selección (medio de selección). Los medios de cultivo de microalgas son conocidos en el sector e incluyen, sin por ello limitarse: medio Sueoka (Sueoka 1967), medio F2, medio DUNA (Jhonson 68) o medio Tris-acetato-fosfato (TAP, Harris,09).

25 Los herbicidas empleados como agentes de selección en la presente invención se seleccionan entre herbicidas inhibidores de la enzima fitoeno desaturasa como, por ejemplo, norflurazón oflurocloridona(3-cloro-4-(clorometil)-1-[3-(trifluorometil)fenil]pirrolidin-2-ona). En una realización de la invención, el herbicida se selecciona del grupo que consiste en: norflurazón o 3-cloro-4-(clorometil)-1-[3-(trifluorometil)fenil]pirrolidin-2-ona. En una realización más preferida, el herbicida empleado como agente de selección es norflurazón. En una realización de la invención, la concentración de norflurazón presente en el medio de cultivo es de 0,5 a 100 µg/mL. En una realización más preferida, la concentración de norflurazón en el medio de selección es de 0,5 µg/mL para el alga *Chlamydomonas reinhardtii*, 50 µg/mL para *Chlorella sorokiniana* y 100 µg/mL para *Dunaliella salina*, *D. bardawil* y *Tetraselmis suecica*.

En el paso c) se seleccionan las células resistentes al herbicida que se corresponden con las células transformadas (o transformantes) que han incorporado la construcción génica. Estas células expresan la enzima fitoeno desaturasa CRTI de origen bacteriano que comprende la secuencia SEQ ID NO:2, dado que son las únicas células capaces de crecer en el medio de cultivo suplementado con el herbicida. Las células de algas son sensibles a herbicidas inhibidores de la enzima fitoeno desaturasa y, por lo tanto, solo las células que expresen CRTI, crecerán en el medio de cultivo suplementado con el herbicida.

10 La célula que incorpora la construcción génica de la invención es una célula de alga eucariota. En una realización preferida, son microalgas o algas unicelulares. Las microalgas son microorganismos eucariotas microscópicos (2-200 μm) fotosintéticos que pueden crecer de manera autotrófica o heterotrófica. En una realización más preferida, la microalga pertenece a las clases Chlorophyceae, Trebouxiophyceae, Prasinophyceae, Eustigmatophyceae, Chrysophyceae o Dinophyceae. En una realización más preferida, la microalga pertenece a un género seleccionado del grupo que consiste en: *Chlamydomonas*, *Dunaliella*, *Scenedesmus*, *Chlorella*, *Nannochloris*, *Tetraselmis*, *Ostreococcus*, *Nannochloropsis* o *Phaeodactylum*.

20 Es objeto de la invención el uso de una construcción génica que comprende una secuencia de un gen CRTI sintético identificada por la secuencia SEQ ID NO:1 en la selección de un alga resistente a un herbicida o en un método para seleccionar células de algas transformadas resistentes a herbicidas, en el que el alga o la célula de alga comprende la construcción génica. En una realización preferida, la construcción génica comprende la secuencia SEQ ID NO:5.

En una realización, el herbicida se selecciona del grupo que consiste en: norflurazón o 3-cloro-4-(clorometil)-1-[3-(trifluorometil)fenil]pirrolidin-2-ona. En una realización más preferida, el herbicida empleado como agente de selección es norflurazón.

30 La construcción génica se usa preferiblemente en la selección de un alga eucariota. En una realización preferida, se selecciona una microalga o un alga unicelular. En una realización más preferida, la microalga pertenece a las clases Chlorophyceae, Trebouxiophyceae, Prasinophyceae, Eustigmatophyceae, Chrysophyceae o Dinophyceae. En una realización más preferida, la microalga pertenece a un género seleccionado del grupo que consiste en: *Chlamydomonas*, *Dunaliella*, *Scenedesmus*, *Chlorella*, *Nannochloris*, *Tetraselmis*, *Ostreococcus*, *Nannochloropsis* o *Phaeodactylum*.

La resistencia de las células del alga al herbicida está determinada por la expresión de la enzima CRTI a partir de la construcción génica exógena de la invención, en la que la secuencia de la enzima fitoeno desaturasa expresada no está relacionada filogenéticamente con la de su hospedador. Por este motivo, la actividad de la enzima fitoeno desaturasa exógena (CRTI), no está afectada por la presencia del herbicida en el medio de cultivo, al contrario que en las estrategias descritas en el estado del arte. En los documentos publicados, el efecto en la resistencia a herbicidas y en la viabilidad celular depende de mutaciones en la enzima PDS endógena. Se ha comprobado que estas mutaciones afectan tanto a la actividad de la enzima fitoeno desaturasa en la célula como a la viabilidad del hospedador, dado a que las mutaciones en la enzima PDS, afectan a la interacción entre la enzima mutada y el herbicida norflurazón y además también a la interacción entre la enzima y sus cofactores (plastoquinona y FAD) lo que hace que la actividad de esta PDS mutada esté afectada, haciendo a las células que la portan, resistentes al herbicida pero mucho más sensibles a otros aspectos como la alta intensidad luminosa o el estrés oxidativo y, por lo tanto, disminuyendo su viabilidad.

Las ventajas que tiene el método de selección de algas resistentes a herbicidas definido en la presente invención, que comprende introducir en la célula del hospedador una construcción génica que comprende una secuencia sintética del gen *CRTI* de origen bacteriano son:

- (a) no se utiliza como agente de selección un antibiótico;
- (b) no precisa que la secuencia del gen que codifica la enzima responsable de la resistencia al herbicida esté mutada;
- (c) los transformantes resistentes al herbicida son funcionales y tienen un contenido en carotenoides normal o incluso superior a las células del alga sin transformar.

30 DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Esquema de la construcción génica. Promotor híbrido RBCS2/HSP70A (rectángulo gris), intrón 1 del gen *RCBS2* (rectángulo blanco), péptido señal cloroplástico de la subunidad pequeña de la RuBisCo (rectángulo con rombos), secuencia del gen *CRTI* sintético (rectángulo negro) y región terminadora 3'UTR de la subunidad pequeña de la RuBisCo (rectángulo rallado).

Figura 2. Colonias del alga *Chlamydomonas reinhardtii* transformada con el gen *CRTI* sintético y seleccionadas con el herbicida norflurazón. Las colonias de los transformantes crecieron en medio TAP (Tris-Acetato-fosfato) en presencia de 0,5 µg/mL de norflurazón.

5

Figura 3. Expresión del gen *CRTI* sintético. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. La banda de 472 pares de base (pb) corresponde a un fragmento del gen *CRTI*, amplificado por PCR a partir del ADN genómico de colonias transformantes de varias cepas del alga *Chlamydomonas reinhardtii* resistentes a norflurazón. PM: Patrón de peso molecular; C-: Control negativo; C+: Control positivo; T4 y T6: Transformantes 4 y 6.

10

Figura 4. Análisis de pigmentos sintetizados en el alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **A.** Cromatogramas de *C. reinhardtii* sin transformar (control) en presencia de norflurazón registrado a 450 y 288 nm. **B.** Cromatograma de *C. reinhardtii* transformada con la construcción génica de la invención en presencia de norflurazón, registrado a 450 y 288 nm. Los pigmentos analizados son 1: neoxantina, 2: violoxantina, 3: anteraxantina, 4: luteína, 5: zeaxantina, 6: clorofila b, 7: clorofila a, 8: β-caroteno y 9: fitoeno.

15

20

Figura 5. Ensayo de toxicidad de algas a norflurazón. **A.** Ensayo de toxicidad de diferentes concentraciones de norflurazón (0 a 2,5 µg/mL) sobre *Chlamydomonas reinhardtii*. **B.** Ensayo de toxicidad de diferentes concentraciones de norflurazón (0-500 µg/mL) sobre las algas *Dunaliella salina*, *Dunaliella bardawil* y *Tetraselmis suecica* (0-300 µg/mL). **C.** Ensayo de toxicidad de diferentes concentraciones de norflurazón (0-250 µg/L) sobre el alga *Chlorella sorokiniana*. Los pocillos en los que hay crecimiento del alga presentan un círculo oscuro.

25

EJEMPLOS

30

Los ejemplos indicados en la presente memoria tienen como objetivo ilustrar la invención, sin limitar por ello su alcance.

Ejemplo 1. Selección y caracterización de algas transformadas resistentes a herbicidas.

35

La transformación de las algas con la construcción génica de la invención se llevó a cabo mediante el método de agitación con perlas de vidrio en polietilenglicol (PEG).

Las células del alga *Chlamydomonas reinhardtii* crecieron en medio de cultivo Tris Acetato fosfato (TAP) hasta la mitad de la fase exponencial de crecimiento (alrededor de $1,6 \times 10^6$ células mL^{-1}), a continuación, se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en medio TAP fresco para obtener una suspensión celular 100 veces concentrada.

Se añadió aproximadamente 1 μg de un plásmido que comprende la construcción génica SEQ ID NO:5 clonada en el vector Phyco106 (PhycoGenetics S.L.) a diferentes tubos de reacción de 15 mL que contenían 0,6 mL de la suspensión celular concentrada 100 veces, 0,1 mL de PEG 8000 al 20% y 0,3 gr de perlas de vidrio. Cada tubo se agitó enérgicamente durante 8 segundos.

A continuación, las células se resuspendieron en 50 mL de medio TAP estéril y se incubaron durante 16 horas en la cámara de cultivo a 25°C y $150 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$. Todo el proceso se llevó a cabo en esterilidad. Después de la incubación, el cultivo se recogió por centrifugación, las células precipitadas se resuspendieron en 0,8 mL de medio de cultivo y se inocularon en placas con medio TAP sólido que contenían el herbicida norflurazón a una concentración 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A continuación, las placas se incubaron en la cámara de cultivo a 25°C y $150 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Las colonias de algas transformadas se hicieron visibles tras 5-7 días de cultivo, como se observa en la **Figura 2**.

De este experimento se concluye que la construcción sintética de la invención permite la selección de microalgas transformantes resistentes a norflurazón.

Para corroborar que la resistencia al herbicida es fruto de la expresión de la enzima CRTI codificada en el gen sintético *CRTI*, se seleccionaron algunos de los transformantes y se verificó que las células contenían el gen *CRTI* insertado en su genoma. Para ello se aisló el ADN genómico con el kit Gene JET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific) y posteriormente se hizo una PCR con los primers CRTIF (SEQ ID NO:6) y CRTIR (SEQ ID NO:7), específicos para detectar el gen *CRTI* sintético. El programa de PCR utilizado fue: desnaturalización inicial 95°C 3 minutos, 34 ciclos de: desnaturalización 95°C 40 segundos, anillamiento 54°C 30 segundos y elongación 72°C 15 segundos; y última elongación a 72°C 5 minutos.

La **Figura 3** muestra el gel de agarosa teñido con bromuro de etidio en el que se observa un fragmento de 472 pares de bases (pb) que se corresponde con el fragmento del gen *CRTI* sintético amplificado. El control negativo (C-) es la mezcla de la reacción de PCR sin ADN molde, el control positivo (C+) contiene como DNA molde el plásmido que comprende la secuencia SEQ ID NO:5. Las muestras T4 y T6 se corresponden con el DNA genómico amplificado de dos transformantes de *Chlamydomonas reinhardtii* resistentes a norflurazón obtenidos en el ensayo de transformación.

Por último, se comprobó el fenotipo de las algas transformantes resistentes al herbicida mediante cromatografía líquida HPLC. Para ello, se incubaron, en presencia de norflurazón, células del alga control *C. reinhardtii* no transformada y células del alga transformadas como se ha descrito anteriormente, que contienen la construcción génica de la invención. Después de 24 horas de incubación a 25°C y 150 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$, se extrajeron los pigmentos de las células por agitación con metanol y la separación y análisis cromatográfico de los pigmentos se llevó a cabo en un HPLC Merck Hitachi como se describe en Young *et al.* 1997, usando una columna RP-18 y un flujo de 1 mL min⁻¹. La detección de los pigmentos se llevó a cabo a 450 nm, excepto en el caso del fitoeno, que se detectó a 288 nm. Los calibres de los pigmentos utilizados fueron suministrados SIGMA o DHI (Hoersholm, Denmark). Los resultados son la media de al menos dos replicados del experimento.

Tal y como se observa en la **Figura 4A**, en el cromatograma correspondiente al control se observa una fuerte inhibición de la síntesis de b-caroteno (8), luteína (4) y demás carotenoides (1: neoxantina, 2: violoxantina, 3: anteraxantina) y una importante acumulación de fitoeno (9), el primer compuesto precursor del licopeno en la ruta de síntesis del carotenoide, cuyo máximo de absorbancia es a 288 nm, debido a la inhibición de la enzima fitoeno desaturasa (PDS) por el norflurazón. El licopeno únicamente se detecta a 288 nm.

La **Figura 4B** muestra el cromatograma correspondiente a un transformante que tiene la enzima CRTI expresada a partir de la construcción génica integrada en el genoma del alga. Se observa, a 450 nm, que no hay inhibición de los carotenoides habituales b-caroteno (8), luteína (4), violaxantina (2), neoxantina (1), y a 288 nm solo hay trazas del precursor fitoeno (9), lo que indica que la enzima CRTI expresada está funcionando correctamente y se están sintetizando carotenoides en la célula incluso en presencia de norflurazón.

En este experimento se demuestra que es el gen sintético exógeno *CRTI*, presente en la construcción génica de la invención, introducido y expresado en el genoma microalgal, el que permite la síntesis de carotenoides en condiciones en que el herbicida norflurazón está inhibiendo la enzima fitoeno desaturasa endógena.

5

Ejemplo 2. Estudio de toxicidad de norflurazón sobre diferentes especies de algas.

Muchas especies de microalgas, especialmente las salinas, son poco sensibles a antibióticos como agentes selectivos porque son resistentes de forma natural o porque la efectividad del antibiótico se reduce a altas salinidades.

Dado que muchas algas empleadas en biotecnología son algas salinas, es necesario que la transformación de algas usando herbicidas como agentes de selección también funcione para algas salinas y por lo tanto estas sean sensibles al herbicida cuando no incorporan la construcción génica exógena que expresa la enzima CRTI.

Para comprobarlo, se realizó un estudio de toxicidad del herbicida norflurazón sobre diferentes especies de algas: la microalga acuática *Chlamydomonas reinhardtii* (A), las microalgas marinas *Dunaliella salina*, *Dunaliella bardawil* y *Tetraselmis suecica* (B) y el alga *Chlorella sorokinina* (C), con el fin de determinar cuál es la concentración a partir de la cual las algas son sensibles al herbicida.

Para ello las algas fueron cultivadas en medio líquido específico para cada organismo: medio TAP para *C. reinhardtii* y *C. sorokiniana*, medio DUNA 0,5 M para *D. salina* y *D. bardawil* y medio F2 1:1 (agua marina:agua destilada) para *T. suecica*.

Se tomó una muestra de cada cultivo con una densidad óptica a 660 nm entre 0,600 y 1,300 y se inoculó en el medio selectivo correspondiente. Después de 5-7 días de incubación a 25 °C y 150 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ se evaluaron los resultados de toxicidad para cada microalga.

Posteriormente se preparó el ensayo de toxicidad del herbicida utilizando placas multipocillo donde se añadieron diferentes concentraciones de norflurazón:

35

Alga	Concentración de herbicida ($\mu\text{g/mL}$)
<i>C. reinhardtii</i>	0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5
<i>D. salina</i>	0; 100; 200; 300; 400; 500

<i>D. bardawil</i>	0; 100; 200; 300; 400; 500
<i>T. suecica</i> .	0; 100; 120; 150; 200; 300
<i>C. sorokiniana</i>	0; 50; 100; 150; 200; 250

La **Figura 5** muestra la concentración mínima a la que el norflurazón produce la muerte de cada alga (0,5 µg/ml para *C. reinhardtii*, 50 µg/ml para *C. sorokiniana* y 100 µg/ml para *D. salina*, *D. bardawil* y *T. suecica*. Estos datos son relevantes dado que
 5 confirman la concentración mínima de norflurazón que debe emplearse para seleccionar transformantes en cada especie de alga.

De estos resultados se concluye que el herbicida norflurazón es un buen agente selectivo para microalgas, ya que produce la muerte de las mismas cuando no
 10 expresan la enzima CRTI a partir del gen sintético *CRTI* presente en la construcción génica de la invención.

LISTADO DE SECUENCIAS

15 La presente memoria comprende las siguientes secuencias:

- SEQ ID NO:1. Secuencia nucleotídica del gen sintético *CRTI*.
- SEQ ID NO:2. Secuencia aminoacídica de la enzima CRTI sintética.
- SEQ ID NO:3. Secuencia aminoacídica del péptido señal cloroplástico de la
 20 subunidad pequeña de la RuBisCo.
- SEQ ID NO:4. Secuencia nucleotídica que codifica el péptido señal cloroplástico de la subunidad pequeña de la RuBisCo.
- SEQ ID NO:5. Secuencia nucleotídica de la construcción génica exógena de la invención, que comprende el promotor híbrido RbcS2/HSP70A, el intrón 1 de
 25 *Chlamydomonas*, el péptido señal cloroplástico de la subunidad pequeña de la RuBisCo, la secuencia del gen sintético *CRTI* y el terminador 3' UTR del gen de que codifica la subunidad pequeña de la enzima RuBisCo.
- SEQ ID NO:6. Secuencia nucleotídica del primer CRTIF.
- SEQ ID NO:7. Secuencia nucleotídica del primer CRTIR.

30

BIBLIOGRAFIA

Cunningham FX, Gantt E (1998). *Genes and Enzymes of carotenoid biosynthesis in*
 35 *plants*. Ann Rev of Plant Physiol and Plant Mol Biol 49: 557-83.

Harris EH (2009). *Chlamydomonas* sourcebook: Introduction to *Chlamydomonas* and Its Laboratory Use Vol 1, Second edition, CA: D. Stern, G. Witman (eds). Academic Press, San Diego.

5

Huang J, Liu J, Li Y, Chen F (2008). *Isolation and characterization of the phytoene desaturase gene as a potential selective marker for genetic engineering of the astaxanthin-producing green alga Chlorella zofingiensis (Chlorophyta)*. J Phycol 44, 684–690.

10

León-Bañares R, González D, Galván A, Fernández E (2004). *Transgenic microalgae as green cell factories*. Trends Biotechnol. 22(1): 45-52.

15

Lohr M, Im Ch-S, Grossman A (2005). *Genome-Based Examination of Chlorophyll and Carotenoid Biosynthesis in Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Physio. 138: 490-515.

20

Prasad B, Vadakedath N, Jeong HJ, General T, Cho MG, Lein W (2014). *Agrobacterium tumefaciens-mediated genetic transformation of haptophytes (Isochrhysis species)*. Appl Microbio Biotechnol 98: 8629-8639.

Steinbrenner J, Sandmann G (2006). *Transformation of the green alga Haematococcus pluvialis with a Phytoene Desaturase for accelerated astaxanthin*. Biosynthesis Applied and Environmental Microbiology 72 (12): 7477-7484.

25

Sueoka N, Chiang KS, Kates JR (1967). *Deoxyribonucleic acid replication in meiosis of Chlamydomonas reinhardtii*. Isotopic transfer experiments with a strain producing eight zoospores. J Mol Biol. 25: 47-66.

30

Suarez JV, Banks S, Thomas PG, Day A (2014). *A New F131V Mutation in Chlamydomonas Phytoene Desaturase Locates a Cluster of Norflurazon Resistance Mutations near the FAD-Binding Site in 3D Protein Models*. PLoSOne. 17;9(6):e99894.

35

Young A, Orset S, Tsavalos A (1997). *Methods for carotenoid analysis*. In: Pessaraki, editor. Handbook of Photosynthesis. New York: Marcel Dekker, pp. 597-622.

REIVINDICACIONES

1. Construcción génica que comprende la secuencia de un gen *CRTI* sintético, preferiblemente de origen bacteriano.
- 5 2. Construcción génica caracterizada porque comprende la secuencia de un gen *CRTI* sintético, dicho gen identificado por la secuencia SEQ ID NO:1.
3. Construcción génica de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada porque dicho gen *CRTI* sintético presenta al menos un 90% de identidad con la
10 secuencia SEQ ID NO:1.
4. Construcción génica de acuerdo la reivindicación 1, caracterizada porque comprende la secuencia SEQ ID NO:5.
- 15 5. Enzima fitoeno desaturasa (*CRTI*) sintética caracterizada porque su secuencia comprende la secuencia SEQ ID NO:2.
6. Método de selección de una célula de un alga resistente a un herbicida que comprende:
20 a) introducir en la célula una construcción génica que comprende la secuencia SEQ ID NO:1;
b) incubar la célula en un medio de cultivo que contiene un herbicida;
c) seleccionar las células resistentes al herbicida.
- 25 7. Método de acuerdo con la reivindicación 5, en la que la construcción génica del paso a) comprende la secuencia SEQ ID NO:5.
8. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6, en el que el herbicida se selecciona del grupo que consiste en: norflurazón o 3-cloro-4-
30 (clorometil)-1-[3-(trifluorometil)fenil]pirrolidin-2-ona.
9. Método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el herbicida es norflurazón.
- 35 10. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en el que el alga es una microalga.
11. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, en el que la microalga se selecciona del grupo que consiste en las clases: Chlorophyceae,

Trebouxiopyceae, Prasinphyceae, Eustigmatophyceae, Chrysophyceae o Dinophyceae.

- 5 12. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10, en la que la microalga pertenece a un género seleccionado del grupo que consiste en: *Chlamydomonas*, *Dunaliella*, *Scenedesmus*, *Chlorella*, *Nannochloris*, *Tetraselmis*, *Ostreococcus*, *Nannochloropsis* o *Phaeodactylum*.
- 10 13. Uso de la construcción génica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en la selección de un alga resistente a un herbicida, en el que el alga comprende la construcción génica.
- 15 14. Uso, de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el herbicida se selecciona del grupo que consiste en: norflurazón o 3-cloro-4-(clorometil)-1-[3-(trifluorometil)fenil]pirrolidin-2-ona.
- 15 15. Uso, de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el herbicida es norflurazón.
- 20 16. Uso, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en el que el alga es una microalga.
- 25 17. Uso, de acuerdo con la reivindicación 15, en la que la microalga se selecciona del grupo que consiste en las clases: Chlorophyceae, Trebouxiopyceae, Prasinphyceae, Eustigmatophyceae, Chrysophyceae o Dinophyceae.
- 30 18. Uso, de acuerdo con las reivindicaciones 15 o 16, en la que la microalga pertenece a un género seleccionado del grupo que consiste en: *Chlamydomonas*, *Dunaliella*, *Scenedesmus*, *Chlorella*, *Nannochloris*, *Tetraselmis*, *Ostreococcus*, *Nannochloropsis* o *Phaeodactylum*.

FIGURA 1



FIGURA 2

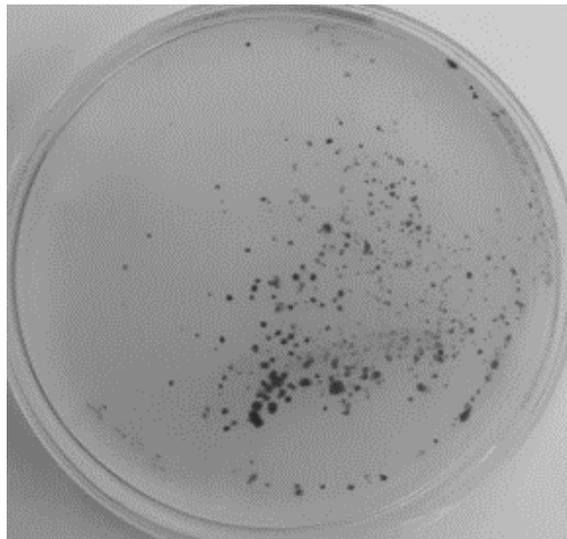


FIGURA 3

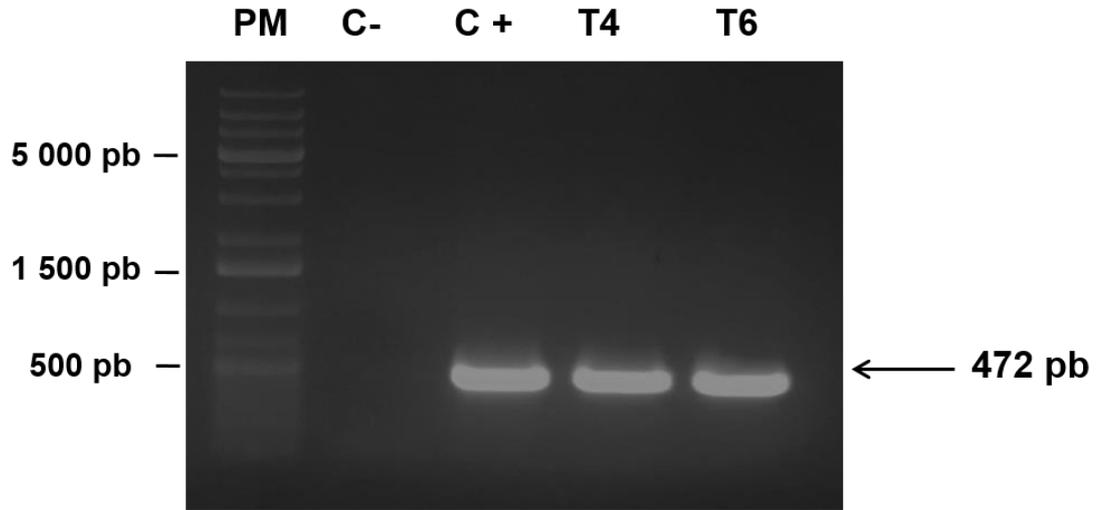


FIGURA 4

A

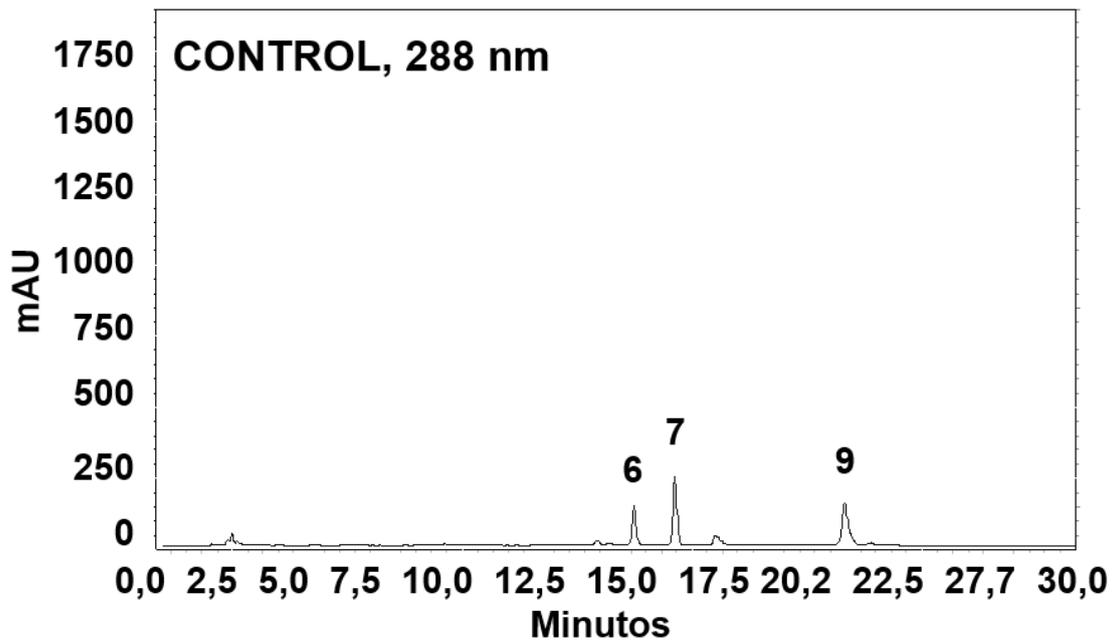
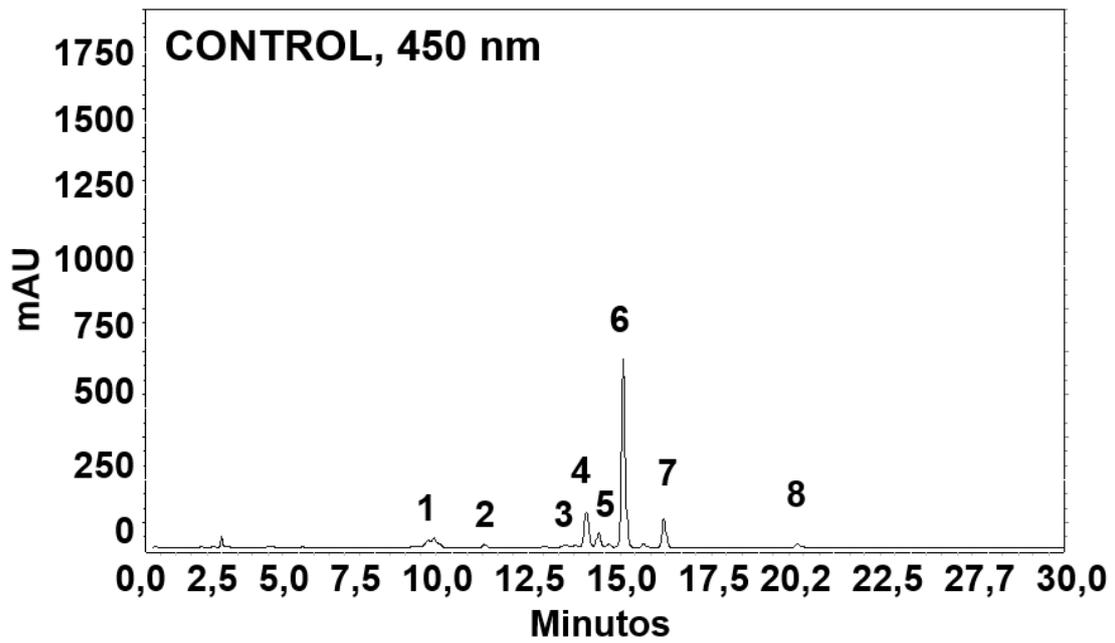


FIGURA 4 (Cont.)

B

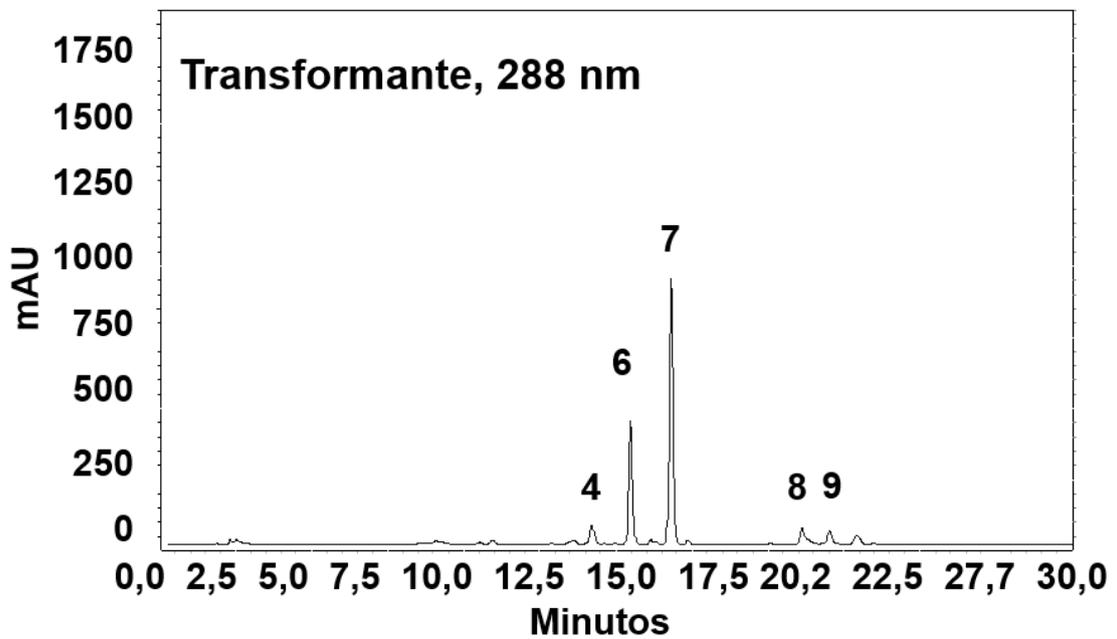
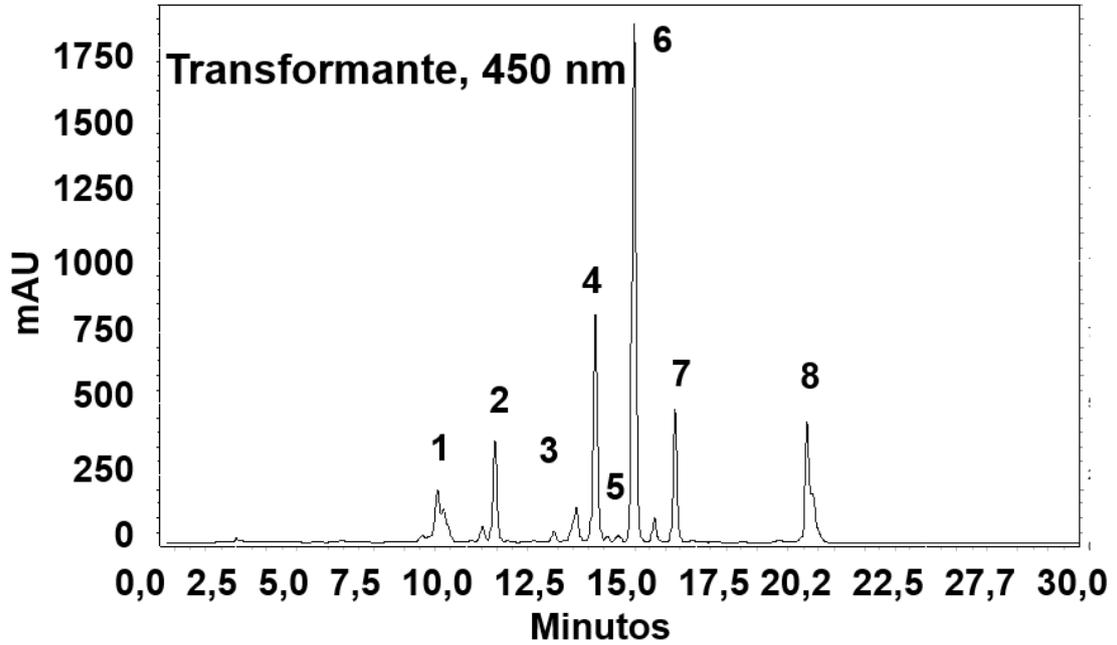
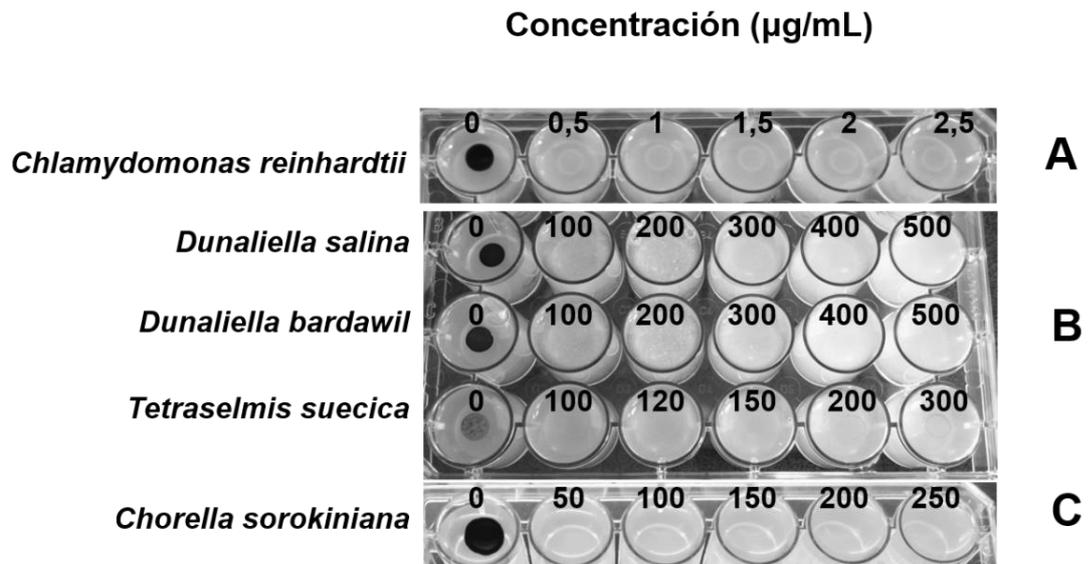


FIGURA 5





- ②① N.º solicitud: 201830544
②② Fecha de presentación de la solicitud: 05.06.2018
②③ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12N9/02** (2006.01)
A01H13/00 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WINDHOVEL, UTE, et al.. Expression of <i>Erwinia uredovora</i> phytoene desaturase in <i>Synechococcus</i> PCC7942 leading to resistance against a bleaching herbicide. <i>Plant physiology</i> , 1994, Vol. 104, Nº 1, Páginas 119-125. Resumen, páginas 119-124.	1-5
X	MATTHÄUS, FALK, et al . Production of lycopene in the non-carotenoid-producing yeast <i>Yarrowia lipolytica</i> . <i>Appl. Environ. Microbiol.</i> 2014, Vol. 80, Nº 5, Páginas 1660-1669. Resumen y página 1661.	1-5
X	WO 99/53081 A1 (ZENECA LIMITED) 21/10/1999, Resumen, páginas 1, 2, 5, 6 9 y reivindicaciones 1, 4 y 5, SEQ NO 1 y 2.	1-5
A	SUAREZ, JULIO V., et al. . A new F131V mutation in <i>Chlamydomonas</i> phytoene desaturase locates a cluster of norflurazon resistance mutations near the FAD-binding site in 3D protein models.. <i>PLoS one.</i> , 2014, Vol. 9, Nº 6. Todo el documento.	1-18
A	BREITENBACH, JÜRGEN; ZHU, CHANGFU; SANDMANN, GERHARD. Bleaching herbicide norflurazon inhibits phytoene desaturase by competition with the cofactors. <i>Journal of agricultural and food chemistry.</i> 2001, Vol. 49, Nº 11, Páginas 5270-5272. Todo el documento.	1-18

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
03.12.2018

Examinador
M. J. García Bueno

Página
1/2

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

C12N, A01H

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, TXTE, XPESP, NPL, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, EMBL ALL, INTERNET