



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 319 473**

② Número de solicitud: 200401890

⑤ Int. Cl.:  
**A01H 5/00** (2006.01)  
**C12N 15/82** (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

② Fecha de presentación: **30.07.2004**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **07.05.2009**

Fecha de la concesión: **22.01.2010**

⑤ Fecha de anuncio de la concesión: **16.02.2010**

⑥ Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**16.02.2010**

⑦ Titular/es:  
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas  
c/ Serrano, 117  
28006 Madrid, ES**

⑧ Inventor/es: **Van Dillewijn, Pieter;  
Corredoria, Elena;  
Ballester, Antonio;  
Caballero Reyes, Antonio;  
Couselo, José Luis y  
Ramos Martín, Juan Luis**

⑨ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑭ Título: **Árboles transgénicos resistentes a explosivos y que eliminan TNT.**

⑮ Resumen:

Árboles transgénicos resistentes a explosivos y que eliminan TNT.

El objetivo de la presente patente es aportar una alternativa económica y respetuosa con el medio ambiente para eliminar compuestos nitroaromáticos, preferentemente 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) de suelos y aguas subterráneas. Para ello se utilizan plantas transgénicas que eliminan estos compuestos. El método incluye el uso de chopos y abedules transgénicos portando los genes *pnrA*, *xenB* o *nemA* de *Pseudomonas putida* o el gen *nemA* de *Escherichia coli* expresados desde el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV35S) que es constitutivo en plantas. La expresión de estos genes confiere a los árboles mayor resistencia a TNT e incrementa la capacidad para eliminar TNT de suelos y aguas subterráneas. La limpieza de los sitios contaminados pueden realizarla las plantas transgénicas cultivándolas en los suelos contaminados o en suelos próximos a acuíferos contaminados. Las plantas extraen TNT y lo detoxifican. Estas plantas transgénicas pueden restaurar sitios altamente contaminados, y así permitir la recolonización del suelo limpio por plantas autóctonas que no verían inhibido su crecimiento debido a la eliminación del contaminante.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

## DESCRIPCIÓN

Árboles transgénicos resistentes a explosivos y que eliminan TNT.

## 5 Sector de la técnica

La invención se encuadra en el sector de la lucha biológica contra la contaminación química generada por la fabricación de productos con aplicaciones en el área de los explosivos y productos farmacéuticos de carácter nitroorgánico. La invención hace uso de técnicas agrícolas para facilitar la eliminación de productos recalcitrantes de aguas subterráneas y el subsuelo.

## Estado de la técnica

El 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) se utiliza ampliamente en explosivos civiles y militares en el mundo. Su síntesis, procesamiento, almacenamiento y eliminación ha dado lugar a la contaminación de suelos, aguas superficiales y aguas subterráneas. Se sabe que existen grandes extensiones de suelo contaminado por TNT en USA y Europa que necesitan tratamiento. Gran parte de los residuos de TNT se han depositado en lagunas sin revestimientos, alcanzando las aguas subterráneas por filtración (Pennington y Patrick, 1990. Adsorption and desorption of 2,4,6-trinitrotoluene by soils. J. Environ. Qual. 19:559-567; Selim *et al.*, 1995. Transport of 2,4,6-trinitrotoluene and hexahydro-1,3,4-trinitro-1,3,5-triazine in soils. Soil Sci. 160:328-339). El TNT es tóxico para numerosos procariontas y eucariotas y mutagénico en *Salmonella typhimurium* (Spanggord *et al.*, 1982. Mutagenicity in *Salmonella typhimurium* and structure activity relationships of waste water components emanating from the manufacture of trinitrotoluene. Environ. Mutagen. 4:163-179; Styles y Cross, 1983. Activity of 2,4,6,-TNT in an *in vitro* mammalian gene mutation assay. Cancer Lett. 20:103-108; Tan *et al.*, 1992. Mutagenicity of trinitrotoluene and its metabolites formed during composting. J. Toxicol. Environ. Health 36:165-175; Won y Disalvo, 1976. Toxicity and mutagenicity of 2,4,6-trinitrotoluene and its microbial metabolites. Appl. Environ. Microbiol. 31:576-580; J.C.S. Spain, J.B. Huger y H.J. Knackmuss, (Eds). Biodegradation of nitroaromatic compounds and explosives. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA) debido a la naturaleza electrofílica del anillo aromático. De hecho el TNT oxida reductores originando toxicidad directamente o a través de la formación de otros productos como radicales nitroareno (Mason y Josephy, 1985, Toxicity of nitroaromatic compounds, Hemisphere Publishing Co. New Cork pp. 121-140). El TNT por su naturaleza de nitroaromático es un xenobiótico que, debido a su toxicidad, su eliminación se considera una prioridad por diversas agencias medioambientales.

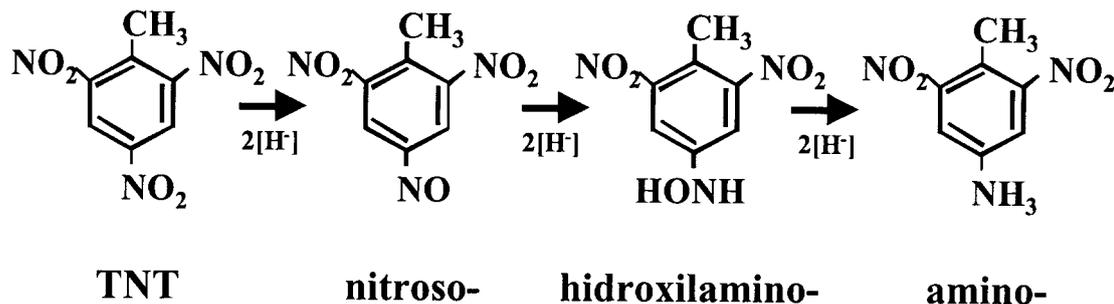
Hasta la fecha, la tecnología que se ha utilizado para tratar los suelos contaminados es la retirada de los mismos y su incineración. Aunque la incineración es altamente efectiva, tiene las desventajas de su alto coste y la generación de gases de efecto invernadero que además afectan a la capa de ozono. Tratamientos alternativos *ex situ* incluyen compostaje, "land-farming", y tratamiento de suelos en biorreactores. En estos biorreactores el TNT se transforma y sus derivados se unen irreversiblemente a las partículas del suelo, lo cual neutraliza su toxicidad. Sin embargo, en suelos profundos contaminados con TNT estas tecnologías *ex situ* son difíciles de aplicar. Es por ello que se necesitan métodos alternativos menos onerosos. La biorremediación ofrece el potencial que requiere dicha alternativa.

Se han descrito microorganismos que eliminan TNT disuelto en agua y que operan con una alta eficacia (Duque *et al.*, 1993. Construction of a *Pseudomonas* hybrid strain that mineralizes 2,4,6-trinitrotoluene., J. Bacteriol. 175:2278-2283; Esteve-Núñez *et al.*, 1998. Metabolism of 2,4,6-Trinitrotoluene by *Pseudomonas* sp. JLR11. Environ. Sci. Tech. 32: 3802-3808). Sin embargo cuando estos microorganismos se introducen en suelos desnudos, su viabilidad se ve disminuida y son poco eficientes eliminando el contaminante. Una estrategia alternativa consiste en introducir los microorganismos adheridos a la semilla de plantas, así se consiguen altas densidades celulares, pero los microorganismos aerobios sólo funcionan en la capa superior de los suelos. Otra estrategia alternativa es la de transferir a plantas genes bacterianos que atacan al TNT y facilitar así la eliminación de TNT en suelos tanto superficiales como profundos. Para esta aproximación se ha elegido chopos híbridos *Populus tremula* x *Populus tremuloides* var. Etropole (chopo) y *Betula pendula* (abedul) como plantas vector, y los genes *pnrA*, *xenB* y *nemA* de *P. putida* cepa JLR11 y el gen *nemA* de *Escherichia coli*, todos estos genes codifican enzimas que desactivan el anillo de TNT.

La presente invención describe un método para la generación de árboles transgénicos caracterizados por tener mayor resistencia a TNT debido a que expresan los genes bacterianos *pnrA*, *xenB* o *nemA* de *P. putida* o *nemA* de *Escherichia coli*. Los árboles obtenidos por este método se caracterizan porque en suelos con TNT tienen mayor peso, contenido en proteína, clorofila en las hojas y mayor crecimiento vegetativo, tanto en altura como en el número de hojas, que los árboles no transformados. Por tanto, esta invención provee un método eficaz para eliminar de los suelos explosivos y, específicamente, explosivos nitroaromáticos.

La persistencia y toxicidad de TNT se debe en gran medida a su estructura química, que limita el ataque oxidativo de la molécula por oxigenasas. De hecho la mineralización (conversión de un compuesto a CO<sub>2</sub> y agua) del TNT bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas es limitada (Funck *et al.*, 1995, en: Bioremediation of recalcitrant organics, Battelle Press: Columbus, OH pp. 329-350; Fernando *et al.*, 1990. Biodegradation of TNT (2,6-trinitrotoluene) by *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 47:452-457; Scheibner *et al.*, 1997. Screening for fungi intensively mineralizing 2,4,6-trinitrotoluene. Appl. Microbiol. Biotechnol. 47:452-457; Herre *et al.*, 1997. Fourth international *in situ* and on site bioremediation symposium, Battelle Press: Columbus, OH vol. 2, pp. 493-498; Widrig *et al.*, 1997. Bioremediation of TNT-contaminated soil: a laboratory study. Environ. Toxicol. Chem. 16:1141-1148; Boopathy *et al.*, 1998. A laboratory study of the bioremediation of 2,4,6-trinitrotoluene-contaminated soil using aerobic/anoxic soil

slurry reactor. Water Environ. Res. 70:80-86; Duque *et al.*, 1993. Construction of a *Pseudomonas* hybrid strain that mineralizes 2,4,6-trinitrotoluene, J. Bacteriol. 175:2278-2283). Sin embargo, se han descrito bacterias que utilizan TNT como fuente de nitrógeno. Por otro lado, se debe indicar que los grupos nitro del anillo aromático son fácilmente reducibles por reductasas que están ampliamente distribuidas entre los seres vivos. La reducción de los grupos nitro ocurre en una serie de transferencia de dos electrones que conduce a la formación de derivados nitroso, hidroxilamino y amino. Los derivados hidroxilamino se han identificado recientemente como intermediarios en la degradación de nitroaromáticos, y pueden dar lugar tras reorganizaciones de tipo Bamberger a la producción de amonio. No obstante, bajo condiciones aeróbicas, pero no en anaeróbicas, los derivados nitroso e hidroxilamino pueden reaccionar entre ellos dando lugar a la producción de tetranitrozoxitoluenos, que son muy recalcitrantes (Haïdour y Ramos, 1996. Identification of products resulting from the biological reduction of 2,4,6-trinitrotoluene, 2,4-dinitrotoluene, and 2,6-dinitrotoluene by *Pseudomonas* sp., Environ. Sci. Technol. 30:2365-2370).



Se ha aislado una bacteria identificada como *Pseudomonas* sp. JLR11 capaz de utilizar TNT como fuente de nitrógeno bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Balances de masa con TNT revelaron que alrededor de un 85% del total del nitrógeno del TNT se incorporaba a la célula como biomasa (Esteve-Núñez y Ramos, 1998. Metabolism of 2,4,6-trinitrotoluene by *Pseudomonas* sp. JLR11. Environ. Sci. Technol. 32:3802-3808). Esta cepa también utiliza TNT como aceptor final de electrones, indicando que la cepa respira TNT (Esteve-Núñez *et al.* 2000. Respiration of 2,4,6-trinitrotoluene by *Pseudomonas* sp. strain JLR11. J. Bacteriol. 182:1352-1355). Recientemente se ha identificado que la proteína PnrA (GenBank AAM95986) de esta cepa es una nitroreductasa citoplasmática que reduce TNT a 4-hidroxilamino-2,6-dinitrotolueno (A. Caballero *et al.* Env. Microbiol., sometido a publicación).

Otra posible ruta de degradación de TNT es por medio del ataque del anillo aromático por iones hidruro. Ello da lugar a la formación de un intermediario inestable denominado complejo de Meisenheimer, que para restablecer su aromaticidad, puede liberar un grupo nitro y formar dinitrotoluenos.

La formación del complejo de Meisenheimer desde TNT está bien caracterizado en la cepa *Pseudomonas* sp. clon A (E. Duque *et al.* 1993. Construction of a *Pseudomonas* hybrid strain that mineralizes 2,4,6-trinitrotoluene. J. Bacteriol. 175:2278-2283; Haïdour y J.L. Ramos. 1996. Identification of products resulting from the biological reduction of 2,4,6-trinitrotoluene, 2,4-dinitrotoluene, and 2,6-dinitrotoluene by *Pseudomonas* sp. Environ. Sci. Technol. 30:2365-2370), *Enterobacter cloacae* PB2 (French *et al.* 1998. Aerobic degradation of 2,4,6-trinitrotoluene by *Enterobacter cloacae* PB2 and by pentaerythritol tetranitrato reductase. Appl. Environ. Microbiol. 64: 2864-2868), *Pseudomonas fluorescens* I-C (Pak *et al.* 2000. Transformation of 2,4,6-trinitrotoluene by purified xenobiotic reductase B from *P. fluorescens* I-C. Appl. Environ. Microbiol. 66:4742-4750). Transformation of 2,4,6-trinitrotoluene by purified xenobiotic reductase B from *Pseudomonas fluorescens* I-C. Appl. Environ. Microbiol. 66: 4742-4750), *Mycobacterium* sp. HL4NT-1 (Vorbeck *et al.* 1994. Identification of a hydride-Meisenheimer complex as a metabolite of 2,4,6-trinitrotoluene by a *Mycobacterium* strain. J. Bacteriol. 176:932-934), y *Rhodococcus erythropolis* HL PM-1 (Vorbeck *et al.* 1998. Initial reductive reactions in aerobic microbial metabolism of 2,4,6-trinitrotoluene. Appl. Environ. Microbiol. 64:246-252). De estas cepas, *Pseudomonas* sp. clon A y *Enterobacter cloacae* PB2 son capaces de usar TNT como fuente de nitrógeno. En algunos casos los genes y enzimas implicados en convertir TNT en el complejo de Meisenheimer se han estudiado con algún detalle, en particular en el caso de la pentaeritritol tetranitrato (PETN) reductasa codificada por el gen *onr* de *Enterobacter cloacae* PB2 (French *et al.* 1996. Sequence and properties of pentaerythritol tetranitrato reductase from *Enterobacter cloacae* PB2. J. Bacteriol. 178:6623-6627) y la xenobiótica reductasa B, codificada por el gen *xenB* de *Pseudomonas fluorescens* I-C (Blehert *et al.* 1999. Cloning and sequence analysis of two *Pseudomonas* flavoprotein xenobiotic reductases. J. Bacteriol. 181:6254-6263). Ambas proteínas pertenecen a la familia de flavoproteínas conocidas como Old Yellow Enzyme (Williams y Bruce. 2002. New uses for an Old Enzyme - the Old Yellow Enzyme family of flavoenzymes. Microbiology 148:1607-1614). Esto es de interés porque se ha descrito que algunos dinitrotoluenos y mononitrotoluenos son susceptibles de ser mineralizados (A. Esteve-Núñez, A. Caballero y J.L. Ramos. 2001. Biological degradation of 2,4,6-trinitrotoluene. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 65:335-352).

Por otro lado, la cepa JLR11 también presenta un gen que codifica una proteína homóloga a XenB. La secuencia del gen *xenB* de JLR11 (GenBank AAN66545) es idéntica a la encontrada en la cepa KT2440, además comparte un 45% de identidad con la secuencia aminoacídica de la PETN reductasa de *Enterobacter cloacae* (GenBank AAB38683) y 87% con la xenobiótica reductasa B de *Pseudomonas fluorescens* (GenBank AAF02539). Tanto la PETN reductasa

como XenB de *P. fluorescens* reducen el TNT al complejo de Meisenheimer. Este complejo se ha sugerido que es un intermediario necesario para la liberación de nitrito de TNT detectado en reacciones *in vitro* con el enzima PETN reductasa y XenB de *P. fluorescens* (French *et al.* 1998. Aerobic degradation of 2,4,6-trinitrotoluene by *Enterobacter cloacae* PB2 and by pentaerythritol tetranitrato reductase. Appl. Env. Microbiol. 64:2864-2868; Pak *et al.* 2000. Transformation of 2,4,6-trinitrotoluene by purified xenobiotic reductase B from *Pseudomonas fluorescens* I-C. Appl. Env. Microbiol. 66:4742-4750). Ensayos de nuestro laboratorio con XenB purificada a homogeneidad de la cepa *Pseudomonas putida* JLR11 también han puesto de manifiesto la formación del complejo de Meisenheimer y la liberación de nitrito en una reacción dependiente de la presencia de NAD(P)H. El complejo de Meisenheimer es inestable y da lugar a la formación de una serie de productos cuya estructura es desconocida (P. van Dillewijn *et al.*, en preparación).

El enzima N-etilmaleimida reductasa de *Escherichia coli* codificada por el gen *nema* (GenBank BAA13186) actúa como una denitrasa de TNT (M.M. González-Pérez *et al.*, en preparación); Williams *et al.*, 2004. Biotransformation of explosives by the Old Yellow Enzyme family of flavoproteins. Appl. Env. Microbiol. 70:3566-3574). Nema reduce N-etilmaleimida a N-etilsuccinimida y también pertenece a la familia de flavoproteínas conocida como Old Yellow Enzyme (Miura *et al.* 1997. Molecular cloning of *nema* gene encoding N-ethylmaleimide reductase from *Escherichia coli*. Biol. Pharm. Bull. 20:110-112). En *Pseudomonas* JLR11 se ha identificado una secuencia (GenBank AAN68781) que comparte 68% de identidad con Nema de *E. coli* y como el enzima de *E. coli* denitra TNT, este gen se ha denominado *nema* en *P. putida* JLR11 (P. van Dillewijn *et al.*, en preparación).

Las proteínas PnrA, XenB y Nema atacan el anillo de TNT. PnrA reduce los grupos nitro hasta hidroxilaminos y éstos podrían ser susceptibles de eliminación del anillo como iones amonio tras una reorganización de Bamberger, mientras que XenB y Nema parecen dar lugar el complejo de Meisenheimer que tras varias reacciones químicas complejas libera nitrito.

#### Metabolismo de TNT en plantas

##### a) Reducción de TNT en tejidos vegetales

Muchas plantas pueden incorporar xenobióticos y transformarlos en sus tejidos; entre estos compuestos se encuentra el TNT. Las plantas reducen el TNT reduciendo los grupos nitro hasta hidroxilamino y amino, los cuales se conjugan con otros metabolitos de la planta tales como azúcares. Este proceso reduce la toxicidad de los derivados del TNT y pueden ser acumulados en las vacuolas o polimerizados en derivados de la lignina. Sin embargo, el TNT no es mineralizado por las plantas (Hughes *et al.* 1997. Transformation of TNT by aquatic plants and plant tissue cultures. Environ. Sci. Technol. 31:266-271).

La biotransformación de TNT se ha descrito en distintas plantas. En general reducen TNT a 2-amino-4,6-dinitrotolueno (2ADNT) y 4-amino-2,6-dinitrotolueno (4ADNT). La mayor parte de estos productos se acumulan en las raíces y su concentración suele exceder a la de TNT (Thompson *et al.* 1998. Uptake and transformation of TNT by hybrid poplar trees. Env. Sci. Technol. 32:975-980; Vanderford *et al.* 1997. Phytotransformation of trinitrotoluene (TNT) and distribution of metabolic products in *Myriophyllum aquaticum*. Biotechnol. Lett. 19:277-280). El estudio de Wang y colaboradores (Wang *et al.* 2003. Role of Hydroxylamine Intermediates in the Phytotransformation of 2,4,6-Trinitrotoluene by *Myriophyllum aquaticum*. Env. Sci. Technol. 37:3595-3600) identificó derivados hidroxilamino en plantas, concretamente 2-hidroxilamino-4,6-dinitrotolueno y 4-hidroxilamino-2,6-dinitrotolueno, así como derivados azoxitetranitrotoluenos. Los resultados de ese estudio sugieren que la formación de los derivados azoxi ocurre más rápidamente que la reducción a amino. En la planta acuática *Myriophyllum aquaticum* se identificaron además productos derivados de la oxidación del TNT tales como 2-amino-4,6-dinitrobenzoato, 2-N-acetoxiamino-4,6-dinitrobenzaldehído, alcohol 2,4-dinitro-6-hidroxibencílico y 2,4-dinitro-6-hidroxitolueno (Bhadra *et al.* 1999. Characterization of Oxidation Products of TNT Metabolism in Aquatic Phytoremediation Systems of *Myriophyllum aquaticum*. Env. Sci. Technol. 33:3354-3361).

Probablemente el TNT no se conjugue directamente con metabolitos de la planta debido a la falta de grupos reactivos apropiados. Por tanto, la reducción de los grupos nitro o la oxidación de la cadena alquímica precede a la conjugación. Estos productos se pueden conjugar con glucosa, o malonato, una reacción catalizada por glucosiltransferasas y malonil transferasas (revisado por Coleman *et al.* 1997. Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. Trends Plant Sci. 2:144-151). Bhadra *et al.* (1999. Confirmation of Conjugation processes during TNT metabolism by axenic plant roots. Env. Sci. Technol. 33:446-452) describieron por primera vez la conjugación de TNT en raíces de *Catharanthus roseus*. Los productos conjugados cambiaron con el tiempo, aunque la naturaleza química de los mismos se desconoce.

##### b) Absorción y transformación de TNT por chopos no-transgénicos

Los chopos se caracterizan por un crecimiento rápido y extensivo de su sistema radicular. Estas características y su gran capacidad de transpiración hacen estas plantas atractivas de cara a la eliminación de contaminantes y es una parte importante de esta patente. Los estudios de Thompson (1998. Uptake and transformation of TNT by hybrid poplar trees. Env. Sci. Technol. 32:975-980) con chopos demostraron que el TNT era transportado por estos árboles tanto en cultivos hidropónicos como desde el suelo debido a su alta transpiración de agua y la biodisponibilidad de TNT en cultivos hidropónicos. En experimentos con <sup>14</sup>C-TNT estos autores detectaron hasta el 75% del carbono marcado del TNT en el sistema radicular de la planta, translocándose cerca del 10% a las hojas. Esto ocurría tanto

con TNT en suelo como en hidropónico. La mayor parte del  $^{14}\text{C}$ -TNT no pudo ser extraído de los tejidos de la planta. Los productos de transformación incluyeron 2-amino-4,6-dinitrotolueno, 4-amino-2,6-dinitrotolueno, 2,4-diamino-6-nitrotolueno. Asimismo otros 4 productos de carácter polar no se pudieron identificar químicamente, aunque uno de ellos se translocaba a hojas. Concentraciones de TNT superiores a 5 mg/litro inhibían fuertemente el crecimiento y la transpiración de los chopos híbridos.

### c) Plantas transgénicas que expresan nitroreductasas bacterianas

French y colaboradores (1999. Biodegradation of explosives by transgenic plants expressing pentaerythritol tetranitrate reductase. *Nature Biotechnol.* 17:491-494) y Hannik *et al.* (2001. Phytodetoxification of TNT by transgenic plants expressing a bacterial nitroreductase. *Nature Biotechnol.* 19:1168-1172) describieron plantas transgénicas de tabaco que expresaban el gen *onr* que codifica la PETN reductasa o el gen *nfsD* que codifica una nitroreductasa, ambos genes procedían de *Enterobacter cloacae*. Mientras que el TNT a concentración 0,025 mM inhibía el desarrollo de líneas parentales de tabaco, las líneas transgénicas germinaron y crecieron a concentraciones 0,05 mM mientras la línea *nfs*- de tabaco crecía en presencia de concentraciones de TNT de 0,25 mM, aunque no así la línea basada en *onr*. Además la línea *nfs* presentaba mayor peso húmedo que la planta parental a medida que aumentaba la concentración de TNT y eliminaba TNT más rápidamente que la parental. Así después de 7 días en las raíces de la planta parental se detectó:  $67 \pm 28$  nmoles TNT/g húmedo de raíz y  $13 \pm 3$  nmoles de ADNT/g húmedo de raíz;  $13 \pm 6$  nmoles TNT/g húmedo de tallo y  $3 \pm 0,3$  g aminodinitrotolueno (ADNT)/g húmedo de tallo. En las raíces de las líneas *nfs* no se detectó TNT y el nivel de ADNT era de  $10 \pm 3$  nmol/g peso húmedo en raíz e indetectable en tallos. Esto indica que el TNT se absorbe y transforma más rápidamente en las líneas transgénicas que en las parentales.

## Descripción de la invención

### - Breve descripción de la invención

El objeto de la presente invención es una planta resistente a compuestos nitroaromáticos en la que se ha introducido al menos un gen derivado o modificado de *Pseudomonas putida* JLR11 o de *Escherichia coli*. Los genes procedentes de *P. putida* JLR11 son *xenB*, *pnrA* y *nema* y el gen procedente de *E. coli* es *nema*. Se consideran genes derivados de *P. putida* y *E. coli* aquellos genes homólogos que presentan una secuencia codificadora al menos un 70% idéntica a dichos genes, implicando cualquier adición múltiple o individual de nucleótidos, sustituciones o eliminaciones. Por genes modificados de *P. putida* y *E. coli* se entiende aquellos genes en los que se ha sustituido la secuencia del promotor bacteriano por otra que garantice la expresión en planta.

Los genes bacterianos utilizados en la presente invención tienen actividad metabólica en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, y las proteínas expresadas en los explantes son activas en condiciones de alta y baja tensión de oxígeno tanto en suelos como en aguas subterráneas.

Las plantas seleccionadas para introducir los genes bacterianos son árboles que preferentemente pertenecen a los géneros *Populus* y *Betula* o híbridos de los mismos. Dichas plantas modificadas presentan mayor peso, mayor contenido en proteína y clorofila en las hojas y mayor crecimiento vegetativo que las plantas de la misma especie no transformadas.

Estas plantas modificadas son resistentes a compuestos nitroaromáticos, y al explosivo 2,4,6-trinitrotolueno o productos de su degradación tales como derivados nitroso, amino, hidroxilamino, dinitrotoluenos y nitrotoluenos.

Otro objeto de la presente invención lo constituye un procedimiento de obtención de plantas resistentes a compuestos nitroaromáticos que comprende las siguientes etapas:

- a) Construcción de un plásmido binario para cada gen bacteriano, que constituye un vector de transferencia a plantas.
- b) Transformación de cepas de *Agrobacterium* con los plásmidos obtenidos en a).
- c) Infección de explantos (segmentos nodales) con una suspensión bacteriana obtenida en b).
- d) Eliminación de *Agrobacterium* de las plantas infectadas
- e) Confirmación de la presencia de los genes bacterianos en las líneas transformadas.
- f) Multiplicación y enraizamiento de las líneas transformadas y aclimatación en invernadero.

Asimismo, constituye un objeto de la presente invención, la utilización de dicha planta resistente a compuestos nitroaromáticos para fitorremediar un suelo o agua subterránea contaminados por compuestos nitroaromáticos. Considerando la fitorremediación en todos sus aspectos que comprende los procesos de fitoextracción, fitodegradación, fitodetoxificación, fitocontención y rizodegradación de los compuestos nitroaromáticos. La fitorremediación se realiza preferentemente en suelo y agua contaminados con TNT y sus productos de degradación (derivados nitroso, amino, hidroxilamino, dinitrotoluenos y nitrotoluenos).

Igualmente, las plantas objeto de la presente invención pueden ser utilizadas para la restauración de los ecosistemas de zonas contaminadas por compuestos nitroaromáticos, o como barrera que impide el avance de los contaminantes, o para estimular el crecimiento de las bacterias que colonizan la rizosfera y son capaces de degradar compuestos nitroaromáticos, estimulando la rizorremediación.

5 La presente invención puede ser utilizada para descontaminar suelos que se encuentran próximos a instalaciones productoras de dichos compuestos nitroaromáticos. Un procedimiento adecuado para descontaminar suelos comprende las etapas de:

- 10 a) aireación del suelo por arado profundo
- b) siembra de las plantas resistentes a compuestos nitroaromáticos.

15 La presente invención también puede ser utilizada para descontaminar agua subterránea que resulta de la precolación de polvorines o es un efluente de una fábrica de explosivos.

### Breve descripción de las figuras

20 Figura 1. *Vector binario pBIXB*. NOS-pro: promotor del gen de nopalina sintasa; NOS-ter: terminal del gen de nopalina sintasa; NptII neomicina fosfotransferasea II (confiere resistencia a kanamicina en plantas); 35S-pro: promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor; *xenB*: el gene *xenB* de JLR11; T-border (left): extremo izquierda del fragmento de T-ADN; T-border (right): extremo derecha del fragmento de T-ADN; y Km<sup>R</sup>: el gen de resistencia a kanamicina.

25 Figura 2. *Vector binario pBIpnrA*. NOS-pro: promotor del gen de nopalina sintasa; NOS-ter: terminal del gen de nopalina sintasa; NptII neomicina fosfotransferasea II (confiere resistencia a kanamicina en plantas); 35S-pro: promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor; *pnrA*: el gene *pnrA* de JLR11; T-border (left): extremo izquierda del fragmento de T-ADN; T-border (right): extremo derecha del fragmento de T-ADN; y Km<sup>R</sup>: el gen de resistencia a kanamicina.

30 Figura 3. *Vector binario pBINemA*. NOS-pro: promotor del gen de nopalina sintasa; NOS-ter: terminal del gen de nopalina sintasa; NptII neomicina fosfotransferasea II (confiere resistencia a kanamicina en plantas); 35S-pro: promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor; *nemA*: el gene *nemA* de JLR11; T-border (left): extremo izquierda del fragmento de T-ADN; T-border (right): extremo derecha del fragmento de T-ADN; y Km<sup>R</sup>: el gen de resistencia a kanamicina.

35 Figura 4. *Vector binario pBINemAEC*. NOS-pro: promotor del gen de nopalina sintasa; NOS-ter: terminal del gen de nopalina sintasa; NptII neomicina fosfotransferasea II (confiere resistencia a kanamicina en plantas); 35S-pro: promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor; *nemA-E. coli*: el gene *nemA* de *E. coli*; T-border (left): extremo izquierda del fragmento de T-ADN; T-border (right): extremo derecha del fragmento de T-ADN; y Km<sup>R</sup>: el gen de resistencia a kanamicina.

### - Descripción detallada de la invención

45 Esta invención proporciona un proceso para la fitorremediación de sitios contaminados por nitroaromáticos utilizando especies de chopos y abedules transgénicos diseñados con este propósito. En resumen, esta invención tiene como objeto obtener líneas de chopos y abedules transgénicos introduciendo vectores binarios con nitroreductasas bacterianas. Otro aspecto de esta invención es el uso de líneas transgénicas para la fitorremediación de suelos y aguas subterráneas contaminadas por explosivos nitroaromáticos.

#### Obtención de plantas de chopo y abedul transgénicas

50 Para crear las líneas transgénicas de *Populus* y *Betula*, se utilizaron genes derivados o modificados de *P. putida* JLR11 o *Escherichia coli*. Por modificación se entiende la sustitución de la secuencia del promotor bacteriano por otro con expresión constitutiva en plantas. Por derivados de estos genes se entiende los homólogos de cada gen, cuya secuencia codificadora es al menos un 70% idéntica a los genes utilizados en esta invención, implicando cualquier adición múltiple o individual de nucleótidos, sustituciones o eliminaciones. Todos los genes elegidos para crear líneas de *Populus* y *Betula* tienen actividad metabólica en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Las proteínas expresadas en los explantes son activas en condiciones de alta y baja tensión de oxígeno en suelos y en aguas subterráneas.

55 Para transferir los genes *pnrA*, *xenB* y *nemA* a *Populus* y a *Betula*, primero se procedió a donar los genes en un vector de transferencia a plantas en 3' con respecto al promotor CaMV35S que se expresa constitutivamente en tejidos vegetales. Las Figuras 1 a 4 muestran un detalle de las construcciones, las cuales portan genes de resistencia a kanamicina para facilitar la ulterior selección.

60 *xenB*, *pnrA* y *nemA* procedentes de *Pseudomonas putida* JLR11 se donaron en un vector binario, como se describe en el Ejemplo 1, para obtener pBIXB (Figura 1), pBIpnrA (Figura 2) y pBINemA (Figura 3), respectivamente. De igual manera, el gen *nemA* de *Escherichia coli* se clonó en un vector binario para obtener pBINemAEC (Figura 4).

## ES 2 319 473 B1

Para conseguir plantas transgénicas de *Populus* y *Betula*, se procedió a transformar cada vector binario citado en tejido vegetal utilizando las técnicas mencionadas en el Ejemplo 2.

### Proceso para la fitorremediación de aguas o suelos contaminados por explosivos nitroaromáticos

5 Esta invención describe un proceso de fitorremediación con la ayuda de las plantas transgénicas citadas con anterioridad. La fitorremediación en todos sus aspectos comprende la fitoextracción, es decir: que la planta extrae o concentra los derivados nitrados de suelos o aguas subterráneas en sus tejidos; la fitodegradación mediante la cual los derivados nitrados son transformados, metabolizados o conjugados por o en la planta; la fitodetoxicación mediante la cual los derivados nitrosos son transformados, metabolizados o conjugados por o en la planta en otros compuestos derivados menos tóxicos; la fitocontención mediante la cual la presencia de una o más plantas disminuye la proliferación de la contaminación por derivados nitrados en suelos y aguas por su acción de fitorremediación, y la rizorremediación en la que la población microbiana que coloniza bien la superficie de la raíz (rizoplano) o el suelo colindante a la raíz del chopo y abedul transgénicos (rizosfera) asiste en la degradación, detoxificación, transformación, metabolismo, 15 contención y/o extracción de los derivados nitroso.

Para que las plantas se conviertan en elementos fitorremediadores eficaces deben ser resistentes a altos niveles de contaminación. Se ha demostrado con anterioridad que plantas transgénicas de tabaco, que expresan el gen *onr* que codifica la reductasa PETN, son más resistentes a altas concentraciones de TNT que la planta parental (French *et al.*, 1999. Biodegradation of explosives by transgenic plants expressing pentaerythritol tetranitrate reductase. Nat. Biotechnol. 17:491-494). El proceso que describe esta invención nos muestra igualmente que los chopos y abedules transgénicos exhiben gran resistencia frente a niveles altos de TNT, como se describe en el Ejemplo 3.

Otro aspecto de esta invención es que las líneas transgénicas pueden utilizarse para eliminar el TNT del medio ambiente. Mediante el uso de técnicas estándar para el cultivo de especies de los géneros *Populus* y *Betula*, se pueden cultivar líneas transgénicas con las condiciones ambientales adecuadas y suelos con 0-10 g TNT/kg, pH 5-8,5. Bajo estas condiciones la planta puede absorber TNT del medio acuoso y de suelos como se describe en los ejemplos 4 y 5.

Un aspecto más de esta invención es que las líneas transgénicas de *Populus* y *Betula* pueden utilizarse como barrera para impedir el avance de los contaminantes. En el Ejemplo 6 se describe cómo las líneas transgénicas pueden llegar a impedir la propagación simulada de un contaminante en una bandeja de tierra.

Un nuevo aspecto de esta invención es que las líneas transgénicas estimulan el crecimiento de las bacterias que colonizan la rizosfera capaces de degradar el TNT y, de este modo, estimular la rizorremediación. El Ejemplo 7 describe cómo las líneas transgénicas son capaces de estimular no sólo el crecimiento de una bacteria conocida (*P. putida* JLR11), colonizadora de la rizosfera de la raíz y degradadora de TNT, sino también de bacterias indígenas con capacidad para degradar TNT. Esto es de gran importancia ya que las bacterias que sobreviven en suelos contaminados o aguas son más propensas a desarrollar algún tipo de metabolismo del contaminante. Además, se entiende que bajo la rizorremediación, las bacterias de la rizosfera pueden complementar el metabolismo de las plantas transgénicas de *Populus* y *Betula*. Esto significa que los exudados de la planta, que son productos finales, podrían ser utilizados por las bacterias de la rizosfera como fuente de nitrógeno o carbono para el crecimiento, o transformados en otros intermediarios, que a su vez podrían ser utilizados por otras bacterias colonizadoras de la rizosfera como sustratos, o absorbidos y metabolizados por las plantas transgénicas *Populus* y *Betula*. Esto daría lugar a la total mineralización del contaminante en dióxido de carbono, agua y amonio, eliminando así de manera eficaz el contaminante del medio. 45

Otro aspecto más de esta invención es el uso de las líneas transgénicas para la restauración de ecosistemas. Los árboles transgénicos pueden actuar como precursores en sitios contaminados, la tolerancia al tóxico permitiría el crecimiento de la planta transgénica en condiciones que son inviables para otras plantas, animales y microorganismos. Una vez se inicia la eliminación del contaminante, las plantas transgénicas crean microhábitats, permitiendo así a las especies autóctonas recolonizar el nicho limpio. Así se favorece la restauración de la zona, se embellece el lugar y anima a otros animales y plantas a establecerse en la zona. Otro aspecto de la restauración de ecosistemas es que el crecimiento de plantas en sitios que de otras maneras serían estériles es estéticamente más atractivo, por tanto el uso de líneas transgénicas con estas pretensiones es de aceptación por el público en general.

### 55 Ejemplos de realización de la invención

#### Ejemplo 1

##### 60 Construcción de un plásmido binario

1. XenB: El gen *xenB* que codifica la reductasa xenobiótica XenB se obtuvo amplificando este gen del ADN cromosómico de JLR11 mediante PCR con los cebadores XNBFB 5'-TTTGGATCCATAAAAG CACTGGCCAC-3' (SEQ ID NO 1) y XNBR 5'-TTTGGATCCAGAGCCAGATTCAGAACC-3' (SEQ ID NO 2). El producto amplificado se clonó en pGEM-T para obtener pJLXBB. Éste último se digirió con el enzima de restricción *Aat*II y fue tratado con el enzima de Klenow para hacer los extremos romos. Después se cortó el vector con *Sac*I y el fragmento resultante de 1,25 kilobases fue ligado en el vector binario pB 121 cortado con *Sma*I y *Sac*I. De esta manera se obtuvo el vector binario pBIXB (Figura 1). 65

## ES 2 319 473 B1

2. PnrA: La nitroreductasa *pnrA* se obtuvo amplificando este gen del ADN cromosómico de JLR11 mediante PCR con los cebadores Nfs6 5'-ATTCTAGAGTTATGAGCGTATATCTCGG-3' (SEQ ID NO 3) y Nfs7 5'-TTTGGATCCAGAGCCAGATTCAGAACC-3' (SEQ ID NO 4). El producto amplificado se clonó en pUC18 para obtener *pnrA*. El producto de la PCR con *pnrA* se digirió con los enzimas de restricción *XbaI* y *SacI* y el fragmento resultante se ligó en el vector binario pB121, a su vez cortado por *XbaI* y *SacI*. De esta manera se obtuvo el vector binario pB1pnrA (Figura 2).
3. NemaA: La reductasa N-etilmaleimida se obtuvo amplificando este gen del ADN cromosómico de JLR11 mediante PCR con los cebadores NemaF 5'-TTTGGATCCGCAGATTCAGACGTATGC-3' (SEQ ID NO 5) y NemaR 5'-TTTGGATCCCGTTTTTGCATCAAGC-3' (SEQ ID NO 6). El producto amplificado se clonó en pUC18 para obtener pKTNA. El plásmido pKTNA se digirió con los enzimas de restricción *BamHI* y se trató con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa para hacer los extremos romos. El fragmento resultante se ligó en el vector binario pB 121 que había sido cortado con *SacI* y tratado con Klenow para hacer los extremos romos y luego cortado con *SmaI*. De esta manera se obtuvo el vector binario pBINemA (Figura 3).
4. NemaA: La reductasa N-etilmaleimida se obtuvo amplificando el gen *nemaA* del ADN cromosómico de *Escherichia coli* mediante PCR con los cebadores NemaECF 5'-TTTCCCGGGTGACTGAGTTGCTG CAATCC-3' (SEQ ID NO 7) y NemaECR5' -TTTCCCGGGGCATGGTATGAAGAAGACGC-3' (SEQ ID NO 8). El producto amplificado se clonó en pUC 18 para obtener pECNA. El plásmido pECNA se digirió con los enzimas de restricción *SmaI*. El fragmento resultante se ligó en el vector binario pB 121 que había sido cortado con *SacI* y tratado con Klenow para hacer los extremos romos y luego cortado con *SmaI*. De esta manera se obtuvo el vector binario pBINemAEC (Figura 4).

### Ejemplo 2

#### *Obtención de las plantas transgénicas de Populus*

##### 1. Material vegetal

En los ensayos de transformación (Tzfira, T., Jensen, C.S., Wang, W., Zuker, A., Vinocur, B., Altman, A., and Vainstein, A. (1997) Transgenic *Populus tremula*: a step-by-step protocol for its *Agrobacterium*-mediated transformation. Plant Mol. Biol. Report. 15:219-235), se utilizaron segmentos nodales obtenidos de cultivos stock *in vitro* de brotes axilares de *Populus tremula x tremuloides* var. Etropole, establecidos a partir de plantas micropropagadas de 3-4 años. Estos cultivos stock se mantuvieron mediante subcultivos mensuales en medio de multiplicación que se describe a continuación. Las condiciones de crecimiento de los mismos fueron 16 horas de luz fotoperiódica suministrada por tubos fluorescentes de luz blanca (Mazdafluor 7D TF 36 w/LJ) con una densidad de flujo radiante de 30-60  $\mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ . La temperatura fue de 25°C durante las 16 horas de luz y de 20°C durante las 8 horas de oscuridad.

##### 2. Medios de cultivo

Se han utilizado los siguientes medios de cultivo:

Luria Bertani (LB): 10 g/L de bacto-triptona, 5 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de cloruro sódico y 15 g/L de Agar Difco; pH 7.

Medio de multiplicación (MM): medio basal de Murashige y Skoog [Murashige, T., Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497] (MS) adicionado con mio-Inositol 100 mg/L, glicina 0,3 mg/L, glutamina 1 mg/L pantotenato cálcico 10 mg/L, adenina sulfato 0,1 mg/L, sacarosa 20 mg/L, agar Difco 7 g/L, 0,15 mg/L de 6-benciladenina (BA), 0,2 mg/L ácido indolbutírico (AIB) y 0,1 mg/L de ácido naftalenacético (ANA); pH 5,7. Medio de inducción de caulogénesis (MIC): es igual al medio de multiplicación pero la BA, el AIB, y el ANA se sustituyen por 0,005 mg/L de tidiazuron (TDZ); pH 5,7.

##### 3. Transformación

3.1. Una vez transformadas las células de *Agrobacterium* de la cepa C58C1(pMP90) con el plásmido pB1pnrA y las de la cepa EHA105 con los plásmidos pBIXB, pBINemA o pBINemACE, se plaquean sobre medio LB-agar con 50 mg/L de rifampicina, y 50 mg/L de kanamicina (C58C1) o con 50 mg/L de kanamicina y de ácido nalidíxico (EHA105). Las colonias son visibles después de incubar esas placas durante 2-3 días a 28°C.

3.2. Se inocularon 5 ml de medio LB líquido con una colonia de cada cepa y con los antibióticos correspondientes y se incubaron durante 24 horas a 28°C y 150 rpm.

3.3. Se inocularon 300 mL de LB sin antibióticos con 1 mL de cada uno de los cultivos anteriores y se mantuvieron en agitación constante a 28°C hasta alcanzar una  $\text{DO}_{600} = 0,3$ .

## ES 2 319 473 B1

3.4. Los brotes de *Populus*, procedentes de cultivos de 4 semanas, se seccionaron longitudinalmente para obtener segmentos nodales de aproximadamente 1 cm, se eliminaron las hojas y se sumergieron en la suspensión bacteriana durante 30 minutos.

5 3.5. Los explantos infectados se secaron ligeramente en papel de filtro y se transfirieron a placas petri 90 mm con medio MIC donde se co-cultivaron durante 3 días en oscuridad a 20°C.

3.6. Se lavaron los explantos tres veces en 25 mL en agua destilada y esterilizada con 300 mg/L de carbecilina para eliminar el *Agrobacterium tumefaciens*.

10 3.7. Se secaron los explantos en papel de filtro esterilizado y se transfirieron a placas petri de 90 mm con medio MIC esta vez con 300 mg/L de carbenicilina para eliminar el *Agrobacterium tumefaciens* y 50 mg/L de kanamicina para seleccionar las células transformadas.

15 3.8. Los explantos se mantuvieron en las mismas condiciones ambientales que los cultivos stock de *Populus* durante aproximadamente dos meses. Pasado ese tiempo se procedió a aislar una yema por cada zona de los explantos en la que se observó un evento de regeneración y por tanto resistencia a la kanamicina. Cada yema aislada se transfirió a medio MM con 50 mg/L de kanamicina y después de unas 5-6 semanas se obtuvo un brote enraizado.

20 3.9. Se confirmó mediante PCR y Southern blot la presencia de los genes *xenB*, *pnrA* y *nemA* de *P. putida* y *nemA* de *E. coli* en los brotes obtenidos de las yemas resistentes. A partir de cada brote procedente de un evento de transformación en el que se ha confirmado la presencia de los mencionados genes se estableció una línea transformada. Por último, mediante RT-PCR se cuantificó la expresión de los genes con el objeto de seleccionar las líneas con mayor expresión.

25 3.10. Los brotes de cada línea transformada se multiplicaron mediante la proliferación de yemas axilares en medio MM. Una vez se dispuso del suficiente material de cada línea, se aclimató en el invernadero.

### 30 Ejemplo 3

#### *Resistencia de plantas transgénicas al TNT bajo distintas condiciones*

Las plantas de chopo transgénicas muestran una mayor resistencia a concentraciones elevadas de TNT (0,5 mM TNT en agua y 2 g TNT/Kg suelo) que la planta parental y que cualquier otra planta. El TNT puede resultar tóxico para las plantas en concentraciones entre 1 y 30 mg TNT/L (Burlen *et al.* Phytoremediation and plant metabolism of explosives and nitroaromatic compounds. In Biodegradation of Aromatic Compounds and Explosives, eds Spain, J.C., Hugues, J.B, and Knackmuss, H.-J. 2000. CRC Press, Boca Raton, Florida). Las plantas silvestres y las transgénicas aclimatadas se cultivaron en medio hidropónico (Murashige and Skoog (1962 citado *supra*)) modificado con mio-Inositol 100 mg/L, glicina 0,3 mg/L, glutamina 1 mg/L, pantotenato cálcico 10 mg/L, sulfato de adenina 0,1 mg/L y pH 5,7 o en suelo de la Estación Experimental del Zaidín de Granada (España) con diferentes concentraciones de TNT (de 0 a 0,5 mM en medio acuoso o 2 g TNT/kg de tierra). Una vez establecidos los niveles de resistencia, se varió el pH en tierra, la salinidad y el contenido de metales pesados con el fin de determinar las limitaciones tanto para las líneas transgénicas como para las parentales. El crecimiento se determinó considerando las diferencias entre T=0 y 2 semanas en cada una de las condiciones. Los valores se compararon entre las plantas transgénicas y las plantas silvestres, sugiriendo que a mayor biomasa de plantas transgénicas, mayor resistencia. Las plantas transgénicas crecieron en las mayores concentraciones ensayadas, mientras que las no modificadas se vieron afectadas a concentraciones del 50% de las toleradas por las transgénicas.

### 50 Ejemplo 4

#### *Absorción de TNT en agua por plantas transgénicas*

55 Se introdujeron plantas aclimatadas de un mes de edad pertenecientes a la especie *Populus* en recipientes con 100 mL de solución MS y pH 7 a 24°C. Este medio fue rociado con TNT de una solución stock de 100 mg/L y de 1-6  $\mu$ Ci TNT marcado con  $^{14}$ C, de acuerdo con Thompson *et al.* (1998 op.cit.). El marcador radioactivo se analizó en medio hidropónico cada 4 horas durante un día entero. Las muestras se colocaron en líquido de centelleo y se midieron con un contador de centelleo. Alternativamente, las muestras se analizaron por HPLC en un cromatógrafo, modelo 1050  
60 de Hewlett-Packard equipado con un detector de array de diodo y una columna Waters Nova-Pak C18 (3,9 mm  $\times$  150 mm). Los productos en la muestra se separaron con una mezcla del 60% (vol/vol) de acetonitrilo y de agua al 40% (vol/vol) en la fase móvil a un flujo constante de 0,7 mL/min durante 5 minutos. El detector se calibró a 254 nm para detectar los compuestos nitroaromáticos y se compararon los picos de TNT con una curva calibrada de TNT bajo las mismas condiciones.

65

## Ejemplo 5

*Absorción de TNT en suelos por líneas transgénicas*

5 Se introdujeron plantas aclimatadas de un mes de edad pertenecientes a la especie *Populus* en recipientes con 100 g de tierra de la Estación Experimental del Zaidín (Granada, España) rociada con soluciones de 1 mg de TNT y 1,8  $\mu\text{Ci}$  de TNT marcado con  $^{14}\text{C}$ . El marcador radioactivo se analizó en las muestras de tierra en tiempos diferentes utilizando líquido y contador de centelleo. De manera alternativa, se extrajeron 2 g de muestras de suelo con 10 mL de acetonitrilo y se mezcló durante 18 h. Después, se extrajeron 5 mL del sobrenadante y se mezcló con 5 mL de una solución de  $\text{CaCl}_2$  a 5 g/L. Tras centrifugación, las muestras se analizaron por HPLC como se describe en el

10 Ejemplo 4.

## Ejemplo 6

15 *Uso de las plantas transgénicas como plantas barrera*

Se llenaron bandejas de 75 cm  $\times$  50 cm  $\times$  10 cm con 5 cm de suelo esterilizado procedente de la Estación Experimental del Zaidín. En uno de los extremos se colocó verticalmente un tubo de plástico, perforado en la base con agujeros de 1 cm, de manera que el agua evacuada permaneciera en el interior para su muestreo. En medio de una de las bandejas se plantaron 6 plantas aclimatadas silvestres o transgénicas a unos 10 cm unas de otras. Otra de las bandejas permaneció sin plantas como control. Una vez establecidas las plantas (1 semana), se introdujeron cristales de TNT en el extremo opuesto al tubo de plástico y se regaron las bandejas con agua saturada con TNT (ca. 300 mg TNT/L) en el extremo donde se encontraban los cristales, simulando así la contaminación. Una vez por semana se procedía a regar las bandejas en el mismo lugar con agua desionizada hasta que el agua entraba en el tubo y se procedía a su muestreo. Las muestras se analizaron por HPLC, descrito en el Ejemplo 4, para determinar la diferente

20 difusión del TNT en las bandejas con y sin plantas.

25

## Ejemplo 7

30 *Estimulación de bacterias de la rizosfera degradadoras de TNT*

van Aken *et al.* (2004. Biodegradation of nitro-substituted explosives 2,4,6-trinitrotoluene, hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine, and octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5-tetrazocine by a phytosymbiotic *Methylbacterium* sp. Associated with poplar tissues (*Populus deltoides*  $\times$  *nigra* DN34). Appl. Environ. Microbiol. 70:508-517) identificaron bacterias capaces de degradar el TNT, presentes en la rizosfera de los chopos. La cepa *Pseudomonas putida* JLR11, capaz de degradar TNT, puede colonizar la rizosfera de varias plantas de uso agrícola (Espinosa-Urgel, Kolter and Ramos, 2002. Root colonization by *Pseudomonas putida*: love at first sight. Microbiology 148:341-343). Con el fin de determinar la estimulación de las bacterias degradadoras de TNT que colonizan la rizosfera de plantas de chopo y abedul transgénicas y silvestres, se realizaron experimentos en microcosmos. Para estos experimentos, se llenaron maceteros de 10 cm de diámetro con tierra esterilizada de la Estación Experimental del Zaidín (Granada). Previamente se introdujeron las plantas transgénicas o silvestres aclimatadas en un cultivo de medio mínimo M9 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  7 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3 g/L 1 g/L y  $\text{NaCl}$  0,5 g/L) con  $1 \times 10^6$  JLR11/mL durante una hora. Después se lavaron las raíces con agua esterilizada desionizada y se plantaron las plantas en los maceteros. El número de bacterias presentes en la rizosfera se determinó al retirar la planta de los maceteros y sacudir el exceso de tierra adherida a la raíz.

45 Posteriormente se cortaron las raíces y se introdujeron en 15 mL de medio mínimo M9 con bolas de cristal de 2 mm esterilizadas y se agitó vigorosamente. Después se extrajeron las raíces y se determinó el peso de la tierra de la rizosfera. El número de células por gramo de rizosfera se determinó en serie diluyendo el sobrenadante en placas con medio mínimo M9 enriquecido con kanamicina 25  $\mu\text{g/L}$ , benzoato 10 mM,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  1 mM, citrato III amonio férrico 0,006% (peso/volumen) y micronutrientes diluidos 400 veces:  $\text{HBO}_3$  300 mg/L,  $\text{ZnCl}_2$  50 mg/L,  $\text{MnCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$  30 mg/L,  $\text{CoCl}_2$  200 mg/L,  $\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$  20 mg/L, y  $\text{NaMo}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ . La estimulación de las bacterias de las rizosfera degradadoras de TNT se puede determinar contando la formación de colonias de la población de JLR11 en la rizosfera y comparando las poblaciones de las líneas transgénicas y las parentales. De manera alternativa, se pueden cultivar las líneas transgénicas aclimatadas y las plantas parentales en maceteros de tierra no esterilizada. De igual manera que la descrita con anterioridad, se pueden determinar las unidades formadoras de colonias en la rizosfera en placas con medio M9 modificado, eliminando  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , reemplazando benzoato por glucosa y utilizando agua saturada con TNT para diluir los constituyentes del medio. De esta manera, sólo crecerán las colonias de bacterias capaces de utilizar TNT como única fuente de nitrógeno.

50

55

60

65

# ES 2 319 473 B1

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Planta resistente a compuestos nitroaromáticos **caracterizada** porque incluye al menos un gen derivado o modificado de *Pseudomonas putida* JLR11 o de *Escherichia coli*.
- 10 2. Planta resistente a compuestos nitroaromáticos según la reivindicación 1 **caracterizada** porque los genes procedentes de *P. putida* JLR11 se seleccionan entre *xenB* (SEQ ID N° 9), *pnrA* (SEQ ID N° 10) y *nemA* (SEQ ID N° 11).
- 15 3. Planta resistente a compuestos nitroaromáticos según la reivindicación 1 **caracterizada** porque el gen procedente de *E. coli* es *nemA* (SEQ ID N° 12).
- 20 4. Planta resistente a compuestos nitroaromáticos **caracterizada** porque los genes derivados de *P. putida* y *E. coli* presentan una secuencia codificadora al menos un 70% idéntica a los genes de las reivindicaciones 2 y 3, implicando cualquier adición múltiple o individual de nucleótidos, sustituciones o eliminaciones.
- 25 5. Planta resistente a compuestos nitroaromáticos según las reivindicaciones 1-4 **caracterizada** porque en los genes modificados de *P. putida* y *E. coli* se ha sustituido la secuencia del promotor bacteriano por otra que garantice la expresión en planta.
- 30 6. Planta resistente a compuestos nitroaromáticos según las reivindicaciones 1-5 **caracterizada** porque los genes bacterianos tienen actividad metabólica en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, y las proteínas expresadas en los explantes son activas en condiciones de alta y baja tensión de oxígeno tanto en suelos como en aguas subterráneas.
- 35 7. Planta resistente a compuestos nitroaromáticos según las reivindicaciones 1-6 **caracterizada** porque es una planta leñosa, preferentemente un árbol, y más preferentemente un árbol que pertenece a los géneros *Populus* y *Betula* o híbridos de los mismos.
- 40 8. Planta resistente a compuestos nitroaromáticos según las reivindicaciones 1-7 **caracterizada** porque dicha planta es resistente preferentemente al explosivo 2,4,6-trinitrotolueno o productos de su degradación tales como derivados nitroso, amino, hidroxilamino, dinitrotoluenos y nitrotoluenos.
- 45 9. Planta resistente a compuestos nitroaromáticos según las reivindicaciones 1-8 **caracterizada** porque dichas plantas presentan mayor peso, mayor contenido en proteína y clorofila en las hojas y mayor crecimiento vegetativo que las plantas de la misma especie no transformadas.
- 50 10. Procedimiento de obtención de plantas resistentes a compuestos nitroaromáticos según las reivindicaciones 1-9 **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas:
- a. Construcción de un plásmido binario para cada gen bacteriano, que constituye un vector de transferencia a plantas.
  - b. Transformación de cepas de *Agrobacterium* con los plásmidos obtenidos en a).
  - 45 c. Infección de explantos (segmentos nodales) con una suspensión bacteriana obtenida en b).
  - d. Eliminación de *Agrobacterium* de las plantas infectadas
  - e. Confirmación de la presencia de los genes bacterianos en las líneas transformadas.
  - 50 f. Multiplicación y enraizamiento de las líneas transformadas y aclimatación en invernadero.
- 55 11. Utilización de una planta resistente a compuestos nitroaromáticos según las reivindicaciones 1-9 para fitorremediar un suelo o agua subterránea contaminados por compuestos nitroaromáticos.
- 60 12. Utilización de una planta resistente a compuestos nitroaromáticos según la reivindicación 11 **caracterizada** porque el término “fitorremediar” comprende los procesos de fitoextracción, fitodegradación, fitodetoxicación, fitocontención y rizodegradación de los compuestos nitroaromáticos.
- 65 13. Utilización de una planta resistente a compuestos nitroaromáticos según las reivindicaciones 11 y 12 **caracterizada** porque dichos compuestos nitroaromáticos son preferentemente TNT y sus productos de degradación (derivados nitroso, amino, hidroxilamino, dinitrotoluenos y nitrotoluenos).
14. Utilización de una planta resistente a compuestos nitroaromáticos según las reivindicaciones 1-9, para la restauración de los ecosistemas de zonas contaminadas por compuestos nitroaromáticos.

## ES 2 319 473 B1

15. Utilización de una planta resistente a compuestos nitroaromáticos según las reivindicaciones 1-9 como barrera que impide el avance de los contaminantes.

5 16. Utilización de una planta resistente a compuestos nitroaromáticos según las reivindicaciones 1-9 para estimular el crecimiento de las bacterias que colonizan la rizosfera y son capaces de degradar compuestos nitroaromáticos, estimulando la rizorremediación.

10 17. Utilización de una planta resistente a compuestos nitroaromáticos según las reivindicaciones 11-16 **caracterizada** porque el suelo a descontaminar está próximo a una instalación productora de dichos compuestos nitroaromáticos.

18. Utilización de una planta resistente a compuestos nitroaromáticos según las reivindicaciones 11-14 **caracterizada** porque el agua subterránea a tratar es un efluente procedente de una fábrica de explosivos.

15 19. Utilización de una planta resistente a compuestos nitroaromáticos según las reivindicaciones 11-14 **caracterizada** porque el agua subterránea a tratar resulta de la percolación de polvorines.

20 20. Procedimiento de utilización de una planta resistente a compuestos nitroaromáticos según las reivindicaciones 11-17 **caracterizado** porque comprende las etapas de:

a. aireación del suelo por arado profundo

b. siembra de plantas resistentes a compuestos nitroaromáticos según las reivindicaciones 1-9.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

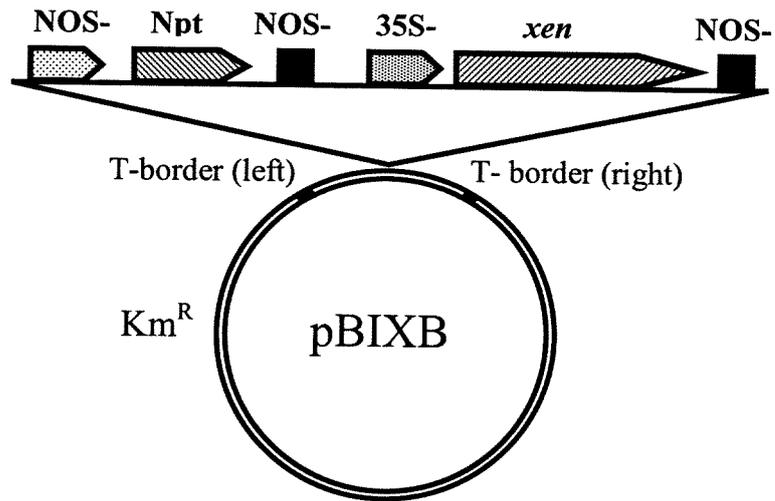


Figura 2

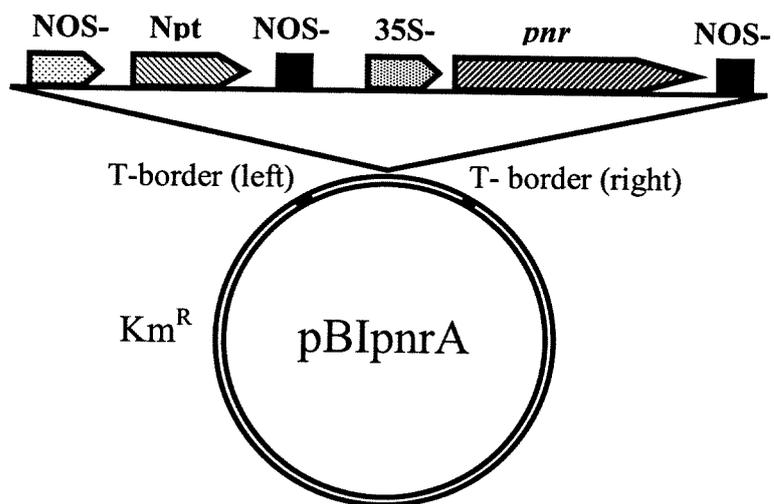


Figura 3

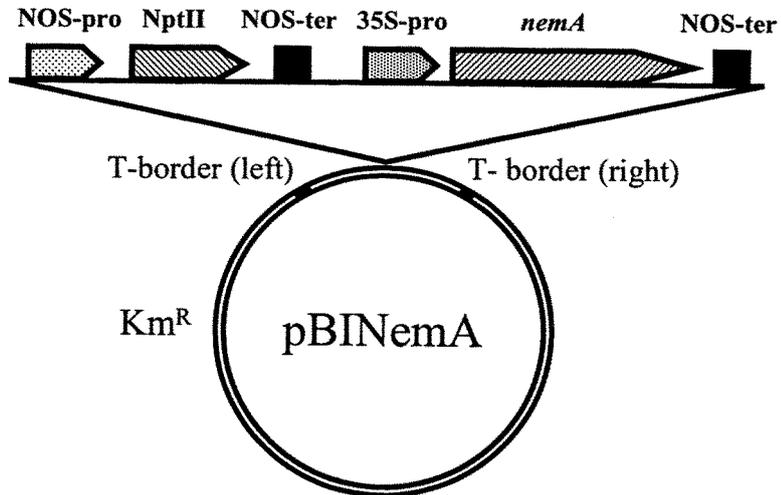
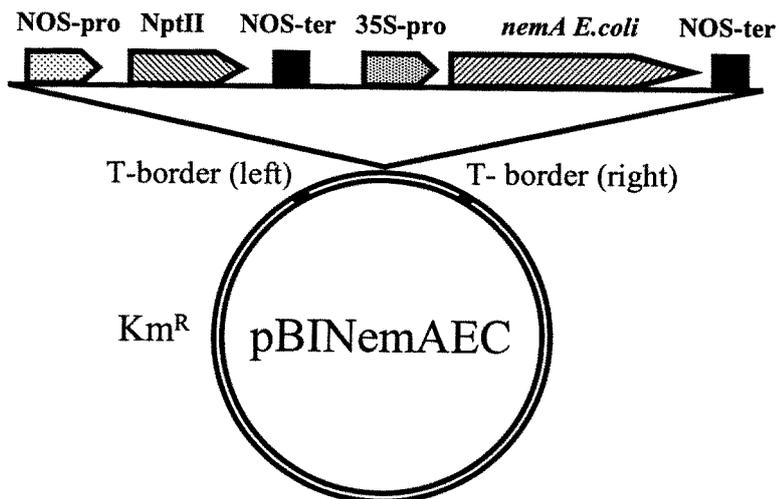


Figura 4



# ES 2 319 473 B1

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas

- 5 <120> Árboles transgénicos resistentes a explosivos y que eliminan TNT
- <130> ES 200401890
- 10 <140> ES 200401890
- <141> 2004-07-30
- <160> 12
- 15 <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- 20 <211> 27
- <212> DNA
- <213> secuencia artificial
- 25 <400> 1
- tttggatcca taaaagcact ggcccac 27
- 30 <210> 2
- <211> 27
- <212> DNA
- 35 <213> secuencia artificial
- <400> 2
- 40 tttggatcca gagccagatt cagaacc 27
- <210> 3
- <211> 28
- 45 <212> DNA
- <213> secuencia artificial
- <400> 3
- 50 attctagagt tatgagcgtat tatctcgc 28
- 55 <210> 4
- <211> 27
- <212> DNA
- <213> secuencia artificial
- 60 <400> 4
- 65 tttggatcca gagccagatt cagaacc 27
- <210> 5

# ES 2 319 473 B1

<211> 27  
<212> DNA  
<213> secuencia artificial  
5  
<400> 5  
tttggatccg cagattcaga cgtatgc 27  
10  
<210> 6  
<211> 25  
<212> DNA  
15  
<213> secuencia artificial  
<400> 6  
20  
tttggatccc gtttttgcac caagc 25  
<210> 7  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> secuencia artificial  
30  
<400> 7  
tttcccgggt gactgagttg ctgcaatcc 29  
35  
<210> 8  
<211> 29  
<212> DNA  
40  
<213> secuencia artificial  
<400> 8  
45  
tttcccgggg catggtatga agaagacgc 29  
<210> 9  
50  
<211> 1456  
<212> DNA  
<213> *Pseudomonas putida*  
55  
60  
65

## ES 2 319 473 B1

<400> 9

5	tгаааgacce ggcaaccag tttccggacc agtaccacag caccgaaaac ggtgtgtgtg	60
	ccgggcaaat cgaccaacgc tgcggcctgt cgcagtcgac cgtctctgcc cacctggcca	120
	cgttgcagcg cgcgggctg atcagcagcc agaagattgg ccaatggcac ttcttcaaac	180
10	gcgacgaagc caccatacag gcgttctctg aacaactgcg ccaagcactt tgacaaggca	240
	ggtaaccgct atgaccacgc ttttcgatcc gatcaaactg ggcgacctgc aactgcccaa	300
15	ccgtatcatc atggccccgc tcaccogctg ccgcgccgat gaaggccgcg tgcccaatgc	360
	gctgatggcc gaatactacg tacaacgtgc cagcgccggg ctgatcctca gcgaggcgac	420
20	ttcggtcage cccatgggcg tcggctaccc agataccccc ggcattctgga acgatgaaca	480
	ggtacgtggc tggaacaacg tgacaaaggc cgtgcatgct gcgggcggtc gcatcttct	540
25	gcagctgtgg cacgtgggtc gtatctccca cccagctat ctgaatggcg aattgcctgt	600
	ggcccccagc gcgatccagc ccaagggcca tgtgagcctg gtgcgcccac tgagtgacta	660
30	ccctaccccg cgggcgctgg aaaccgaaga aatcaacgac atcgtcgagg cctaccgcag	720
	tggcgccgaa aatgccaaagg ctgccggttt cgatgggtgtg gagatccatg gcgccaacgg	780
35	ttacctgctc gaccagttcc tgcaaagcag caccaaccag cgcaccgacc gttacggtgg	840
	ctcgttgaa aaccgcgcgc gcctgttgct ggaggtgacc gatgcggcca ttgaagtgtg	900
40	gggcgcgcag cgcgtaggtg tgcacctggc accgcgagcc gacgcccacg acatgggcga	960
	cgccgaccgc gccgagacct tcacctatgt ggcccgagag ctgggcaagc gcggcatcgc	1020
45	cttcatctgc tcgcgggagc gggaggccga cgacagcatc gggccgctga tcaaagaggc	1080
	attcgggtggc ccgtacatcg tcaacgagcg gttcgacaag gccagtgccca atgcggccct	1140
50	ggccagtggc aaagcggatg ccgtggcggt tgggtgtgccg ttcattcgcca accccgacct	1200
	gccggcacgg ctggcagcgg atgcgccggt gaacgaggca catcccgaaa ccttctatgg	1260
55	caaggggccc gtgggttaca tcgattatcc gcggttgtga ttgagggcca ttcgcgggca	1320
	tgcccgctcc caccggtata gcgacaggct tgaagctgcg ctcgatcctg tggaagcggg	1380
60	cgtgcccgcg aacaaggctc agctgatggt acggacgggc gttgatctgt tgctgcaggt	1440
	tctgaatctg gctctg	1456

<210> 10

<211> 1027

<212> DNA

65 <213> *Pseudomonas putida*

## ES 2 319 473 B1

<400> 10

5 gttatgagcg tataatctcgg cttgtgcatg tcattgcact ggaacaatcc atcatgagcc 60  
ttcaagacga agcactcaaa gcctggcaag cccgttatgg cgagccagct aacttacctg 120  
ctgccgacac cgtgatcgcg cagatggtgc agcatcgatc agtacgtgcc tacagcgatc 180  
10 ttctgtgga tgagcagatg ctgagctggg cgatcgcggc ggcccagtca gcctcgactt 240  
cctcgaacct gcaagcttgg agcgtgctcg ccgtgcggga tcgcgagcgt ctgcgaggc 300  
15 ttgcccgact gtccggtaac cagcgccatg tcgagcaggc accgctgttc ctggtctggc 360  
tcgtggactg gtcacgccta cgccgactag ccagaacct tcaggcaccg actgcaggta 420  
20 tcgactattht agaaagctac accgtcgggtg ttgtagatgc agctctggcc gctcagaacg 480  
ccgcactagc tttcgaggcc caaggactgg gaatcgttta catcggcgga atgcgcaacc 540  
25 acccgaagc gatgtccgag gagcttggcc tgccaaacga cactttcgct gtatttggca 600  
tgtgctcgg tcatcccgat ccggcacagc ccgccgagat caagccacgc ctggcgcaat 660  
30 cagtgggtgct tcaccgtgag cgctatgagg ccaccgaggc agaggcggtt tcagttgctg 720  
cctatgaccg aaggatgagc gacttccaac atcgtcaaca acgcgaaaac cgttctctggt 780  
ccagccaggc cgtggaacgt gtaaaaggag cggattcact gagcggaaga caccgcttgc 840  
35 gagatgcatt aaacacccta ggtttcggcc tgcgctgaga tagtgagata tcccatgcct 900  
attcccgccg ccctgaaccg gagcactaat acctggcaac tttgctttgc tgcgctctcg 960  
40 ccgttccttg ttgaaacggt agtgatccat tggctgacat tcacccgaca ctcaaggttc 1020  
cagtggc 1027

45 <210> 11

<211> 1550

<212> DNA

50 <213> *Pseudomonas putida*

55

60

65

## ES 2 319 473 B1

<400> 11

	gttgaataac caatgggtca gttccgcgat tgtcggggccg cggaccgagg agcagtggga	60
5	tacctatggc ggcgcattgg cggcgaagat taccgcgag gatgaggcat tcatcgattc	120
	gttggtaacg ccagggcatg cgtccacgtc gggttcaat gacgtcgcgc attatgtgag	180
10	tgggcggctg gcacgcagct gacgcattgg ggagccctga gccgggctcc cgggtccccc	240
	tttccccaat caccocggta tcgtgcgcac cattggtttt ccacctctgg agctgcaatg	300
15	aaactcttgc aaccgctgca aatcggccca ctcaccctgc ccaaccgctg attcatggcc	360
	cccctcaccg gcttgcgcag cctggagccg ggtgatgtac ccaccgctg gatggccgag	420
20	tactaccgtc agcgtgccag tgctggcctg atcatcactg aagccacaca aatctccttc	480
	caggccaagg gctattcggg ctgcgccggc attcacagcg ccgaacagat cgctgcctgg	540
25	aagcacatca acgaaggcat ccatgccgag ggcggccaca gcgccgtgca ggtgtggcac	600
	accgggcgtg tgtcgcatac ctccctgcaa cctggcggca aggcaccctg ggccccttcg	660
	gcactgccgg cagatgcacg caccaccctg cgtgacgcgc aaggcaacct gacacgcgtg	720
30	gaaacctccg cccccgggc gtcagcga gggagatcg ctggcatcgt cgccgacttt	780
	ggccaggccg cgatcaatgc ctgtgaagcc ggcttcgact tcatcgagtt gcacgccgcc	840
35	cacggttacc tgctgcacca gttcctcacc cccagtgcc aaccagcgcga agaccgctac	900
	ggcggcagcg ttgaaaaccg tgccgcgatt gtgctggagg cggtgatgc ggccattgcc	960
40	aactggagcg ccgaccgggt cggattcgc gtgttcccgt tgggtggttt caatggtgtg	1020
	gacaatggcg aagaccagga ggccgcccgc ctgtacctga tccgcgaact ggccaagcgc	1080
45	aacctcgcct acctgcacct gtccgagccg gactgggccc gtggcaagcc actgcgtgac	1140
	gagttccgcc aggccattcg cgccgcctac cccgggggtga tcatcgcggc cgggtcctat	1200
	accgcccaga aaggcgaaga cctcatcggg cggggtttga tcgatgccgt ggcgttcggg	1260
50	cgccctaca ttgccaacc tgacctggtg gagcgtctgc ggctgcaagc gccgctgaat	1320
	gagcaccggg cgaagttcga ttacgccaat gggcctgaag ggtatacggg ttatccgttc	1380
55	ctgaagcagg cttgatgcaa aaacgggccc tcttgaggc gcccgttttt tgtgtgcgcc	1440
	aggcatggcg cgttgcgcgt aagcgcgaacc cgcttggtt tgggtggccaa gtgggtgact	1500
60	tggaggtgaa agtcctctac acaccggca aggggaagtg ttagccggag	1550

<210> 12

<211> 1362

65 <212> DNA

<213> *Escherichia coli*

# ES 2 319 473 B1

<400> 12

5	ctgcaggcca aaatttcgcg cagtttcgag cacttgaaa acgcgctggc ccatgtaaaa	60
	aacattattg cgacgcctgc cgtttagcag gcatttttta tcaccagacg accgggagcc	120
	tttatgtcat ctgaaaaact gtattcccca ctgaaagtgg gcgcgatcac ggcggcaaac	180
10	cgtattttta tggcaccgct gacgcgtctg cgcagtattg aaccgggtga cattcctacc	240
	ccgttgatgg cggaatacta tcgccaacgt gccagtgccg gtttgattat tagtgaagcc	300
15	acgcaaattt ctgccaggc aaaaggatat gcaggtgcgc ctggcatcca tagtccggag	360
	caaattgccg catggaaaaa aatcacgcct ggcgttcatg ctgaaaatgg tcatatggcc	420
20	gtgcagctgt ggcacaccgg acgcatttct cacgccagcc tgcaacctgg cggtcaggca	480
	ccggtagcgc cttcagcact tagcgcggga acacgtactt ctctgcgcga tgaaaatggt	540
25	caggcgatcc gtgttgaaac atccatgccg cgtgcgcttg aactggaaga gattccaggt	600
	atcgtcaatg atttccgtca ggccattgct aacgcgcgtg aagccggttt tgatctggta	660
30	gagctccact ctgctcacgg ttatttgctg catcagttcc tttctccttc ttcaaaccat	720
	cgtaccgatc agtacggcgg cagcgtggaa aatcgcgcac gtttggtact ggaagtggtc	780
	gatgccggga ttgaagaatg gggtgccgat cgcattggca ttcgcgtttc accaatcggg	840
35	actttccaga acacagataa cggcccgaat gaagaagccg atgcaactgta tctgattgaa	900
	caactgggta aacgcggcat tgcttatctg catatgtcag aaccagattg ggcggggggg	960
40	gaaccgtata ctgatgcgtt ccgcgaaaaa gtacgcgcc gtttccacgg tccgattatc	1020
	ggcgcaggtg catacacagt agaaaaagct gaaacgctga tcggcaaagg gttaattgat	1080
45	gcggtggcat ttggtcgtga ctggattgcg aaccggatc tggtcgccc cttgcagcgc	1140
	aaagctgagc ttaaccaca gcgtgccgaa agtttctacg gtggcggcgc ggaaggctat	1200
50	accgattacc cgacgttgta atccaacatt gcgagcggcg taaagccgcc gctatactaa	1260
	aacaacattt tgaatctggt agccattttg aggataaaaa gatgcgtctt cttcatacca	1320
55	tgctgcgcgt tggcgatttg caacgctcca tcgattttta ta	1362

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 319 473

② Nº de solicitud: 200401890

③ Fecha de presentación de la solicitud: **30.07.2004**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **A01H 5/00** (2006.01)  
**C12N 15/82** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	HANNINK N. et al. Phytodetoxification of TNT by transgenic plants expressing a bacterial nitroreductase. Nature biotechnology. 2001. Vol. 19. 1168-1172. Páginas 1169,1171.	1,5,7-15, 17-20
Y	ES 2125193 A1 (UNIÓN ESPAÑOLA DE EXPLOSIVOS, S.A.) 16.02.1999, reivindicaciones.	1,5,7-15, 17-20
A	FRENCH CE. et al. Biodegradation of explosives by transgenic plants expressing pentaerythritol tetranitrate reductase. Nature biotechnology. 1999. Vol. 17. 491-494. Páginas 471,492,494.	1,5,8-15, 17,20
A	WO 9932636 A1 (THE SECRETARY OF STATE FOR DEFENCE) 01.07.1999, página 12.	1,5,8-10

**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:

<p><b>Fecha de realización del informe</b> 23.04.2009</p>	<p><b>Examinador</b> I.Rueda Molins</p>	<p>Página 1/4</p>
---	---	-----------------------

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

A01H, 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

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 23.04.2009

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones	1 - 20	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones		<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones	2 -4 , 6, 16	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones	1, 5, 7-15, 17-20	<b>NO</b>

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 ha sido publicada.

**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	HANNINK N. ET AL. Phytodetoxification of TNT by transgenic plants expressing a bacterial nitroreductase. Nature biotechnology.Vol.19.1168 -1172.	2001
D02	ES 2125193 A1 (UNIÓN ESPAÑOLA DE EXPLOSIVOS, S.A.)	16-02-99
D03	FRENCH CE. ET AL. Biodegradation of explosives by transgenic plants expressing pentaerythritol tetranitrate reductase. Nature biotechnology.Vol.17.491-494.	1999
D04	WO 99/32636 A1 (THE SECRETARY OF STATE FOR DEFENCE).	01-07-99

**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**

La solicitud de patente se refiere a una planta resistente a compuestos nitroaromáticos (reivindicaciones 1-9), a un procedimiento para la obtención dicha planta (reivindicación 10) y a su utilización (reivindicaciones 11-20).

Los documentos D01, D03 y D04 divulgan plantas de *Nicotiana tabacum* cv.Xanthi modificadas genéticamente con un gen de *E.cloacae* que les confiere una mayor resistencia frente al TNT.

El documento D02 divulga el uso de la bacteria *Pseudomonas putida* JLR11 para la eliminación biológica de TNT.

El documento D01 es el que refleja el estado de la técnicas más cercano.

**NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Artículos 6 y 8 LP11/1986).**

La solicitud de patente reivindica (reivindicaciones 1, 5, 7-9) una planta resistente a compuestos nitroaromáticos que incluye al menos un gen de *Pseudomonas putida* JLR11 o de *Escherichia coli* en el que ha sido sustituida la secuencia del promotor bacteriano por otra que garantice la expresión en la planta. La planta se obtiene mediante un procedimiento de transformación con *Agrobacterium* (reivindicación 10) y puede ser empleada en fitorremediación (reivindicaciones 11 - 15 y 17 - 20 ).

Los documentos D01, D03 y D04 divulgan una planta de *Nicotiana tabacum* cv.Xanthi resistente a TNT ( tabla 1 de la página 1169 del documento D01; figura 1 de la página 492 del documento D03 y página 12 del documento D04 ) que incluyen un gen de *Enterobacter cloacae* con el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor que ha sido transformada con *Agrobacterium* (página 1171 del documento D01 y página 494 del documento D03). El documento D01 indica como la introducción del gen en especies con un importante desarrollo radicular, como en chopos, podría dar lugar a plantas con aplicaciones en fitorremediación (página 1171). El documento D03 también divulga la posible aplicación de la planta modificada en fitorremediación (resumen de la página 471).

El documento D02 divulga (reivindicaciones) como *Pseudomonas putida* JLR11 es una bacteria que utiliza TNT y por ello, puede ser empleada para la eliminación biológica de dicho compuesto.

La diferencia entre la solicitud de patente y los documentos D01, D03 y D04 reside en que el transgén introducido en la planta proviene de diferentes bacterias, de *P.putida* JLR11 o de *E. coli* en la solicitud de patente y de *E.cloacae* en los documentos D01, D03 y D04. Teniendo en cuenta la información divulgada en el documento D02, resultaría evidente para un experto en la materia el empleo de *P. Putida* JLR11 para la obtención de una planta resistente a compuestos nitroaromáticos. Por tanto las reivindicaciones 1, 5, 7-15 y 17 - 20 presentan novedad, pero no actividad inventiva según lo establecido en los Artículos 6 y 8 LP11/1986.